

# ALTIN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE KUARTZ KRİSTAL MİKROBALANS SİSTEMİNDE KULLANIMI

**AMİR PARVİZ FARŞÇİ TABRİZİ**

Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik Anabilim Dalı

## ÖZ

Sunulan bu çalışmanın amacı; altın nanopartikül üretimi ve bu partikülleri kuartz kristal mikrobalsans sisteminde kullanarak DNA biyosensörünün alt yapısını geliştirmektir. Çalışmanın birinci aşamasında altın nanopartikül sentezi için tetrakloraurik asit ( $\text{HAuCl}_4$ ) sodyum sitratla indirgenme reaksiyonuna dahil edilmiştir. İndirgenme reaksiyon sonucundan elde edilmiş çözeltide küresel ve eş boyutlu altın nanopartiküllerin var oluşu saptanmıştır. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu için başlangıçta reaksiyona giren altın tuzu ve sodyum sitrat derişimleri ve reaksiyon boyunca karıştırma hızı, altın nanopartikül boyutlarına üç önemli etken olarak değiştirilerek denenmiştir. Bunun sonucunda 0.06 ile 0.1mM arasında altın tuzu derişiminde ve 0.15 ile 0.50 mM arasında sodyum sitrat derişiminde ve 400 ile 800 Devir/Dakika arasında istenen partikül boyut elde edilmiştir. Partiküllerin boyut ve boy dağılımı incelemek için zeta sayıcı kullanılmıştır. Daha sonra altın nanopartikülleri kuartz kristaller üzerinde immobilize edilmek için kristal yüzeyinde yıkama ve modifikasyon işlemleri yapılmıştır. Bu amaçla kristal elektrot yüzeyleri yıkama aşamasında sırayla NaOH, aseton ve metanol ile temizlenmiş sonra fosfat tamponunda (pH= 7) de 18 mM' lık birinci sistemin immobilizasyonu ve 0.66 M glutaraldehit ile sodyum tetraborat/HCl tamponuna (pH= 8.2) ve yüzey modifikasyonun son aşaması olarak yine aynı koşullarda ikinci sistemin immobilizasyonu yapılmıştır. Yüzey modifikasyonundan sonra altın nanopartiküller, kristal yüzeyine immobilize edilmiş ve böylece kristal elektrot yüzey alanı genişletilmiştir. DNA'nın kristal üzerinde immobilize ve hibridizasyon olması için önce tiyol uçlu ssDNA, 6500 µl deiyonize suda çözülüp ve 20 µM DNA çözeltisi hazırlanmıştır. Tiyoller arasındaki disülfid bağlarını engellemek için 1 M DDT, 0.1 M fosfat tamponunda (pH= 8.3-8.5) oda sıcaklığında eklenmiştir. Hazırlanan tiyol uçlu DNA'lar 1 M potasyum fosfat tamponunda (pH= 6.7) 600 devir/dakika hızıyla karıştırılarak altın nanopartikül kaplı kristal üzerine immobilize edilmiştir. Tiyol modifiye olmuş DNA'ların spesifik olmayan ve yatay

şekilde bağlanmaları engellemek amacıyla, immobilize olmuş SH-ssDNA, 1 mM 6-mercapto-1-hexanol sulu çözeltisinde normal oda koşullarında tutulmuştur. Hibridizasyon DNA'ların erime sıcaklığında (55°C) gerçekleştirilmiştir. Bunun doğrultusunda ssDNA ve kristal üzerine immobilize olan SH-DNA 55°C' de TE -1M NaCl (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) tamponunda ısıtılıp sonra DNA'lar soğutularak oda sıcaklığında bekletilip böylece hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon aşamasının başarılı olması, tasarlanmış olan DNA sensörünün tamamlanması anlamına gelmektedir

**Anahtar Kelimeler:** Altın nanopartikül, indirgenme sentez metodu, kuartz kristal, altın nanopartikül immobilizasyon, DNA biyosensör

Danışman: Doç. Dr. Hakan Ayhan, Hacettepe üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü.

# **ALTIN NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE KUARTZ KRİSTAL MİKROBALANS SİSTEMİNDE KULLANIMI**

## **PRODUCTION OF GOLD NANOPARTICLE AND IT'S APPLAY IN QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE SYSTEM**

**AMİR PARVİZ FARSHCHİ TABRİZİ**

Hacettepe University, Department of Bioengineering

### **ABSTRACT**

The purpose of this study, is production of gold nanoparticles and to design the base of DNA biosensor by using these nanoparticles. In the first step of this study, gold particles were synthesized by reduction reaction using tetrachloroauric acid ( $\text{HAuCl}_4$ ) and sodium citrate. As a result of reduction, monodisperse and spherical gold nanoparticles were obtained in red wine solution. For characterization of gold nanoparticles, initial concentrations of gold salt, sodium citrate and stirring speed were changed and their effect on particle size were investigated. While optimal gold salt concentration was between 0.06 - 0.1 mM, optimal sodium citrate concentration was in the range of 0.15 - 0.50 mM. In addition, stirring rate between 400- 600rpm allowed to obtain gold nanoparticles in the desired size. Zeta sizer has been used to determine the size and size distribution of gold particles. In modification step, the surface of the quartz crystal electrodes was cleaned with NaOH, acetone and metanol solutions, respectively. After first cystamine (18mM, phosphate buffer, pH=7) immobilization was performed, the crystals were treated with glutaraldehyde (0.66 M, in sodium tetraborate/HCl, pH=8.2) and the second cystamine immobilization was performed in the same conditions with the first one. After surface modification step, gold nanoparticles were immobilized on crytsal surface in order to extend the surface area. For DNA immobilization and hybridization on crystal surface, 20  $\mu\text{M}$  thiolated ssDNA was prepared and 1 M DDT (0.1 M phosphate buffer, pH= 8.3-8.5) was added to this solution at room temperature in order to prevent disulfide bonds between thiols. After that, prepared thiolated DNA molecules were immobilized on gold nanoparticle covered crystal in 1 M phosphate buffer (pH= 6.7) with stirring at 600 rpm. For the prevention of nonspecific and horizontaly engages of thiolated ssDNA, 1 mM 6-mercapto-1-hexanol was added at room temperature. In hybridization step, immobilized

thiolated ssDNA and ssDNA were heated to 55°C (melting point of DNA) from room temperature in TE -1 M NaCl (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) buffer and cooled to room temperature. The efficiency of hybridization step is important to show the success of the designed DNA sensor.

**Keywords:** Gold nanoparticle, reduction sintesize method, quartz cryctal, gold nanoparticle immobilization, DNA biosensor

Advisor: Doç. Dr. Hakan Ayhan, Hacettepe University, Chemical Engineering Department.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	iii
TEŞEKKÜR	
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZERGELER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. TEMEL BİLGİLER.....	3
2.1. Nanoteknoloji.....	3
2.1.1. Nanopartiküller.....	4
2.1.1.1. Nanopartiküllerin üretimi.....	5
2.1.1.2. Nanopartiküllerin kullanım alanları.....	5
2.1.1.3. Nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları.....	6
2.2. Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler.....	7
2.2.1. Ölçüm için izlenen yöntem.....	9
2.2.2. Piezoelektrik Kristal Yüzey Modifikasyonu/Ligand İmmobilizasyonu.....	10
2.2.3. Piezoelektrik Kristal Yüzey Modifikasyonu/Ligand immobilizasyonu için örnek metodlar.....	10
2.2.4. Uygulamalara Örnekler.....	11
2.2.5. Piezoelektrik esaslı sistemlerin avantajları.....	12
2.2.6. Piezoelektrik esaslı sistemlerin dezavantajları.....	12
2.3. Nükleik Asitler.....	13
2.3.1. Nükleik asitlerin yapı taşları.....	16
2.3.2. DNA Molekülü.....	18

2.3.3. DNA Kaynakları	19
2.3.4. Hibridizasyon	20
<b>3. DENEYSEL YÖNTEMLER</b>	<b>23</b>
3.1. Altın Nanopartikül Sentez ve Karakterizasyonu	23
3.1.1 Altın Nanopartikül Sentezi	23
3.1.1.1. Altın Tuzu Derişiminin Nanopartikül boyutuna etkisi	24
3.1.1.2. Sodyum Sitrat Derişiminin Nanopartikül boyutuna etkisi	24
3.1.1.3. Karıştırma Hızının Nanopartikül boyutuna etkisi	25
3.1.2. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu	25
3.1.2.1. Gözleme dayalı Karakterizasyon	25
3.1.2.2. Partikül boy ve boy dağılımı tayini	25
3.2. Osilatör Devre	28
3.2.1. Yapılan deneylerde, kristal üzerinde sıcaklık etkisi	28
3.2.2. Osilatör Devrenin Tasarımı ve İmalatı	28
3.2.3. Osilatör Devresinin Çalıştırılması	31
3.3. Kuartz Kristallerin yüzey modifikasyonu	32
3.3.1. Kuartz Kristallerin yüzey aktivasyonu	33
3.3.2. Sistamin immobilizasyonu (Birinci)	34
3.3.3. Glutaraldehit (GA) immobilizasyonu	35
3.3.4. Sistamin immobilizasyonu (İkinci)	35
3.4. Altın nanopartikül immobilizasyonu	36
3.4.1. Altın Nanopartiküllerin AFM ile görüntülenmesi	37
3.5. Tek sarmal DNA immobilizasyonu	38
<b>4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMALAR</b>	<b>40</b>
4.1. Altın nanopartikül sentezlenmesi	40
4.1.1. Altın nanopartikül karakterizasyonu	40

4.1.1.1. Başlangıç altın tuz derişiminin etkisi.....	40
4.1.1.2. Sodyum sitrat derişiminin etkisi.....	43
4.1.1.3. Karıştırma hızının etkisi.....	47
4.2. Kristal yüzey modifikasyonu.....	50
4.2.1. Sıcaklık etkisi.....	50
4.2.2. Yıkama etkisi.....	52
4.2.3. Birinci Sistamin İmmobilizasyonunda Sistamin.....	53
derişiminin etkisi	
4.2.3. GA derişiminin Etkisi.....	53
4.2.4. İkinci Sistamin İmmobilizasyonunda Sistamin.....	54
derişiminin Etkisi	
4.2.5. Altın nanopartikül immobilizasyonu.....	55
4.2.5.1. Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde sürenin.....	56
etkisi	
4.2.5.2. Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde.....	56
altın tuzu derişiminin etkisi	
4.2.5.3. Değişik sodyum sitrat derişimlerinde elde.....	58
edilen Altın nanopartiküllerin immobilizasyonu	
4.2.5.4. Değişik karıştırma hızlarında elde edilen Altın.....	61
nanopartiküllerin immobilizasyonu	
4.2.6. Altın nanopartiküllerin Kristal yüzey görüntüleri.....	63
4.3. Tek sarmal DNA immobilizasyonu.....	65
4.3.1. SH-ssDNA'nın derişiminin immobilizasyon.....	65
üzerinde etkisi	
4.3.2. Fosfat tamponun derişiminin DNA immobilizasyonu.....	65
üzerinde etkisi	
4.3.3. Zaman faktörünün SH-ssDNA immobilizasyonu üzerinde.....	66

etkisi	
4.3.4. Hibridizasyon üzerinde zaman faktörünün etkisi-----	67
4.3.5. Altın nanopartikül kaplı yüzeyin DNA immobilizasyon ve-----	68
hibridizasyonu üzerinde etkisi	
5. SONUÇLAR-----	70
6. KAYNAKLAR-----	73

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1. Şematik Bir Piezoelektrik kristal.....	8
Şekil 2.2. Piezoelektrik kristallerin rezonans frekansının ölçülmesinde kullanılan tipik bir sistem	10
Şekil 2.3. DNA ve RNA'daki nükleotidler (a) Deoksiribonükleotid; ve (b) Ribonükleotid.	14
Şekil 2.4. Nükleotidlerdeki baz gurupları.....	15
Şekil 2.5. DNA'da çift sarmal yapı ve bazların eşleşmesi ile kurulan hidrojen bağ köprüleri	16
Şekil 2.6. Hibridizasyon.....	21
Şekil 3.1. Tri sodyum sitratın açık formülü.....	24
Şekil 3.2. Zeta sayıcıda uygulanan elektrik alanında, partikül üzerinde mevcut olan elektrik yüklerin şeması	27
Şekil 3.3. Deneylerde kullanılan Zeta Sayıcı.....	27
Şekil 3.4. Deneylerde kullanılan Osilatör Devresi.....	30
Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan frekans sayıcı.....	31
Şekil 3.6. Tarafımızdan tasarlanan osilatör.....	32
Şekil 3.7. Kuartz Kristal Yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi.....	34
Şekil 3.8. Kuartz Kristal Yüzeyine Sistamin İmmobilizasyonunun şematik gösterimi	34
Şekil 3.9. Sistamin immobilize kuartz kristallerin Yüzeyine GA İmmobilizasyonunun şematik gösterimi	35
Şekil 3.10. Kuartz Kristal Yüzeyine ikinci Sistamin İmmobilizasyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 3.11. Kuartz Kristal Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İmmobilizasyonunun şematik gösterimi	36
Şekil 3.12. Deneylerde kullanılan AFM Cihazı.....	37

Şekil 4.1. 23 nm boyutlarındaki partiküllerin zeta sayzer bilgileri	42
Şekil 4.2. 48 nm partiküller için verilen zeta sayzer bilgileri	42
Şekil 4.3. 80 nm partiküller için verilen zeta sayzer bilgileri	43
Şekil 4.4. Sodyum sitrat derişiminin partiküllerin boyutları üzerinde zeta sayzer bilgileri	46
Şekil 4.5. (a), (b), (c), (d) ve (e) şekilleri karıştırma hızının etkisini nanopartikül boyutları üzerinde verilen zeta sayzer bilgileri	50
Şekil 4.6. Gümüş kristal frekanslarının sıcaklıkla olam bağlantısını	51
Şekil 4.7. İmmobilizasyon üzerinde sıcaklık etkisi	51
Şekil 4.8. İmmobilizasyon süresinde sıcaklığın kristallerin frekans değişimindeki etki	52
Şekil 4.9. Birinci Sistamin İmmobilizasyonunda Sistamin derişiminin Etkisi	53
Şekil 4.10. Glutaraldehit derişiminin etkisi	54
Şekil 4.11. İkinci Sistamin İmmobilizasyonunda Sistamin derişiminin Etkisi	55
Şekil 4.12. Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde sürenin etkisi	56
Şekil 4.13. Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerindeki etkisi	57
Şekil 4.14. Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerinde zamana karşı etkisi	58
Şekil 4.15. Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerindeki etkisi	59
Şekil 4.16. Sodyum sitrat derişiminin etkisini ve frekans değişimini ilk aşamadan itibaren	60
Şekil 4.17. Değişik karıştırma hızlarında elde edilen Altın nanopartiküllerin immobilizasyonu	61

<b>Şekil 4.18. AFM görüntüleri: (a) boş bir gümüş kristal ve (b) altın</b>	<b>63</b>
<b>nanopartikül immobilize olmuş gümüş kristal</b>	
<b>Şekil 4.19. (a) ve (b) şekilleri, altın nanopatiküllerin, altın</b>	<b>64</b>
<b>elektrotlu kristal üzerinde SEM görüntüleri</b>	
<b>Şekil 4.20. SH-ssDNA'nın farklı derişimlerin kristal üzerinde</b>	<b>65</b>
<b>Şekil 4.21. Fosfat tamponunun derişiminin etkisi SH-ssDNA'nın</b>	<b>66</b>
<b>immobilizasyonu üzerinde</b>	
<b>Şekil 4.22. SH-ssDNA immobilizasyonu üzerinde immobilizasyon</b>	<b>67</b>
<b>süresinin etkisi</b>	
<b>Şekil 4.23. Hibridizasyon üzerinde zaman faktörünün etkisi</b>	<b>68</b>
<b>Şekil 4.24. DNA immobilizasyon ve hibridizasyonu üzerinde altın</b>	<b>69</b>
<b>nanopartikül immobilizasyonunun etkisi</b>	

## ÇİZELGELER DİZİNİ

### Sayfa

Çizelge 2.1. Kullanılan DNA kaynakları.....	20
Çizelge 4.1. Eklenen sabit miktarda sodyum sitrat derişimine..... karşı, farklı altın tuzu derişimlerinin partikül boyutu üzerinde etkisi	41
Çizelge 4.2. Sabit bir altın tuzu derişimi karşısında, eklenen..... farklı derişimlerde sodyum sitrat ajanının partikül boyuları üzerindeki etki	44
Çizelge 4.3. Karıştırma hızının partiküllerin boyutları üzerinde etki ----	47
Çizelge 4.4. Farklı altın tuzu derişimlerinin partikül boyutu..... üzerinde etkisi	57
Çizelge 4.5. Farklı derişimlerde sodyum sitrat ajanının partikül..... boyuları üzerindeki etkisi	59
Çizelge 4.6. Karıştırma hızının partikül boyutları üzerindeki etkisi.....	61

## **SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ**

<b>A</b>	<b>Adenin</b>
<b>C</b>	<b>Sitozin</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoksiribonükleik asit</b>
<b>G</b>	<b>Guanin</b>
<b>HSAB</b>	<b>Hard soft asid base theory</b>
<b>Hz</b>	<b>Hertz</b>
<b>nm</b>	<b>Nano metre</b>
<b>PMMA</b>	<b>Polimetilmetakrilat</b>
<b>PS</b>	<b>Polistiren</b>
<b>QCM</b>	<b>Quartz crystal microbalance</b>
<b>RNA</b> <b>ssDNA</b>	<b>Ribonükleik asit</b> <b>Single strain DNA</b>
<b>T</b>	<b>Timin</b>

## **1. GİRİŞ VE ARAŞTIRMANIN AMACI**

Nanoteknoloji, Bilim ve Teknolojideki yeni hedeflerin en önemlilerinden biridir. Nanoteknoloji, boyutları 100 nm ve daha küçük olan yapıların oluşturulması ve bu şekilde özellikleri önemli derecede değişebilen çeşitli materyallerin sentezlenmesini sağlar. Bu materyaller ile değişik uygulamalar için daha üstün özelliklere sahip malzemeler yapılabilir. Nanomühendislik (Wiley, 1992), nanoelektronik (DeSilva, A.P.1993) ve nanobiyoelektronik (Göpel, W.1998) v.b. disiplinlerin ortaya çıkması, bu disiplinler için uygun boyut ve fonksiyonel blok yapılarının sentezlenmesini gerektirir. Bu ihtiyaç süper moleküller (Lehn, J.M. 1995), biyomoleküller (Nemeyer, C.M. 1997) ve dendrimer (Matthews, O.A.1998) kimyasının, maddenin angström ve nano boyutlarındaki özelliklerinin geliştirilmesine cesaret vermiştir. Kolloitler ve küme bilimleri dünyası bu konuda meydan okumaya başlamış, nano boyutlarında partiküller yaratılıp organize edilmiştir (Weinheim, 1994). Bu partiküllerin bir çoğu daha önceden de tanınmaktadır. Fakat partiküllerin karakterizasyonları için gereken araçların geliştirilmesi ile nanopartikül ve nanokristal malzemeler için yeni disiplinlerin kapılarını açmıştır. Nanopartiküller sadece yapısal özellikleri ile değil fonksiyonel özellikleri ile de üstün malzemelerdir. Çeşitli yöntemler kullanarak yığın özelliklerinin yanında fonksiyonel özelliklerinin değiştirilmesi sağlanabilir. Nanopartiküllerin elektronik (Khairutdinov, R.F. 1997), optik (Mulvaney, P. 1996) ve katalitik (Lewis, L.N. 1993) özellikleri, onların kuantum (Alivisatos, A.P. 1996) seviyesindeki boyutlarından kaynaklanmaktadır.

Nano boyutlu partiküller, yüksek yüzey alanları, farklı optik ve elektronik özelliklere sahip olduklarından dolayı modern teknolojik sistemlerde kullanılabilirliklerinin araştırılması önem kazanmıştır.

Çok farklı uygulamalar için polimerik PS, PMMA, v.b. (Fu-Ken Liu, 2002) inorganik PbS, Ag<sub>2</sub>S, CdSe, TiO<sub>2</sub>, v.b. (Meldurum, F.C. 1997) ve metalik Au, Ag, v.b. (Link, S. 1999) nanopartiküller üretilmiştir. Bu partiküller, mikroemülsiyon, ters-misel oluşumu, elektrodepozisyon v.b. iyi tanımlanmış çok basit sistemlerde üretilebilmektedir. Bu partiküller çeşitli substrat yüzeylere metalik Au, Al, cam, silika, v.b. (Krisanu Bandyopadhyay, 1997) farklı fiziksel, kimyasal veya kendiliğinden yerleşme yöntemleriyle ile nano

düzenli yapılar oluşturmak üzere yerleştirilebilmektedir. Metal nanopartiküller arasındaki yüzey modifiye edilebilmektedir. Bunların içinde modifikasyon için en uygun olan altın nanopartiküllerdir.

QCM sensörler son yıllarda artan bir hızla kullanılmaktadır. Bunun nedeni sistemin çok ucuz ve taşınabilir olmasıdır. Burada farklı metalik elektrodu (Au, Al, vb.) olan kuartz kristaller kullanılır (Shubo Han, 2001). Bu kristallerin piezoelektrik özelliği vardır. Kristal üzerindeki kütle birikimi kristalin salınım frekansını değiştirir ve bu kayma frekansı yardımıyla yüzey üzerindeki kütle kantitatif olarak ölçülür (Shuichiro Yamaguchi ve Takeshi Shimomura, 1993). QCM sistemlerinde kristal yüzeyine biyolojik moleküller (ssDNA, antibadiler, vb.) ligand olarak bağlanarak hedef eşlenik biyolojik moleküllerin tayin edildiği biyosensörler geliştirilmektedir. Yüzey alanı sınırlaması olduğu için ölçülen frekans kayması düşüktür ve hataya neden olmaktadır (Xi Chun Zhou, 2000). Sunulan çalışmada altın (Au) nanopartiküllerin üretimi ve bunların kuartz kristal yüzeylere tek tabaka oluşturacak şekilde yerleştirilmesi ile genişletilmiş yüzey alanına sahip QCM sistemleri oluşturulmuş, bu QCM sistemini kullanarak bir nükleik asit sensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır (Shubo Han, et al, 2001).

## 2. TEMEL BİLGİLER

### 2.1. Nanoteknoloji

Günümüzde birçok sektörde devrim niteliğinde bir potansiyele sahip olan ve heyecan verici bir hızla gelişen Nanoteknoloji genel bir ifadeyle, çeşitli araçların, malzemelerin ve yapıların moleküler düzeyde işlenmesi, düzenlenmesi ve yaratılması olarak tanımlanmaktadır. İçinde bulunduğumuz doğa, tüm tarihi boyunca sayısız nanoteknolojik harikalar yaratmıştır. Bugün bilim adamları doğada var olan bu nano-ölçekteki olguları ve yöntemleri öğrenmeye ve kendi kendini çoğaltabilen, denetleyebilen, kontrol edebilen, onarabilen araçlar, malzemeler ve yapılar oluşturmaya çalışmaktadırlar. Nano birimi ile aslında 100 - 0.1 nanometre (nm) ( $10 \times 10^{-6}$  metre ile  $10 \times 10^{-9}$  metre) arasındaki herhangi bir büyüklük ifade edilmektedir. Karşılaştırabilmek amacıyla örnek vermek gerekirse; görünür ışığın dalga boyu 400 ile 700 nm arasında değişmektedir.

Nanoteknoloji, diğer bir deyişle moleküler nanoteknoloji veya moleküler üretim, gerçekte ayrı bir teknoloji alanı olmayıp, mevcut teknolojilerin doğmasına olanak sağlayan günümüz teknolojisinin çok küçük boyutlarda (mm'nin milyonda biri) çalışmasını ifade eden fantazi bir kavram gibi görünmektedir. Bir üretimin, şekillendirmenin, sentezin ilk başlangıç anında neler olup bittiğini ve bu aşamadaki mekanizmaları çözme veya bunları kullanarak işlem yapma anlamını da içerir. Tüm bu işlemleri gerçekleştirebilecek makine parkı, cihazlar, enstrümantasyon geliştikçe nanoteknoloji de yol alınmış olacaktır. Yani aslında gelişen nano boyutta analiz ve sentez yapabilen cihazlar olmuştur.

Nanomühendislik, nanoelektronik ve nanobiyoelektronik düzenlemelerin ortaya çıkmasının, sabit boyut ve fonksiyonel blok yapıların üretimi için yapı ve malzemelere ihtiyaç olması, nanoteknolojinin ortaya çıktığını bize daha çok hissettirmiştir. Bu ihtiyaç süper moleküller, biyomoleküller ve dendrimer kimyası, maddelerin angström ve nano boyutlarda mühendislik bu teknolojinin gelişmesine cesaret vermiştir (Matthews, O.A. 1998).

Bu teknolojiyle ilgili çeşitli uygulamalar (sensör, fotoelektrokimyasal, vb) mevcuttur. Yüksek yüzey alanlar, farklı optik ve elektrik özelliklerine sahiplerdir (Alivisatos, A.P. 1996). Mikron boyutlarındaki çalışmaların nano boyutlara taşınabilmesi imkanı olduğundan artık mikron boyutlarında yaptığımız çalışmalarını nano seviyesinde de deneyebilme olanağı bulunmaktadır.

Nanopartikül ve nanokristal malzemelerin sahip oldukları değişik özelliklerden dolayı yaygın kullanım alanına sahiptir ve çeşitli fonksiyonlar kazandırabilmeleri (bir çok madde ile şekillenme, fonksiyonel yığın maddeler oluşturulması) de bir başka özelliği olarak kabul edilmektedir

Mikroskoplarda, malzeme biliminde, moleküler seviyede konum kontrolünde ve kuantum mekaniğinin klasik ve modern sınırları arasındaki farkı anlamada elde edilen gelişmeler ciddi kazanımlar getirmiştir. Ana hedef bu sayede çok hafif, yüksek mukavemetli, akıllı(!), ucuz ve temiz malzemeler elde etmektir. Şu ana kadar organik nikelde biyomoleküler motor yapılabilmiş, özellikle elektronik sistemlere yönelik tek moleküllü transistör yapılmış, nanopartiküller oluşturulabilip bunlar kan vasıtası ile beyine kemoterapi amacı ile taşınabilmiş. Oluşturulan altın nanopartiküller sayesinde biyolojik savaşın en kritik kısmı olan DNA tespiti gerçekleştirilmiş, moleküler kısıkaçlar yapılmış ve karbon nanotüpler den (geleceğimizin en stratejik malzemesi olmaya aday) lojik kapılar elde edilebilmiştir.

### **2.1.1. Nanopartiküller**

Yüzey üzerine dizilmiş nanopartikül yapıları, son on yıl içerisinde daha fazla ilgiyi üzerine çekmiştir. Bununla birlikte blok yapıların çeşitliliği, raporlanmış tasarımlar ve yapılandırma teknikleri etkileyicidir. Bu araştırmalar kolloitlerin sentezlemesine ve yeni maddeler ve yeni yüzey fonksiyonlarına dayanmaktadır. İki boyutlu kolloit dizilerinin yapısı çok iyi şekilde çalışılmıştır. Bu iki boyutlu kolloitlerden yola çıkarak çok kompleks üç boyutlu sistemlere ve kümeleşmiş dizimlerin sentezleme metotlarına varılmaktadır.

Bir çok kolloit nanopartiküllerin sentezleme metotları bilinmesine rağmen, son zamanlarda çalışmalar özel nanopartiküller, nanomalzemeler ve nanoyapılar imal etmek için odaklanmıştır. Bu partiküllerin bir özel maddeden veya özel bir boyuttan veya özel bir yüzey fonksiyonundan oluşması mümkündür. Hatta burada nanopartiküllerin biçimlenmesi için tasarlanan birkaç kontrol derecesinden söz edilebilir. Nanopartiküller oldukça kararsızdırlar bu yüzden agregat oluşturmalarını ve çözelti içinde çökmelerini engellemek için özel önlemler alınır. Cam örtü, ayıraç çözeltiler ve çözücüler yüksek saflıkta ve filtre oldukları zaman esaslı olarak temizlenirler. Tüm nanopartiküllerin sentezleme işlemleri bir de stabilizör ajanların kullanılmasını kapsamaktadır. Stabilizör ajanlar partiküllerin yüzeyleriyle ilişkide olup ve nanopartiküller süspansiyon halindeyken onların yük veya kararlılık özelliklerini koruyup ve partiküllerin agregat olmaları engellemektedir (Amihood Doron, 1995).

Kolloit nanopartiküllerin sentezlenmesi için bilinen birkaç yöntem vardır:

- Kolloit metallerin indirgenme sentezi
- Yarı geçirgen nanopartiküllerin sentezi
- Daha küçük nanopartiküllerin gaz fazı içerisinde veya güçlü lazer pulsarı ile oluşturulmaktadır ama bazıları asitle oyulup, elektrodepozite veya direkt olarak yüzey üzerinde sentezlenip veya Langmuir-Blodgett'in kendiliğinden yerleşme tabakalarıyla oluşturulmaktadır ( Andrew N. Shipway, 2000).

### 2.1.1.1. Nanopartiküllerin kullanım alanları

Nanopartiküller aşağıda belirtilen bir çok alanda uygulama şansı bulmuştur:

**Mikro-Akışkan Bilimi:** Nanoteknolojik gelişmeler sayesinde mikro/nano düzeydeki akışkan özelliklerine göre yararlanabilme yolunda çalışmalar da nanoteknoloji kapsamında değerlendirilmektedir. Gelecekte, akışkanların nano düzeydeki özelliklerine bağlı olarak hastalıkların teşhisi, ilaç etkileşimlerinin belirlenmesi, DNA manipülasyonu ve işlenmesi, vücuda alınan gıda maddeleri ve sıvıların izlenmesi, bitki ve hayvanlarda sağlık takibi, çevresel izleme ve denetleme vb. uygulamalar mümkün olabilecektir.

**Biyomikroelektromekanik– Bionanoelektromekanik ve Biyoçipler:** Son yıllarda mikroelektromekanik (MEM) sistemlerde oldukça önemli aşamalar kaydedilmiştir. Halihazırda, mikro düzeyde tam-fonksiyonel pompalar, motorlar, duyargalar, vb. elektro mekanik sistemler kullanılabilmekte, posta pulundan daha küçük boyuttaki biyoçiplerin üretimi mümkün olabilmektedir. Günümüzde bu sistemlerin mikro düzeyden (MEM) nano düzeye (NEM) geçişinde ve bunların biyolojik sistemlerle kaynaştırılmasında devrim niteliğinde bilimsel aşamalar beklenmektedir.

**Nükleik Asit Biyomühendisliği:** DNA moleküllerinin yapı blokları olarak kullanılması suretiyle nanokablo ve nanomembran benzeri yapıların geliştirilmesi ve özellikle tarım ve gıda mühendisliğinde sayısız uygulama alanlarının bulunacağı öngörülmektedir.

**Akıllı Taşıyıcı Sistemler:** Moleküler ölçekte kodlanmış paketlerin kendilerine tanımlanan adres uyarınca vücudun ilgili bölgesine ulaştırılmasına imkan verecektir.

**Nano-Biyoproses:** Biyolojik malzemedan doğal biyolojik proseslerin kullanımıyla istenilen birleşimlerin elde edilmesi olarak tanımlanan biyoproses, nanoteknoloji sayesinde çok daha yüksek bir etkinlikte gerçekleştirilebilecektir. Moleküler problemlerin kullanımı, biyolojik malzemedeki mikropların çok daha hızlı bir şekilde tanımlanabilmesini sağlayacak olan kitler örnek olarak verilebilir.

**Biyoanalitik Nanosensörler:** Nano ölçekte duyarlılar yardımıyla, tarım ve gıda sistemlerindeki çok düşük miktarlarda olsa dahi kimyasal kontaminasyonun, patojenlerin veya virüs partiküllerinin tespit edilmesi mümkün olacaktır. Gıda maddelerinin ambalajlanmasında kullanılacak bu sistemler sayesinde gıda ürünlerinin mikrobiyal kontaminasyonunun önceden tespiti ve kendi kendini koruma mekanizmaları yardımıyla önlenmesi ve böylece gerek depolama gerekse dağıtımda oldukça önemli kolaylıklar ve tasarruflar sağlanabilecektir.

**Nanomalzeme:** Gerek nanoteknoloji sayesinde yeni bir malzeme buluşuyla gerekse doğada var olan bazı malzemelerin (örneğin topraktaki nanopartiküller, kil, zeolit, imogolit) kullanılması suretiyle nano ölçekte farklı özellikler gösteren kompozit malzemelerin kullanımı mümkün olabilecektir. Bunlar arasında saydamlık, azalan ağırlık, artan dayanım özelliklerini gösteren malzemeler, giyenin sağlık ve fiziki durumu hakkında uyarılar veren akıllı kumaşlar örnek olarak verilebilir. Tarımsal materyalin faydalı ürünlere dönüştürülmesi ve bu sayede çevrenin korunumu nanoteknolojinin gelişiminde önemli ve heyecan verici bir potansiyel alan olarak görülmektedir. Günümüzde özellikle bitkisel yağların biyoyakıtlara ve endüstriyel çözeltilere dönüştürülebilmesinde ihtiyaç duyulacak nano-katalizörlerin geliştirilmesi ve tasarımı konusunda ciddi çalışmalar yapılmaktadır.

**Biyoselektif Yüzeyle:** Çeşitli kimyasal ve biyolojik etkileşimlerin meydana geldiği yüzeyler üzerinde çeşitli organizmaların veya moleküllerin tutunabilmesi veya bağlanabilmesini sağlayan seçici yüzeyler olarak tanımlanan biyoselektif yüzeylerdeki gelişmeler, biyosensörlerin, detektörlerin, katalizörlerin gelişimi ve biyomoleküllerin ayrıştırılması veya pürifikasyonuna yönelik gelişmelere bağlıdır.

### **2.1.1.2. Nanopartiküllerin avantaj ve dezavantajları**

Bilindiği gibi canlı ve cansız tüm varlıklar atomlardan oluşmuştur ve özelliklerini bu atomların dizilişlerinden almaktadırlar. Örneğin, eğer kömür atomlarının sıralanışı değiştirebilseydi elmas elde edilebilirdi. Günümüzde moleküler düzeyde üretim yöntemleri açısından önemli ölçüde geri sayılabilecek bir konumda bulunduğumuz söylenebilir. Kısaca, atomları çok büyük yığınlar halinde ancak hareket ettirebilmekteyiz. Bu ise Merkle (1999)'nin benzetimine göre, ellerimizde boks eldivenleriyle lego'lardan bir şeyler üretmeye çalışmaya benzemektedir. Belki lego bloklarını büyük yığınlar haline getirebiliriz ancak onları istediğimiz düzende birleştiremez ve oluşturmak istediğimiz parçaları elde edemeyiz. Gelecekte, nanoteknoloji, bize bu eldivenleri çıkarma olanağı tanıyacaktır. Doğanın temel yapıtaşlarını kolayca, ucuz bir biçimde ve istediğimiz hemen her şekilde

düzenleyebilme imkânı bulunacaktır. Böylece yeni nesil ürünlerin doğaya daha az zarar vererek üretilebilmesi ve bunların aynı zamanda daha dayanıklı, daha hafif ve daha hassas özelliklerle donatılmış olması mümkün olacaktır (Merkle, 1999).

## 2.2. Piezoelektrik Kristalli Biyosensörler

Piezoelektrik etki ilk kez 1880 yılında Jaques ve Pierre Curie tarafından gözlenmiştir. Bazı kristallerin yüzeylerine mekanik kuvvet(gerilim) uygulandığında kristal yüzeyleri arasında, uygulanan bu gerilimin şiddeti ile doğru orantılı olarak artan bir elektriksel potansiyel farkı oluşur. Bu etki, Latince bastırmak (“push”) anlamına gelen “piezein” sözcüğünden türetilmiş olan “piezoelektrik etki” olarak adlandırılmıştır. Sonraki yıllarda bu adlandırmanın çok doğru olmadığı, elektrik potansiyel farkının oluşmasının uygulanan mekanik gerilimin direkt sonucu değil, bu gerilimin ortaya çıkarttığı kristaldeki boyut değişimi ile ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Curie kardeşler sonraki yıllarda yaptıkları çalışmalarda, piezoelektrik kristalinin iki yüzeyi arasına uygulanan elektriksel gerilim farkının kristallerde boyut değiştirmeye, gerinime (“strain”) yol açtığını göstermişlerdir. Başka bir ifadeyle, “ters piezoelektrik etki” olarak bilinen bu etkiyi kullanarak, kristal yüzeyleri arasına uygulanan elektriksel gerilimin şiddetini değiştirerek piezoelektrik kristalin boyutlarını bununla orantılı olarak değiştirmek mümkün olmaktadır.

Kristallerde vibrasyon söz konusudur. Vibrasyon kristal içindeki atomların belli bir zaman içinde orijinal konumlarından deforme olmuş konuma geçmeleri, buradan yine orijinal konuma dönmeleri ve bunu izleyen devrede tersi yönde deforme konuma geçmeleri ve yine orijinal konuma dönmeleri şeklinde devam eden sürekli aynı şekilde tekrarlanan bir davranışı ifade etmektedir. Bu döngülerin birim zamanda tekrarlanma sayısı kristalin rezonans (temel) frekansı olarak tanımlanır. Piezoelektrik kristallerde pozitif ve negatif yüklü iyonlar vardır. Vibrasyon sonucu yük dağılımı değişir, başka bir ifadeyle polarizasyon oluşur. Dolayısıyla bu salınım frekansına karşı salınan elektrik alan oluşumu söz konusudur. Elektrik alan salınım frekansı rezonans frekansı ile aynıdır (Shuichiro Yamagochi ve Takeshi Shimomura, 1993).

Aralarında kuartz, Rochelle tuzu ( $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ), turmalin, amonyum dihidrojen fosfat, etilen diamin tartarat ve baryum titanatin bulunduğu birçok kristal piezoelektrik özellik gösterir. Pratikte en yaygın olarak kullanılan piezoelektrik kristal kuartzdır. Doğal olarak bulunduğu gibi sentetik olarak da üretilebilen tamamen okside olmuş bir kristalin bileşiktir (silisyum dioksit). Suda çözünmez ve 579°C'e kadar sıcaklığa dayanıklıdır.



$$f = \rho q \cdot N \cdot A / m$$

Eğer kristal elektrotlardan birinin yüzeyine  $\Delta m$  kadar kütle ilave edilirse bu bir frekans kaymasına ( $\Delta f$ ) neden olur, ki bu da aşağıdaki gibi ifade edilebilir.

$$\Delta f = -(f^2 / \rho q \cdot N \cdot A) (\Delta m / 1 + \Delta m / m)$$

Bu ifade, kuartz kristaller için, ilgili sabitler yerine konulursa şu şekli alır:

$$\Delta f = -2.26 \times 10^6 f^2 \Delta m / A$$

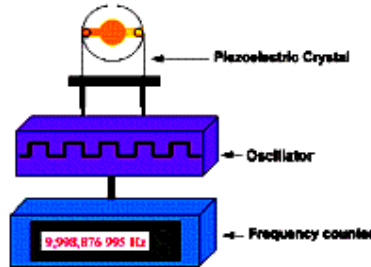
kristal üzerine ilave edilen kütle ( $\Delta m$ ), kristalin salınım frekansında kaymaya neden olur ( $\Delta f$ ), ki bu kayma ölçülebilirse kütle artışı yukarıdaki basit ifadeyle hesaplanabilir. Bu denklik ilk kez Sauerbery tarafından türetilmiş olup onun adıyla anılmaktadır.

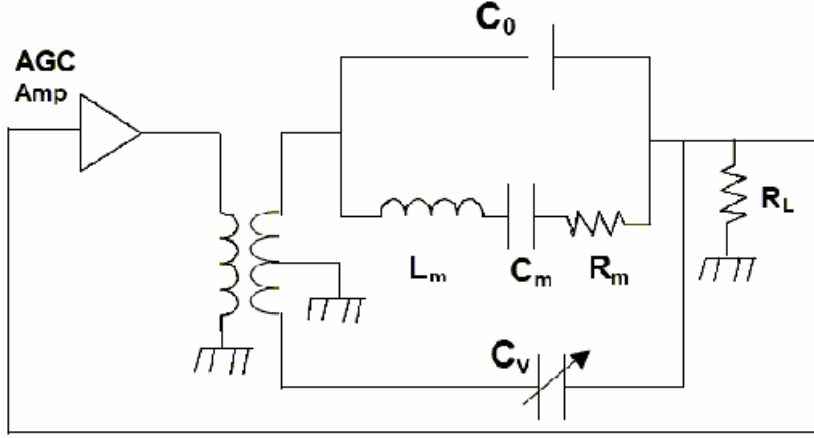
Piezoelektrik kristallerin rezonans frekansının ölçülmesi için ticari olarak mevcut salınım ölçerler kullanılır. Pratik olarak kullanılan sistemlerde 2 salınım devresi yer alır. Her iki devreye de takılı olan kristal benzer özelliklerdedir. Ancak birinin (ölçüm kristali) sensör olarak kullanılmak üzere yüzey modifikasyonu yapılmış (ligand takılmış) diğerine (referans kristal) ise hiçbir işlem uygulanmamıştır. Bu ikinci devre sıcaklık ve nem etkilerini ve ölçülecek madde dışında ortamda bulunan diğer maddelerin kristal ile spesifik olmayan etkileşimi sonunda ortaya çıkacak girişimlerini en aza indirmek amacıyla kullanılmaktadır.

### 2.2.1. Ölçüm için izlenen yöntem

Test ve referans kristalleri arasındaki frekans farkı ölçülür ( $\Delta F1$ ). Daha sonra immobilize ligand moleküllerini taşıyan test kristali tayin edilecek maddenin (anilat) bulunduğu çözeltiliye batırılır ve ligand-anilat etkileşmesi sağlanır. Kristal havada kurutulur ve tekrar iki kristal arasındaki frekans kayması ölçülür ( $\Delta F2$ ) (Şekil 2.2). Hesaplanan frekans kaymasından daha önce çıkartılmış olan çalışma eğrisi kullanılarak tayin gerçekleştirilir.

$$(\Delta F = \Delta F2 - \Delta F1)$$





Şekil 2.2. Piezoelektrik kristallerin rezonans frekansının ölçülmesinde kullanılan tipik bir sistem.

AT-kesimli kristallerde sıcaklık sabiti düşük olmasına karşın, ölçümlerde sıcaklık kontrolünün yapılması yararlıdır. Ayrıca, birçok ligand, az veya çok su absorplama kabiliyetine sahip oldukları için, bunun da ölçüm hassasiyeti azaltacağı görüşüyle ölçümlerin nem kontrolünün yapıldığı ortamlarda gerçekleştirilmesinin ve özellikle kurutma basamağının dikkatli yapılması gerektiği vurgulanmalıdır.

### 2.2.2. Piezoelektrik Kristal Yüzey Modifikasyonu/Ligand İmmobilizasyonu

Kristal yüzeyi bir polimerik tabaka ile kaplanır. Kaplama kristalin polimer çözeltisine (polimer için iyi bir çözücü, konsantrasyon 2-5%) batırılması ("dip coating"), daha sonra polimer çözeltisi taşıyan kristalin kontrollu kurutulması ile gerçekleşir. Bu amaçla kullanılmış polimerlere örnek olarak polietilenimin,  $\gamma$ -aminopropiltrioksolan, polibutilmetakrilat, poli(2-hidroksi-3-dimetilamino-1,4-butan) verilebilir. Ligand immobilizasyonu genellikle glutaraldehiti çapraz bağlayıcı kullanılarak kristal yüzeyinde oluşturulan amin grupları ve ligand üzerindeki amin grupları arasında kurulan köprülerle gerçekleştirilmektedir (Xi Chun Zhou, 2000).

### 2.2.3. Piezoelektrik Kristal Yüzey Modifikasyonu/Ligand İmmobilizasyonu için örnek metotlar

Piezoelektrik kristallerinin biyosensor olarak kullanılmaları için yüzeylerinin modifiye edilmesi, başka bir ifadeyle ortamda bulunan ölçülecek madde (anilat) ile spesifik olarak etkileşecek biyoaktif ajanın (ligand) kristal yüzeyine immobilize edilmesi gerekir.

- Bu amaçla kullanılmış polimerlere örnek olarak polietilenimin,  $\gamma$ -aminopropil trioksolan, polibutilmetakrilat, poli (2-hidroksi-3-dimetilamino-1,4-butan) verilebilir

- Piezoelektrik kristal yüzeylerine ligand immobilizasyonu için uygulanmış alternatif bir yöntemde akrilamid, *N,N'*-metilen-bisakrilamid, potasyum persülfat ve ligand içeren çözelti kristal yüzeyine konmuş ve polimerizasyon (jel oluşumu şeklinde) ve ligand immobilizasyonu aynı anda gerçekleştirilmiştir. Bu yaklaşımla hazırlanan kristallerde jel içi diffüzyon kısıtlamalarının olduğu not edilmelidir.
- Piezoelektrik kristal yüzeylerinin plazma polimerizasyonu veya elektropolimerizasyon ile çok ince bir polimerik filmle kaplanması ve bu yöntemle oluşturulan fonksiyonel gruplar üzerinden ligand immobilizasyonunun gerçekleştirilmesi son yıllarda uygulanan alternatif tekniklerdir.
- Ligand moleküllerinin immobilize edildiği taşıyıcı tabakanın kristal yüzeyi ile entegrasyonudur. Bu tabaka yüzeye yalnızca fiziksel kuvvetlerle tutturulduğu için kararlı olmayabilir, hatta birkaç kez kullanımdan sonra yüzeyden kolaylıkla sıyrılabilir.
- Dikkat çekilmesi gereken ikinci önemli nokta ligand immobilizasyonu sırasında, ligand moleküllerinin aktif uçlarının kristal yüzeyinden dışarı bakmasıdır, böylece anilat molekülleri ile spesifik olarak, yeteri kadar hızlı etkileşmesinin sağlayacak şekilde gerçekleştirilmesidir. Uzatma kolu kullanılarak immobilizasyonun gerçekleştirilmesi, ligand-anilat etkileşmesinde ortaya çıkabilecek sterik engellemeleri ortadan kaldıracığı için önerilen bir yaklaşımdır.
- Yüzeye çok fazla miktarda ligand takılmasının yine sterik engelleme yaratacağı, az olması durumunda ise (özellikle anilat moleküllerinin küçük olması durumunda) kristal rezonans frekansında yaratacağı kaymanın hassas olarak ölçülemeyeceği not edilmelidir.

#### 2.2.4. Uygulamalara Örnekler

- Günümüzde birçok uygulamada kristallerin piezoelektrik özelliğinden yararlanılmaktadır. Piezoelektrik kristaller, çakmaktarda, saatlerde, mikroskoplarda, yüksek frekansta ses üretimi için ultrasonik aygıtlarda, roketlerde ateşleme sistemlerinde, ses aktarımı ve algılanmasında (sonarlarda) yarı iletken ve entegre devre teknolojilerinde, hassas termometrelerde, ve günlük hayatımızda kullandığımız daha birçok cihazda yaygın olarak kullanılmaktadır.
- Piezoelektrik özelliğin sensör teknolojisinde kullanımı gaz faz ölçümleriyle başlamıştır. Havada bulunan çeşitli gazların(hidrojen sülfür, kükürt dioksit, amonyak, hidrojen klorür, fosgen, vb.), organofosfor bileşiklerinin (örneğin pestisitlerin), aromatik hidrokarbonların ölçülmesi için piezoelektrik kristalli sensörler(mikrobalans sistemleri) geliştirilmiştir. Piezoelektrik kristallerin sulu fazda

da özellikle çok düşük konsantrasyonlarda bulunan ("trace") iyonların tayininde, ve suyun toplam tuz miktarının bulunmasında kullanımı ile ilgili birçok rapor vardır.

İlk örnek Shons ve arkadaşlarının çalışmalarıdır. Burada kristaller Nyebar C adıyla verilen ticari polimer ile kaplanmış, bu yüzeye albumin hidrofobik etkileşme ile fiziksel olarak immobilize edilmiştir. Immobilize albumin (ligand) taşıyan kristallerin anti-albumin antibadi (anilat) bulunan çözeltilerle etkileştirilerek immunkompleksin oluşması izlenmiştir. Bu ölçümün pasif aglünitasyon testine göre (saatler süren) piezoelektrik kristaller kullanıldığında çok daha kısa sürede (birkaç dakikada) gerçekleştirilmesi vurgulanması gereken en önemli husustur.

*Anti-Candida* antibadileri taşıyan okside edilmiş palladyum esaslı aminosilan kaplı kristaller *Candida albicans* tayininde kullanılmıştır.

Polietilenimin kaplı kristallere takılan anti-*Salmonella*, *Salmonella tyhimurium* tayininde başarıyla kullanılmıştır.

Protein-A veya polietilenimin kaplı yüzeylere anti-insan transferini immobilize edilmiş ve  $10^{-4}$ - $10^{-1}$  mg/ml aralığında transferin konsantrasyonu tayini gerçekleştirilmiştir. Antibadi alt gruplarının (IgA, IgE, ve IgM) piezoelektrik kristaller kullanılarak tayini Rice tarafından patentlenmiştir.

### 2.2.5. Piezoelektrik esaslı sistemlerin avantajları

- Hem sıvı hem de gaz fazda uygulanabilen sistemlerdir.
- Sensörün tanıyıcı bölümü küçük ve ucuz (tanesi birkaç ABD Doları) bir kristalden ibarettir.
- Kolaylıkla akış sistemlerine monte edilebilir.
- Sensörün diğer bölümleri bağıl olarak ucuz ve taşınabilir boyuttadır. Önceki bölümlerde örneklendiği gibi birçok ligand immobilize edilip sayısız anilat tayini yapılabilir.

### 2.2.6. Piezoelektrik esaslı sistemlerin dezavantajları

- Kütle değişimi ile frekans kayması arasındaki ilişkiler, özellikle sıvı ortamlarada arayüzey ve bunun değişimi ile ilgili parametrelerin kristal frekansındaki etkileri teorik olarak açıklanabilme ve yaygın olarak kullanılan Saurbery denkliği modifiye edilmesi gerekmektedir.
- Kristal yüzeyinin aktivasyonu ve ligand immobilizasyonu basamaklarında yeni yaklaşımlar geliştirilmelidir.
- Küçük boyutlu kristal üzerinde özellikle düşük konsantrasyonlarda önemli bir gerinime sahip olmayan anilatların tayini için yeni öneriler yapılmalıdır.

- Sıcaklık ve nem duyarlılığını dolayısıyla daha basit ölçüm sisteminde daha duyarlı ölçüm yapabilme imkanları araştırılmalıdır.

## 2.3. Nükleik Asitler

Nükleik asitler vücut ağırlığının yalnızca % 2'sini oluşturmalarına karşın genetik bilginin saklanması; replikasyonu (çoğaltılması); rekombinasyonu (genetik çeşitliliği); transmisyonu (aktarılması) işlevlerinin yerine gelmesini sağlarlar. Kısaca, yaşayan hücrenin/canlıların ne olduğunu ve ne yapacağını yapılarında taşıyan ve belirleyen moleküllerdir. Bu nedenle, kimyasal yapılarını, biyokimyasal yapılarını/moleküler biyoloji ve metodolojilerini bilmek çok önemlidir. Nükleik asitleri şu iki grupta incelemek mümkündür: (i) deoksiribonükleik asit (DNA) ve (ii) ribonükleik asit (RNA) (Şekil 2.3).

Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile oluşur. Nükleik asitler ilk kez, hücre çekirdeğinden izole edildikleri için bu ismi almalarına karşın: hem DNA, hem RNA hücrenin başka kısımlarında da bulunmuşlardır. Büyüklükleri geniş bir spektruma yayılır. RNA bilinen en küçük nükleik asit molekülüdür. Moleküler ağırlığı 25.000 daltondur. Bütün atom ve moleküllerde olduğu gibi DNA/RNA'nın da ağırlıkları DALTON birimi ile verilir. Bir Dalton, bir Hidrojen atomunun ağırlığına eşittir. Bir Dalton,  $1.67 \times 10^{-24}$  g'a eşit olup buna avogadro sayısı denir.

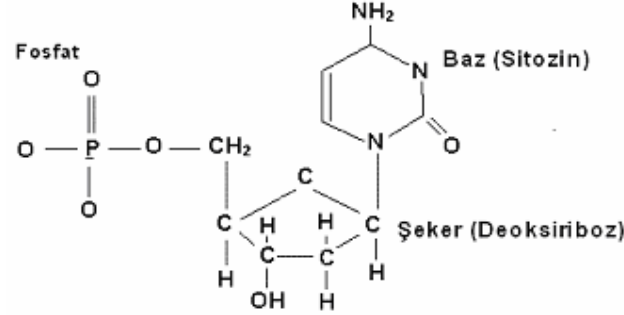
DNA molekülleri değişik sıralarda tekrarlanan alt birimlerden makromoleküllerdir(biyopolimerlerdir), ve bu dizimlerin (kodların) farklı olması farklı genetik bilgiye karşılık gelir. RNA molekülleri ise DNA üzerindeki bilgiyi okuyarak amino asitlerin farklı dizimlerde birleşmesi ve polipeptitlerin sentezini sağlar.

Doğrusal yapıdaki nükleik asit biyopolimerlerinde tekrarlanan birimler "nükleotid" olarak adlandırılır. Şekil 2.3'de DNA ve RNA'nın nükleotidlerine örnekler verilmiştir. Görüldüğü gibi bir nükleotid'de şu üç temel grup bulunur: (i) fosfat; (ii) şeker gurubu ve (iii) baz gurubu. Şeker gurubu DNA'da deoksiriboz, RNA' da ise ribozdur.

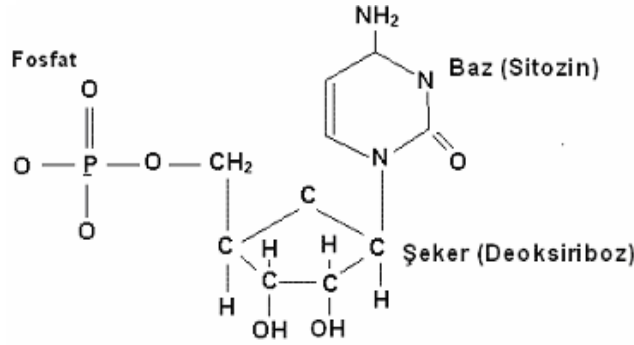
Bir nükleotid fosfat gurubu ile bir başkasının şeker gurubu birleşerek nükleotid asit polimerik zinciri oluşturur. Şekil 2.4'de görüldüğü gibi baz gurubu 5 farklı yapıdadır. Bunlardan adenin (A), guanin (G) ve sitozin (C) hem de RNA' da bulunurken, timin (T) yalnızca DNA, urasil (U) ise yalnızca RNA' da vardır. Çift halka içeren adenin ve guanin "purin" bazları, tek halka içeren diğerleri ise "pirimidin" bazları olarak adlandırılır(Şekil 2.4).

DNA molekülleri ikisi bir arada "çift sarmal" şeklinde bulunur (Şekil 2.5). DNA molekülü iki nükleotid zincirinin saat yönünde sarmal yapmasıyla oluşur. Her bir

turda 10 nükleotid bulunur. Nükleotidler, 5'-3' fosfodiester bağları ile polinükleotid zincirlere polimerize olmaktadır. Bu bağlar komşu deoksiriboz üniteleri ile olur. Intakt insan kromozomlarında, bu polinükleotid zincirleri (çift sarmal hal) ile milyonlarca nükleotid uzunluğuna ulaşırlar. DNA'nın anatomik yapısı kimyasal bilgiyi taşıyarak ana hücreden yenisine tüm genetik bilginin geçişini sağlamaktadır. Aynı zamanda DNA'nın primer yapısı, proteinleri oluşturan amino asit dizilerini de belirleyicidir.



(a) Deoksiribonükleotid



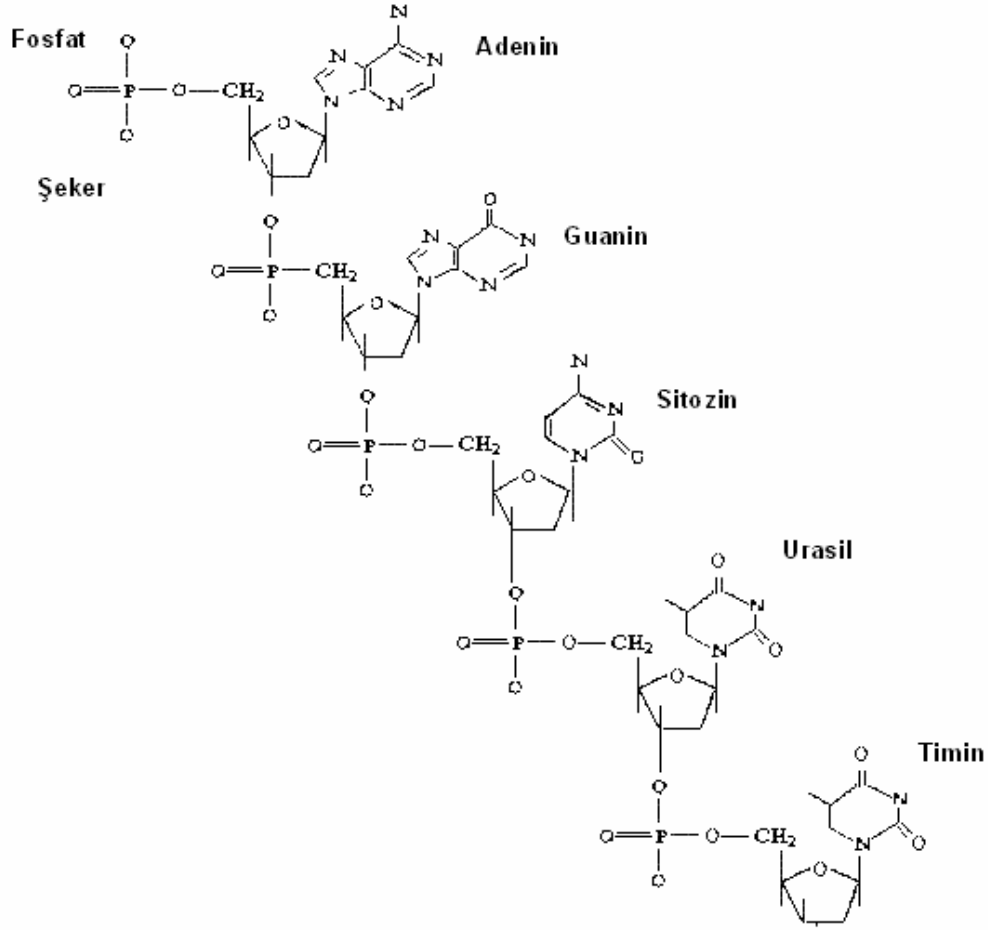
(b) Ribonükleotid

**Şekil 2.3.** DNA ve RNA'daki nükleotidler(a) Deoksiribonükleotid; ve(b) Ribonükleotid.

DNA'nın doğal durumu Watson ve Crick'in 1953'de açıkladığı gibi çift sarmaldır. Helikal yapı sağa dönüşümlü spiral bir merdivene benzemektedir. İki polinükleotid zincir karşıt yönlerde akarlar. Bu akışta Adenin Timin ile; Guanin ise Sitozin ile hidrojen bağları ile bağlanırlar. Yani iki zinciri bir arada tutan pürin ve pirimidan baz gurupları arasında olan bağ hidrojen bağlarıdır. Bu eşleşme yalnızca adenin ile timin ve guanin ile sitozin arasında gerçekleşir. Adenin ile timin arasındaki etkileşme yalnızca iki hidrojen bağ köprüsü oluşurken, guanin ile sitozin arasındaki eşleşmede üç hidrojen aynı anda paylaşılması söz konusudur.

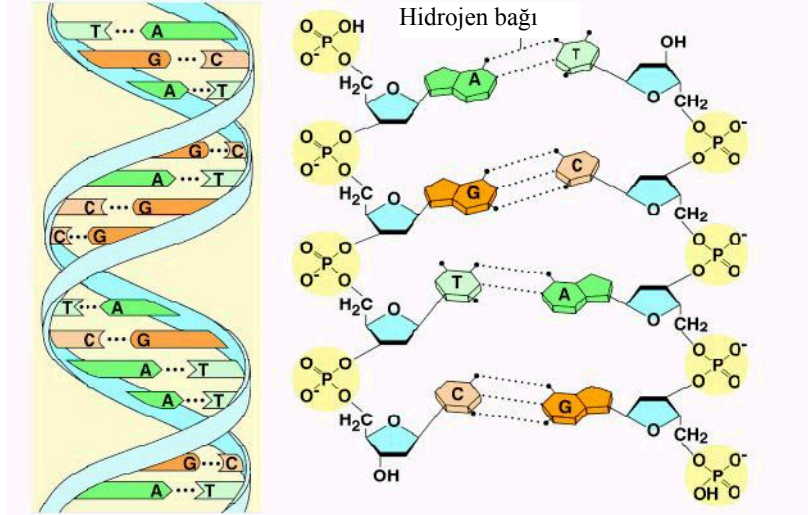
Çift sarmal DNA molekülü, sarmalın açılması ile replike olur ve yeni iki komplementer sarmal sentezi mümkün olmaktadır. Bu orijinal DNA'ya uygunluk

göstermektedir. Benzer olarak, bazların komplementer özellikte olması; hasarlı DNA moleküllerinin de doğru biçimde tamirini de gerçekleştirebilir.



**Şekil 2.4.** Nükleotidlerdeki baz gurupları.

RNA yapısı DNA'ya çok benzer. Birinci farklılık burada pirimidin bazlardan timin yerine urasil bazı (adeninle eşleşe bilen) vardır. İkincisi, nükleotid yapısında şeker gurubu olarak deoksiriboz yerine riboz bulunur. Üçüncü fark ise RNA tek zincirli bir polimerik zincirdir. Ancak bazı durumlarda bu katlanır ve baz gurupları arasında DNA'dakine benzer eşleşmeler (hidrojen bağ köprüleriyle) oluşur.



Şekil 2.5. DNA'da çift sarmal yapı ve bazların eşleşmesi ile kurulan hidrojen bağı köprüleri.

### 2.3.1. Nükleik asitlerin yapı taşları

DNA, polimerik nükleik asit makro molekül olup, azot kapsayan bazlar, beş karbonlu şeker ve fosfat grupları olarak 3 bölümden oluşmaktadır. Bazlar: pürin ( $C_5H_4N_4$ ) bazları pirimidin ve imidazol halkasından oluşurlar. İki bazda aromatik, hidrofobik ve baziktir. Serbest şekilde hücrede çok az miktarda bulunurlar. Pirimidin halkası tamamen planerdir; Pürin ise planer'e çok yakındır. pürin bazları: adenine (6 aminopurin) ve guanine (2 amino- 6 oksopurin); pirimidin bazları ise sitozin (2 okzo-4 aminoprimidin), timin (2,4, Diokso-5 metil primidine) ve urasil (2,4, Dioksoprimidin)' dir.

Nükleik asitlerin biyolojik işlevleri açısından bazların Hidrojen bağı yapma kapasitesi çok önemlidir. Hidrojen bağları, elektronegatif (O,N,F) bir atoma kovalant bağlı hidrojen ile, diğer bir elektronegatif arasında oluşan bağa denir.

DNA/RNA bazlarının Hidrojen-bağı yapan fonksiyonel grupları şunlardır:

- 1) A,G,C' nin  $NH_2$  grupları
- 2) A,G' nin Birinci Pozisyonundaki NH grupları
- 3) C,T ve U' nun üçüncü pozisyonundaki NH grupları
- 4) C 'nin ikinci pozisyonundaki;G 'nin altıncı pozisyonunda ki ve T ile U' nun 4. pozisyonundaki kuvvetli elektronegatif Oksijen' dir.

A ile T/U arasında 2 bağı; G ile C arasında 3 bağı vardır. Dolayısı ile bir G/C baz çifti; bir A=T baz çiftinden daha kuvvetlidir. Serbest Pürin ve Pirimidin bazları suda iyi çözünmezler. Hafif alkali olup; pH' ya göre değişik formlar gösterirler. Fizyolojik

pH'da (pH: 6.5-7.0) laktom formu predominanttır. Bu form zaten hidrojen bağı yapan formdur.

Heterosiklik aromatik yapıları dolayısı ile bütün pürin ve pirimidin bazları 260nm 'de UV ışığını absorbe ederler. Bu özellikleri, serbest bağların, aynı zamanda nükleosid, nükleotid ve nükleik asitlerin belirlenmesinde ve kantitatif analizinde önemlidir.

Şekerler: Riboz ve Deoksiriboz, RNA ve DNA'ya özgü beş karbonlu pentoz şekerlerdir. Aralarındaki fark C"2 deki OH grubunu DNA'da olmayışıdır. D ve beta sembolleri C'4 ve C'1 deki özel konfigürasyondan dolayıdır. Genel formülleri (C<sub>5</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>) şeklindedir. Bütün monosakkaritler iki sınıfa ayrılır: ALDOZ ve KETOZLAR. Aldoz, aldehit grubu taşır; ketoz ise keton grubu taşır. Doğada genellikle halka şeklinde bulunurlar.

Fosfatlar: Fosfat organik bir biyomolekül' de genellikle mono veya diester bağı şeklinde, mono veya dianhidrit bağı şeklinde veya ester ve anhidrit bağlar şeklinde bulunur. Pentoz şekerinin C5' atomuna bir, iki ya da maksimum üç fosfat grubu ester bağı ile bağlanmış olabilir. Bu fosfatlara alfa, beta ve gama fosfat adı verilir. Alfa - P - Ribose' a ester bağı ile; fakat diğer iki fosfata P-anhidrit bağlar ile bağlıdır. Beta ve gamma bağlar yüksek enerji içeren bağlardır. Hidrolizleri büyük miktarda enerji açığa çıkarır. Buna karşılık P-ester bağı (alfa) yüksek enerjili değildir. NTP' lerde bulunan yüksek enerjili bağlar, nükleik asit sentezi açısından önemlidirler. Fizyolojik pH'da (pH: 7.0) nükleik asit bazları artı ya da eksi yüklü değildir. Fosfat grupları ise asidiktir, dolayısı ile H atomlarını vermiş; 2,3 ya da 4 negatif yük taşırlar.

DNA ve RNA birbirine kovalant bağ ile bağlanmış; ribo ve desokribonükleotidlerden oluşmuştur. Bu nükleotidler birbirlerine P-diester (C'5OH -- C'3OH) esasında bağlar ile bağlanmıştır. Bu sabit bir omurga oluşturur ki bu da DNA/RNA' nın primer yapısıdır.

P - Rib - P - Rib - P - Rib - P - Rib. Æ

Zincirin polaritesi vardır ve kural olarak baz dizisini ribozun 5' karbon' dan başlayarak 3' karbonuna doğru okumaktadır. Birinci nükleotid zincirin 5' ucunu; sonuncu nükleotid zincirin 3' ucunu oluşturur.

Nükleotid = Baz + Riboz + Fosfat

Nükleosid = baz + riboz

Serbest pürin ve pirimidinler ile serbest nükleositlerde hücrede aynı miktarda bulunur. Bunlar yalnızca nükleotidlerin kimyasal ve enzimatik yıkımları sonucu

oluşurlar. Buna kaşın ribo ve dezoksiribonükleotidler, hücrede çok bol miktarlarda mevcuttur. Nükleotidlerin fosforik asit grupları; oldukça kuvvetli asitlerdir. pH 7'de nükleotidler negatif yüklü olarak bulunurlar.

Nükleosid ve nükleotidler biri bazın diğeri ribozun olmak üzere ise PLANER iki halka içerirler. Nükleotidlerin en kararlı konformasyonunda bu baz ve şeker halkalar CO-PLANER yani aynı düzlemde değıl; birbirlerine 90° açılı şekildedir.

Polinükleotidleri oluşturan nükleotid üniteleri birbirlerine fosfo-diester bağları ile bağılırlar. Fosfat grubu, yan yana iki nükleotid' in 3' ve 5' karbonlarını içeren iki ester bağı kurduğundan, bağı 3' Æ 5' fosfo-diester bağı denilmektedir.

pH 7'de polinükleotidlerin dış yüzeyindeki asidik fosfat grupları, neredeyse tamamen iyonize durumda olduklarından, nükleik asitler polianyonik yapıdadırlar, yani negatif yüklüdürler.

### 2.3.2. DNA Molekülü

DNA Molekülü: Watson-Crick modeline göre DNA molekülleri iki uzun zincirden oluşmakta; bu iki zincir uzun eksenleri etrafında birbirine sarılarak çiftte sarmalı oluşturmaktadır. İki zincir birbirine anti paralel' dir (anti paralel ikili- helix).

Pürin ve pirimidin bazları heliksin yapısının iç kısmındadır. Fosfat ve deoksiriboz birimleri ise molekülün dışındadırlar. Bazların, düzlemleri heliks aksına dik açıdadır. Dolayısı ile riboz şekerlerinin halkalarına da dik açı oluştururlar. Her baz birbirinden 3.4 Å uzaklığındadır. Aralarında 36° lik bir açı farkı vardır. Heliksin bir tam dönüşü 10bp içerir ve 34 Å luk uzaklıktadır. (1 Å = 10<sup>-8</sup> cm yani 10<sup>-10</sup> m' dir.) Heliks Çapı 20Å'dur. DNA 'nın iki zinciri birbirine Hidrojen bağları ile bağılıdır. A her zaman T ile (A=T); G' de hep C ile bir çift oluşturur (G/C) .

Bir DNA zinciri üzerindeki baz dizilimi hiçbir şekilde sınırlı değıldir. Bu spesifik baz dizilimi genetik bilgiyi kodlamaktadır. DNA çiftte sarmal' ının en önemli özelliğı bazların arasındaki çiftleşmenin spesifikliğidir.

Watson-Crick, sterik ve hidrojen bağı oluşturma sebeplerinden hep A=T ve G=C' nin bir çift oluşturma gerektğine karar vermişlerdir. Birbirine hidrojen bağı ile bağılı bir baz çiftine bağılı glikosidik bağlar her zaman 10.85 Å uzaklığındadırlar. Bir pürin-pirimidin baz çifti bu arayı tam olarak doldurur. Buna karşılık, heliks içinde iki pürin için yeteri kadar yer yoktur. İki pirimidin ise birbirlerinden çok uzak kalacakları için Hidrojen bağını kuramayacaklardır. Bu nedenle, baz çiftleri yalnızca hidrojen bağı faktöründen değıl; aynı zamanda heliks içindeki dar mekanı optimal kullanma açısından da uygundur. A - T ile G - C ile en uygun hidrojen bağını oluştururlar. Bu hidrojen bağlarının yerleşimleri ve uzaklıkları baz çiftleri

arasında olması gereken optimal kuvvetteki interaksionları mümkün kılar. İki zincirin birbiri etrafında dolanarak çifte sarmalı oluşturması; polar olan şeker ve fosfat iskeletini yapının dış kısmına kaydırmakta; bu şekilde bu hidrofilik gruplar su ile temas halinde bulunmaktadırlar. Buna karşılık, hidrofobik olan bazlar, heliksin iç kısmında yer almakta; polar gruplar ise, (NH<sub>2</sub>, O, NH vb.) birbirleri ile Hidrojen bağlarını oluşturmaktadırlar. Her zincirden bir baz; karşı zincirden bir baz ile bu şekilde eşleşmektedir (A-T, G-C). Baz çiftleşmesinin en önemli sonucu; bir zincirde olan baz dizisinin otomatik olarak diğer zincirdeki diziyi göstermesidir. Bu ana prensibin dışında, baz dizilimi açısından herhangi bir kısıtlama yoktur. Baz çiftleri tamamen tek bir "düzlemde" olup; çok yassı ve hidrofobik olan halkaları, birbirleri ile hidrofobik interaksiyona girerek; bir tabak yığını şeklinde üst üste dizilirler ve bu şekilde su ile kontaklarını azaltırlar. Bu da molekülün, spiral bir ip merdiven şeklinde görünmesine yol açar. Bu ip merdivenin yanlarını fosfat-riboz iskeleti; basamaklarını ise birbiri üzerine dizilmiş baz çiftleri oluşturmaktadır.

İki zincir birbirine aksi polaritede; antiparalel' dir; yeni bir zincirin nükleotid bağları 3' Æ 5'; diğerinde ise 5' Æ 3' doğrultusundadır. Her iki zincirde sağ dönüşümlüdür (right-handed). Her bir tam dönüş, 34°A içinde 10 baz çifti kapsamaktadır.

Çifte sarmalın stabilizesini sağlayan faktörler şunlardır.

- 1) Fosfodiester bağları
- 2) Hidrofobik interaksionlar
  - a) Pürine ve Pirimidinin birbirlerine aktivite gösterirler.
  - b) Kavite enerji.

Nükleik asitlerin fosfo-diester bağları fleksibl' dir. Bu noktalardan sağa/sola dönüş olur.

### 2.3.3. DNA Kaynakları

DNA kaynaklarında çok çeşitlilik söz konusudur. Kurumuş kan, ağız çalkantı suyu, saç kökü, embriyo, arkeolojik kaynaklar, idrar, amniotik sıvı ve diğerlerinin elde edilmesi için gereken yaklaşık doku miktarları çizelge 2.1'de verilmektedir.

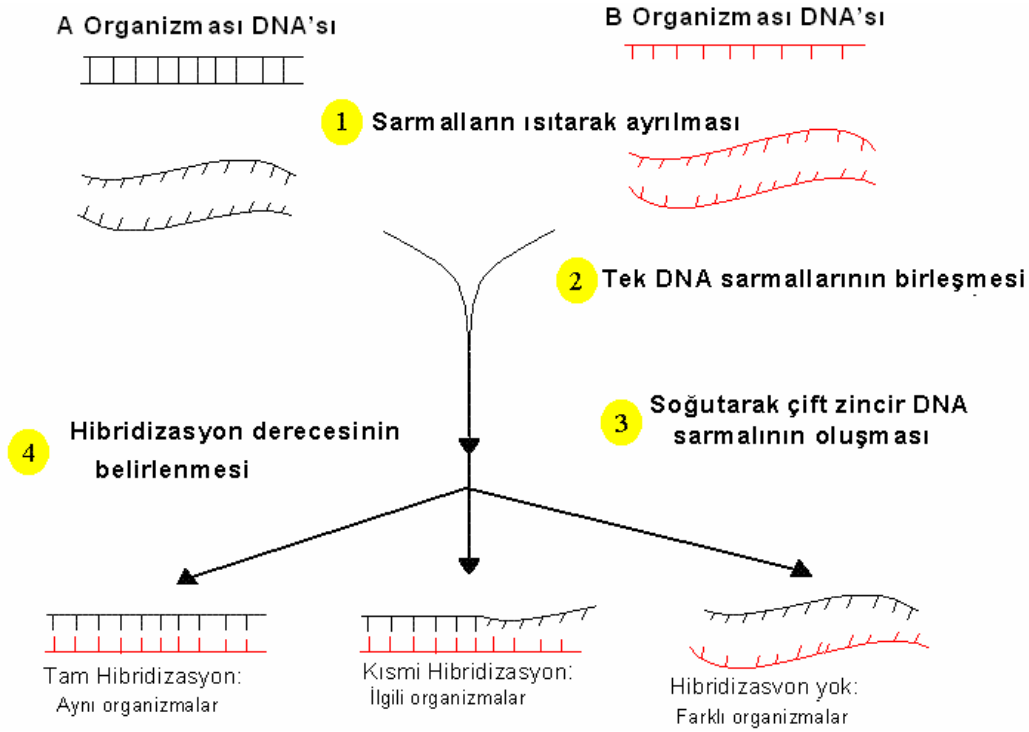
**Çizelge 2.1.** Kullanılan DNA kaynakları

DNA kaynakları	Doku miktar	DNA miktar
Saf genomik DNA	50-500 hg	50-500 hg
Korionik villus örneği	5 mg	1-3 mg
Guthrie kan damlası	5mm'lik bir damlanın yarısı	0.5-1 mg
Semen	30ml	5-10 mg
Tam kan	30ml	0.5-1 mg
Yanak mukoza hücresi	bir ağız çalkantı suyu	0.1-1 mg
Doku blokları	50 mg	0-10 mg
Hücre Süspansiyonları	5x10 <sup>5</sup> hücre	2-5 mg

### 2.3.4 Hibridizasyon

Bir DNA molekülü ısıtılınca, iki iplikçığı bir arada tutan hidrojen bağları kırılır ve iki komplementer iplikçik birbirinden ayrılır. Eğer bu ortam yavaş olarak soğutulursa komplementerler tekrar bir araya gelir ve orijinal çift sarmal yeniden edilir. Eğer iki farklı DNA tek iplikçığı bir araya getirilirse, yalnızca komplementer bölgeler eşleşir (“hibridizasyon”). Organizmaların aynı olduğu durumda tam olarak eşleşme vardır ve bu “tam hibridizasyon” (“complete hybridization”) olarak adlandırılır (Şekil 2.6). Hibridizasyon gen bölgelerinin tanısında kullanılabilir. Buna bir örnek ‘Southern Blotting’ tekniğidir. Burada ilgilenilen DNA alınır ve kesme (‘restriction’) enzimleriyle kesilir, jel elektroforez ile istenilen fragmanlar ayrılır. ‘Blotting’ ile DNA bantları nitroselüloz filitreye nakledilir. Daha önce hazırlanmış, aranılan gen bölgesiyle hibridizasyon yapabilecek etiketli (örneğin radyoaktif etiketle) proplar ortama ilave edilir. Eğer hibridizasyon oluşursa bu film üzerinde görüntülenebilir. Bu yöntemle analiz edilen DNA’ da istenilen gen bölgesinin bulunup bulunmadığı belirlenir.

Gen bölgelerindeki mutasyon (baz sekansının değişimi) ‘Southern Blotting’ tekniği ile araştırılır. Mutasyon bir çok genetik esaslı hastalıkta gözlenir. Bir çok ajan (‘mutajen’) örneğin çeşitli kimyasallar ve radyasyon mutasyona neden olabilir. Bunun tanısına mutasyona uğramış bölgenin saptanması önemlidir. Yukarıdaki teknik uygulanarak mutant gen bölgelerinin belirlenmesi mümkündür.



Şekil 2.6. Hibridizasyonun şematik olarak gösterimi.

**Denatürasyon:** Çift iplikli DNA'ların bazları arası kurulmuş olan hidrojen bağlarının fiziksel veya kimyasal yollarla açılması halidir. Denatürasyon, ısı değişiklikleri ile; pH' sı değiştirilerek ve bazı proteinler ile gerçekleştirilir. Gerek DNA; gerek RNA asit hidrolizine dayanıksızdır. Fosfo-diester bağı kırılmaktadır. RNA alkali ile de hidrolize edilir.

Denatürasyonda etkili faktörler şunlardır:

1. DNA' nın tipi; homojen DNA - Örnek. viral DNA, çok kısa bir ısı aralığında erir. Heterojen DNA ise daha geniş bir erime spektrumu verir.
2. DNA' nın G + C miktarı: her DNA' nın Tm derecesi GC miktarı ile direkt ilgilidir; zira G=C çifti; moleküle ekstra bir stabilite verir. Renatürasyon, Tm' in yaklaşık 10°C aşağısında yapılır.

'Southern Blotting' tekniği kriminolojide (suç tanımlamasında), olay bölgesinden toplanan delil olabilecek DNA veya fragmanlarının gen bölgelerinin bulunması ve şüpheli DNA' sının karakteristik genleriyle karşılaştırılması ile suçlunu belirlenmesinde çok başarılı bir şekilde kullanılmaktadır. Uygulanan tipik bir yöntem şöyledir: olay yerinden elde edilen biyolojik materyallerden (kan, kıl, tükürük, meni, doku parçaları, tırnak vb.) DNA izolasyonu yukarıda anlatıldığı gibi

yapılır. DNA üzerinde belirlenmiş gen bölgeleri PCR tekniği ile çoğaltılır ve türü 'Southern Blotting', 'Dot Blot' vb. tekniklerin yardımıyla belirlenir.

'Southern Blotting' tekniğini bilinmeyen mikroorganizmaların tayini için de kullanmak mümkündür. Burada önce tayini yapılması istenen mikroorganizma(örnek olarak Salmonella) DNA'sı alınır, spesifik enzimlerle istenen fragmanı kesilir, E.coli içine klonlanır, ve çoğaltılır. Elde edilen çok sayıda fragman etiketlenir ve prob olarak kullanılır. Bilinmeyen bakteri alınır, hücre parçalanır ve DNA'sı çıkarılır ve iki iplikçiğe ayrılır. Test ortamına prob DNA ve bilinmeyen bakterinin DNA'sı ilave edilir. Renk oluşumu bilinmeyen bakterinin Salmonella olduğunu gösterir.

Yukarda verilen örnekler DNA sensörleri ile de çalışılmıştır. Bu sensörlerde prob DNA fragmanı elektrot üzerinde immobilize edilir ve varlığı araştırılan DNA tek iplikçiği bulunan çözeltiyle etkileşerek benzer şekilde oluşan hibridizasyon reaksiyonları izlenir.

### 3. DENEYSEL YÖNTEMLER

Sunulan çalışmada, altın nanopartiküller ile yüzey alanı genişletilen kuartz kristal mikrobals kristalleri kullanılarak bir DNA sensörünün alt yapısını geliştirmek amaçlanmıştır. Bu amaçla altın nanopartikülleri en yaygın ve ekonomik metotla yani indirgenme metoduyla sentezlenip, karakterize edilmiştir. Daha sonra bu partiküller piezoelektrik kristal üzerine yüzey aktivasyonu ve modifikasyonu ile immobilize edilmiş, değişiklikler frekans kayması olarak izlenmiştir. Ardından, satın alma yoluyla temin edilmiş tiyol uçlu tek zincirli DNA'lar, altın nanopartiküllerin immobilizasyonu sonucu yüzey alanı genişletilmiş kristaller üzerine immobilize edilmiş ve DNA hibridizasyonu kristalde oluşan frekans kayması ile izlenerek DNA sensörü yapılmıştır.

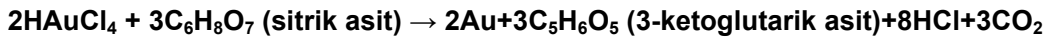
#### 3.1. Altın Nanopartikül Sentez ve Karakterizasyonu

Sunulan araştırmanın bu bölümü, altın nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterize edilmesi ile ilgili deneyleri kapsamaktadır.

##### 3.1.1 Altın Nanopartikül Sentezi

Sunulan araştırmanın bu bölümünde öncelikli olarak altın nanopartiküllerin sentezi literature bağlı kalınarak gerçekleştirilmiştir (Haizhen Huang, Xiurong Yang; 2003). Bu amaçla deneylerde altın tuzu olarak altın kloraurik asidin tuzu ( $H[AuCl_4]$ )(Aldrich, ABD) kullanılmıştır. Daha sonra altın tuzunun indirgenmesi için Tri sodyum sitrat ( $Na_3C_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ , Analar) indirgenme ajanı olarak seçilmiş ve kullanılmıştır.

Altın nanopartikül sentez reaksiyonunu başlatmak için önce hazırlanan derişimde altın tuzu karıştırılarak kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır ( $97.5^\circ C$ ). Bu aşamada altın tuzu çözeltisi sarı renktedir. Hazırlanan sodyum sitrat çözeltiye eklendikten sonra, ilk aşamada sodyum sitrat sitrik aside dönüşüp, sarı renkteki çözelti aniden şeffaf ve renksiz hale dönüşmektedir. Biraz sonra siyah renge ve daha sonra da yavaş yavaş şarap kırmızısı bir renge dönüşmektedir. Bütün bu renk değişimleri sırasında çözeltinin karıştırılmasına devam edilip ve sıcak yüzey üzerinde tutulmuştur. Renk değişimi sona erdiğinde altın partikül çözeltisi karıştırılarak soğumaya bırakılmıştır. Bu noktada altın nanopartikül sentezi sonlanmıştır.



Yukarıda altın nanopartiküllerin sentez reaksiyonu verilmektedir. Son olarak elde edilmiş olan şarap kırmızısı renkte çözeltinin pH' sı ölçülmüş ve partiküller elektrik

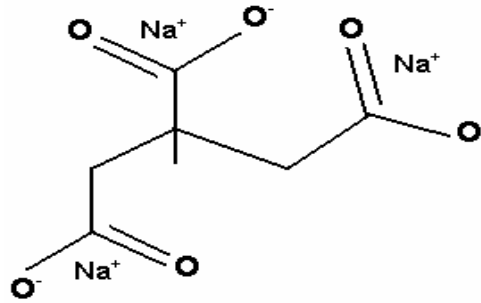
yükü, boy ve boy dağılımları bakımından Zeta Sayıcı (ZETA Sizer, 3000 HSA, Malvern-İngiltere) ile karakterize edilmişlerdir.

### 3.1.1.1. Altın Tuzu Derişiminin Nanopartikül boyutuna etkisi

Çalışmanın bu kısmında, altın tuzunun işlem başlangıcındaki derişiminin etkisi araştırılmış ve incelenmiştir. Bu amaçla, altın tuzu çözeltisi, pH değeri 7.2 olan deiyonize su ile değişik oranlarda (Altın tuzu/su oranları 1/10 - 1/1) karıştırılarak farklı derişimler elde edilmiştir. Altın tuzunun derişimi 0.03mM'dan 0.3mM'a kadar değiştirilmiştir (0.03, 0.0375, 0.05, 0.06, 0.075, 0.10, 0.15, 0.30 mM). İndirgeme ajanı olarak kullanılan sodyum sitratın derişimi (0.17 mM) ve karıştırma hızını 450 devir/dakika'da sabit tutularak denemeler gerçekleştirilmiştir. Daha sonrada son aşamada elde edilen nanopartikül çözeltisinin görünümü değerlendirilmiş, pH'ı ve partikül boyutları ölçülmüştür.

### 3.1.1.2. Sodyum Sitrat Derişiminin Nanopartikül boyutuna etkisi

İndirgeme ajanı olarak kullanılan sodyum sitrat (Şekil 3.1) derişiminin nanopartikül boyutuna etkisi bu bölümde incelenmiştir. Literatür bilgilerine göre nanopartikül sentezinde en önemli etkenlerden biri olarak gösterilmiştir (Andrew N. Shipway, et al, 2000). Bu etkileri tespit edebilmek ve bu reaksiyonu karakterize etmek için sodyum sitrat derişimi 0.01'den 0.50 mM kadar değiştirilmiştir (0.010, 0.025, 0.050, 0.075, 0.10, 0.15, 0.25, 0.35, 0.50). Bu deneyler sırasında altın tuzunun derişimi 0.06 mM (sodyum sitrat/su oranı 1/5) ve karıştırma hızı 450 devir/dakika'da sabit tutulmuştur. Deneylerin sonunda elde edilen nanopartikül çözeltisinin görünümü değerlendirilmiş, pH ve partikül boyutları ölçülmüştür.



Şekil 3.1. Tri sodyum sitratın açık formülü {HOC(COONa)(CH<sub>2</sub>COONa)<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O}

### 3.1.1.3. Karıştırma Hızının Nanopartikül boyutuna etkisi

Karıştırma hızının nanopartikül boyutuna etkisi bu bölümde incelenmiştir. Bu amaçla karıştırma hızı 300 – 800 devir/dakika aralığında değiştirilmiştir (300, 400, 500, 600, 800). Bu deneyler sırasında altın tuzunun derişimi 0.06 mM (Altın tuzu/su oranı 1/5) ve sodyum sitratın derişimi 0.15 mM'da sabit tutulmuştur. Deneylerin sonunda elde edilen nanopartikül çözeltisinin görünümü değerlendirilmiş, pH'ı ve partikül boyutları ölçülmüştür.

### 3.1.2. Altın Nanopartikül Karakterizasyonu

Bölüm 3.1.1'de sunulduğu şekilde elde edilmiş olan altın nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları bu bölümde sunulmuştur.

#### 3.1.2.1. Gözleme dayalı Karakterizasyon

Burada elde edilmiş olan partiküllerin şarap kırmızısı bir renge sahip oldukları gözlenmiştir, bu renk gözleminin partiküllerin boyutlarıyla olan ilişkisi, derecelendirilmiş olan şeffaflık veya bulanıklık derecesiyle belirlenmektedir. Mesela üçüncü dereceden olan bulanık bir çözelti 'Bulanık +++' şeklinde gösterilmektedir, mikron boyutlu partikülleri göstermektedir. Yani bu partiküller 700 nm civarında bir boyuta sahiptirler. Aynı şekilde 'Bulanık++' ve 'Bulanık+' sırasıyla yaklaşık olarak 400 nm ve 200 nm olan partikülleri göstermektedirler. Aynı zamanda 'Bulanık' işaretleriyle gösterilen çözeltilerin istenen pH seviyesinde (pH=3) olmadıkları gözlenmiştir. Şeffaf olarak gösterilen çözeltiler, istenen derişimlerde ve karıştırma hızlarında, sentezlenmiş olan nanopartiküllerdirler. Aynı şekilde şeffaf çözeltilerde pH değişimlerinin, partikül boyutlarıyla olan bağlantısı gözlenmiştir.

#### 3.1.2.2. Partikül boy ve boy dağılımı tayini

Hazırlanan altın nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için zeta Sayıcı cihazı kullanılmıştır (Şekil 3.3). Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası partiküller deiyonize su kullanarak seyreltilmiş ve yaklaşık 3ml hacimli örnek çözelti polistiren küvet içerisine konulmuştur. Deneyler, sıcaklık kontrollü bir bölme içerisine yerleştirilen polistiren küvetin içersindeki çözeltiden 633nm'lik kırmızı lazer ışığının geçirilmesi

ile gerçekleştirilmiştir. Örnek içerisinde geçirilen lazer ışığından ışık 90°C'ye yerleştirilen elektronik detektör tarafından ölçülmüştür. Detektörde ölçülen ışık şiddeti, elektronik sinyallere dönüştürülüp korelatöre gelmektedir. Korelatörde küçük zaman aralıklarında saçılan ışık şiddeti değerleri karşılaştırılır ve ışık şiddetinin ve ışık şiddetinin değişim hızı belirlenmektedir. Saçılan ışığın şiddetindeki değişimler, çalışan bölgenin içinde ve dışındaki moleküllerin difüzyon hızıyla ilgilidir (Brownian hareketi) ve analiz edilen veriler direkt olarak ışık saçılmasına neden olan partiküllerin difüzyon katsayılarını vermektedir. Difüzyon ile partiküllerin büyüklüğü arasındaki ilişki, küresel partiküller için Einstein tarafından geliştirilen ve Brownian hareketi ile açıklanan teorik denklikle açıklanmaktadır. Bu denklikten, küresel partiküllere ait difüzyon katsayıları fonksiyonlaştırılıp, hidrodinamik çap hesaplanmaktadır.

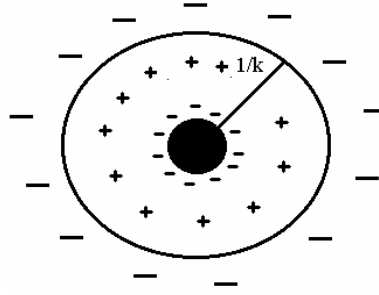
Partikül boy ve boy dağılımının ölçülmesinde kullanılan cihaz, partiküllerin zeta potansiyelini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyeli zeta potansiyeli olarak ölçülmektedir. Cihaz mikroeletroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyelini ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızı elektroforetik hareket olarak adlandırılmakta ve aşağıdaki eşitlikle ifade edilmektedir:

$$\mu_e = V/E$$

(E= uygulanan elektrik alan, V= ölçülen hız,  $\mu_e$ =elektroforetik hareket)

Yüklü durgun bir katı ile temasta olan sıvı uygulanan elektrik alan nedeniyle hareket eder ve bu hareket elektro-osmoz olarak tanımlanmaktadır (Şekil 3.2). Cihazda bulunan hücre içerisindeki cam duvarların negatif yüklü olması nedeniyle hücre içerisinde böyle bir hareket oluşmaktadır. Hücre içerisinde elektro-osmotik çözücü akışının sıfır olduğu noktada partikülün hızı ölçülmelidir. Bu noktaya durgun tabaka denilmektedir. Cihaz iki lazer ışığını kesiştiği durgun tabakadaki küçük bir hacimdeki elektrik alan nedeniyle hareket eden partiküllerin hızını ölçmektedir. Bu hacim içindeki partiküllerden saçılan ışık partikülün hızına bağlı olarak zamanla salınım oluşturmaktadır. Saçılan ışık şiddetinin değişim hızı veriler korelatörde elektroforetik hıza ve zeta potansiyele dönüştürülmektedir. Cihaz ölçtüğü birim elektrik alanındaki partikül hızından aşağıda verilen Henry eşitliğini kullanarak ölçülmek istenen zeta potansiyel değerini hesaplamaktadır.



**Şekil 3.2.** Zeta sayıcıda uygulanan elektrik alanında, partikül üzerinde mevcut olan elektrik yüklerin şemasını göstermektedir.

$$\mu_e = \frac{2 \epsilon \zeta}{3 \eta} \cdot f(ka)$$

$\zeta$ = Zeta potansiyeli;  $\eta$ = Viskozite

$f(ka)$ = partikül şekline bağlı sabit

$\epsilon$ = Sıvının elektrik geçirgenliği



**Şekil 3.3.** Zeta Sayıcı cihazının fotoğrafı.

## 3.2. Osilatör Devre

### 3.2.1. Yapılan deneylerde, kristal üzerinde sıcaklık etkisi

Bilindiği gibi sıcaklığın birçok deney üzerindeki etkileri genellikle araştırılan bir parametredir. Şüphesiz sunulan çalışmanın üzerindeki sıcaklık etkilerini göz ardı etmek mümkün değildir. Bunun doğrultusunda sıcaklığın, kristaller ve daha doğrusu onların deneylerdeki frekans kaymalarındaki etkisi araştırılmış ve çok önemli olduğu izlenmiştir. Bu yüzden yapılan çalışmanın tüm aşamalarında bu faktör dikkate alınarak etkisi azaltılmaya çalışılmıştır.

### 3.2.2. Osilatör Devrenin Tasarımı ve İmalatı

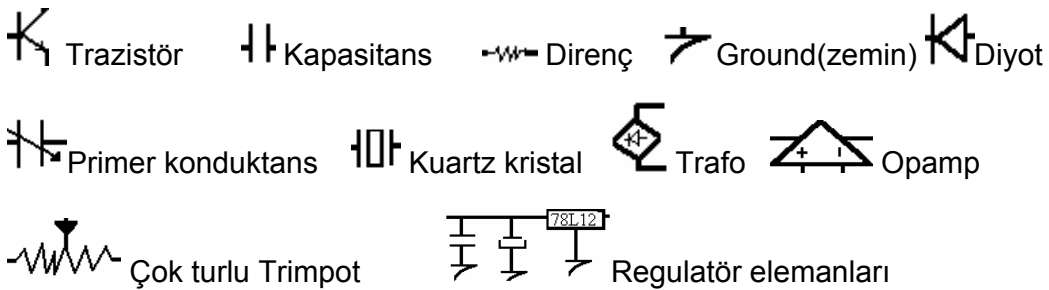
Daha önce yapılan ve var olan devrelerin sorunlarından ve yüksek hata toleranslarından yola çıkılarak bu çalışmada, sözü geçen devrenin tasarımına karar verilmiştir. Bu sorunlardan en önemli ve başta gelenlerinden, sabit sıcaklıkta ölçüm yapılabilmemek, aynı zamanda sadece tek bir kristalin frekans ölçümünü yapabilmek, şehir elektriğinin frekans değişimi ve etrafta çalışan cihazların oluşturduğu frekanstan etkilenerek yüksek hata oranına sahip olmalarından söz edilebilir. Bu sorunları aşmak için, istenilen sabit sıcaklıkta çalışan, aynı zamanda iki kristalin frekans ölçümünü yapabilen, özel bir baskılı devrenin tasarımı yapılmıştır.

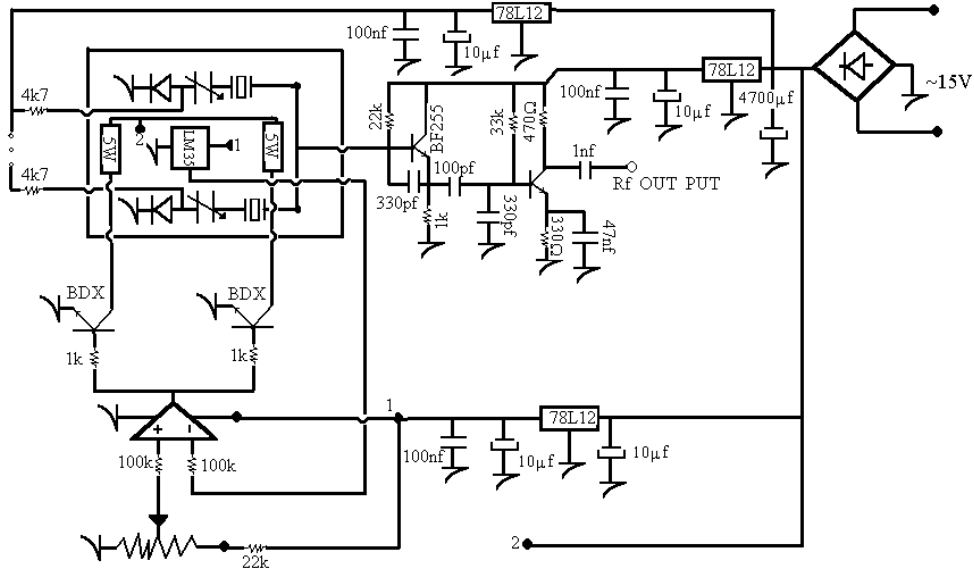
Öncelikle tasarımı başlanılan kısım baskılı devre denilen kısımdır. Baskılı devre aynen bir otomobilde olduğu gibi, devrenin şasisinin rolünü oynamaktadır. Yani önce cihazda hangi bölümlerin olması gerektiği ve nasıl olması gerektiği şasi üzerinde planlanılmıştır. Baskılı devre 2 mm kalınlığında her iki yüzeyi bakır kaplı olan, plastik bir sayfadır. Devrenin tasarımı bittikten sonra, plan bakır kaplı sayfa üzerine çizilmiştir. Burada kullanılan tüm elektrik malzemelerinin şemalarını düşünerek, bağlanılacak noktaları ve buna bağlı olarak tüm elektrik hatları tam olarak ve dikkatle belirlenip, çizilmiştir. Sonra istenilen bölgeler (malzemelerin bağlandığı noktalar ve elektrik taşıyan hatlar) özel bir maddeyle (ki istenilen bu bakır bölgeleri çözülmeye karşı korumaktadır) kapatılmıştır. Daha sonra bu çift yüzü bakır olan sayfa asit içine, bakır yüzeylerin (istenilen bölgeler dışında) çözülmesi amacıyla daldırılmıştır. Bu işlemin sonucunda baskılı devre hazırlanmıştır, sadece elektrik malzemelerinin bağlanması için daha önceden belirlenen noktalarda çok ince bir matkapla sadece bu malzemelerin bacaklarının geçebileceği kadar delinmiştir. Unutulmaması gereken bir konu, sayfa üzerinde geriye kalan bakır bölgelerinin iletkenliğinden dolayı, elektrik malzemeler arasındaki iletkenlik sağlanmıştır.

Yapılan bu yeni cihazda, yukarda geçen ve önemli sorunlardan biri olan, yani cihazın etraftaki gürültülerden etkilenmemesini sağlamak için, burada tasarlanmış olan baskılı devre, çift yüzlü bir devredir. Yukarda geçtiği gibi normalde kullanılan baskılı devreler tek yüzü bakır olur ama yeni tasarımda yüzeylerden biri, zemin(ground) olarak kullanılmıştır. Burada bakırın en önemli özelliklerinden biri, yani frekans ve gürültüyü kendisine doğru çekmesinden yararlanılmıştır. Burada bu yüzeyin zemin olarak kullanılması, gürültüyü ve etraftan gelen frekansı zemine bağlamış veya başka bir deyişle gürültüyü silmiştir.

Tasarlanan osilatör devresi üç ayrı bölümlerden oluşmaktadır: 1) Osilatör 2) Sabit sıcaklık 3) Sabit sıcaklık kontrol bölümü.

1) Osilatör: Asıl frekans ölçme bölümüdür. Bu bölüm 12V'luk bir bilgisayar güç kaynağıyla beslenmektedir. Güç kaynağının özellikle bilgisayar güç kaynağının olmasının nedeni, düzenli sabit bir elektrik akımı sağlamasıdır. Devre bu kısımda BF255 nolu tranzistörden; 1N40148 nolu diyottan ve 10K'luk primer konduktanstan yararlanmaktadır. Osilatör bölümünün uç kısmında bulunan kristaller birazdan anlatılacak olan sabit sıcaklık bölmesinin içinde bulunmaktadır. Ölçülmek istenen kristalin hangisi olduğunu belirlemek için bir 12V'luk minyatür röle ve bir Switch'ten yararlanılmaktadır. Şekil 3.4. de RF Output adıyla gösterilen kısım osilatör devresinde ölçülmüş olan kristallerin frekansının çıkış noktasıdır. Aynı zamanda Şekil 3.4'de şemaları çizilen elektronik malzemelerin isimleri aşağıda verilmektedir:





Şekil 3.4. Deneylerde kullanılan Osilatör Devresi.

2) Sabit sıcaklık bölümü: Cihazın bu kısmı kristaller içinde olmak üzere kapaklı bir metal kutudan oluşmaktadır. Bu bölme 15V'luk bir trafo tarafından beslenmektedir. Aynı trafo sıcaklık kontrol birimini de beslemektedir. Bölme içinde sıcaklığı temin etmek için iki tane 5 Watt'lık dirençten yararlanılmıştır.

3) Sıcaklık kontrol birimi: Bu bölüm tasarlanan osilatör devresinin en önemli birimidir. Bu birimin amacı 2. birimde yani sıcaklık üretilen kısımdaki sıcaklığı istenilen derecede ayarlayıp ve o sıcaklıkta sabit tutulmaktır. Aynı zamanda hem ayarlanan sıcaklık ve hem de her an sabit sıcaklık kutusunun sıcaklık değerini görmek mümkündür. Burada sıcaklık göstergesi için dijital bir voltmetreden yararlanılmaktadır. Bu voltmetre sıcaklık biriminden ayrı olan bir 6V'luk trafo tarafından beslenmektedir. Voltmetreden ayarlanan sıcaklık veya o andaki sabit sıcaklık kutusunun sıcaklığını seçmek için, bir Switch kullanılmaktadır. Kutunun içindeki sıcaklığı algılamak için LM35 sıcaklık sensöründen ve kutunun duvarlarına yapışan BDX tranzistörlerinden faydalanılmıştır. Devreyi istenilen sıcaklığa ayarlamak için çok turlu bir Trimpot kullanılmıştır ve asıl sıcaklık kontrolü için kullanılan malzeme LM358 adlı bir opamp'dir. Burada sıcaklık gösterge hassasiyeti 0.1 derece ve kutu stabilize duruma geldikten sonra sıcaklık toleransı 1 derecedir.

Deneylerde kullanılan frekans sayıcı (HEWLET PACKARD model 53181A 225 MHz) dir (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Deneylerde kullanılan Frekans Sayıcı.

### 3.2.3. Osilatör Devresinin Çalıştırılması

Bu araştırma kapsamında yapılan deneylerde kristallerin üzerinde herhangi bir kütlenin yüklendiği ve/veya kütlenin koştığı durumlar, tarafımızdan tasarlanan osilatör devresi yardımıyla ölçülmüştür (Şekil 3.6).

Kuartz kristallerin yüzey aktivasyonunun, yıkanmasının, yüzey modifikasyonlarının, ve immobilizasyonların olup olmadığını tespit etmek için frekans farklarının ölçümleri takip edilmiştir.

Deneylerde kullanılan osilatör sabit sıcaklıkta, iki kristali aynı zamanda okuma kabiliyetine sahip olan bir cihazdır. Bu cihazın avantajları:

A) Tüm ölçümlerin sabit bir sıcaklıkta ölçülmesi (sıcaklığın değişmesiyle birlikte frekans sayısında da değişiklikler açıkça gözlenmiştir).

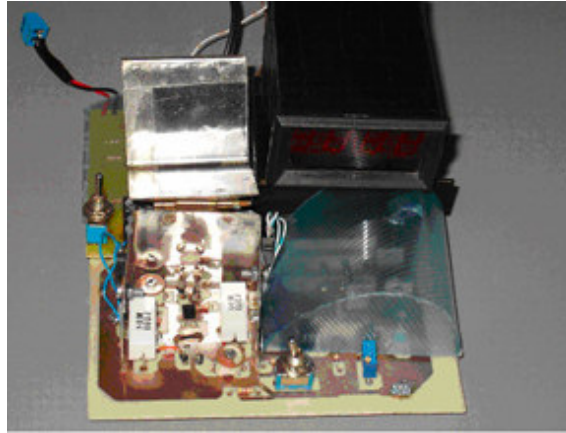
B) İki kristalin aynı zamanda ve aynı koşullarda incelenmesi hem bir kristali referans olarak kullanabilmek ve hem aynı koşulları sağladığı için kristal üzerinde yapılan ölçümlerdeki hatayı en aza indirmek için tasarlanmıştır.

C) Osilatör de 3 ayrı güç kaynağında yararlanılmıştır, Bunun sebebi osilatörlerin şehir elektriğinde herhangi bir frekans değişiminden etkilenmemesidir. Bu yüzden bu devrede frekans osilatör kısmı, sabit sıcaklık ve sıcaklık ölçüm cihazı her biri ayrı ayrı güç kaynaklarından beslenmektedirler ki bununla yapılan frekans ölçümlerindeki hatayı en düşük seviyeye getirmek amaçlanmıştır.

D) Osilatör devresinin tasarımında çift yönlü bir devreden yararlanılmasıyla, etrafta oluşup ve yayılan herhangi bir frekans etkisinden kurtulmuştur.

Bu cihazı çalıştırmak için yapılan gereken işlemler şöyledir:

- 1) Öncelikle her elektronik cihaz gibi güç kaynağının temin edilmesidir. Yukarıda anlatıldığı gibi öncelikle bulunan üç ayrı güç kaynağının elektriğe bağlı olmasından emin olunmalıdır.
- 2) Kristaller sabit sıcaklık kutusunda belirlenen yerlerine bağlanılır.
- 3) Osilatör devresinde istenilen kristalin frekansının ölçümü için Switch'le o kristalin konumu seçilir.
- 4) Sıcaklığı ayarlamak için önce sıcaklık kontrol birimi üzerinde bulunan Switch sıcaklık ayarlama konumuna gelmelidir ki burada voltmetre kullanılarak, devrenin hangi sıcaklığa ayarlandığı görünmektedir (daha önce belirlendiği gibi bu Switch' in bir sıcaklık ayarlama konumu ve birde o anda kutunun içindeki sıcaklığı, voltmetre aracılığıyla görmek için bir başka konumu vardır).
- 5) Switch üzerindeki konum, sıcaklık ayarlama konumuna gelmekle ve dijital voltmetre kullanılmakla birlikte sıcaklık ayarı bir tornavidayla, çok turlu trimpot üzerinden yapılmaktadır. Yani tornavidayla çevirerek dijital voltmetre üzerinden sıcaklığın azalıp çoğalması görünmektedir.



**Şekil 3.6.** Tarafımızdan tasarlanan deney düzeneği.

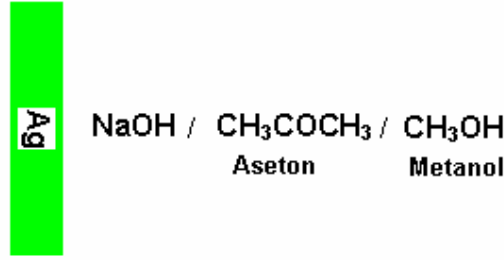
### **3.3. Kuartz Kristallerin yüzey modifikasyonu**

Kuartz kristaller üzerinde her hangi bir işlem yapabilmek veya bir immobilizasyon işlemine tabii tutabilmek için öncelikle bu kristallerin üzerinde veya daha doğrusu elektrotlarının üzerinde temizleme, aktivasyon ve fonksiyonel grupların immobilizasyonu gerçekleşmelidir. Bu fonksiyonel grupların bağlanmasıyla ve ona bağlı olarak ligand immobilizasyonunun istenen şekilde yapılabilmesi için adı

geçen işlemlerin gerçekleştirilmesi gerekir. Bu amaçla çeşitli çevirici sistemler ve modifikasyon çeşitleri kullanılmaktadır. Kuartz kristallerin en yaygın elektrot türleri altın, gümüş, alüminyum ve oksitlenmiş platin olanlarıdır. Altın elektrotlu olan kristaller doğrudan ve gümüş elektrotlu kristaller yumuşak asitler olarak ( $Au^+$ ,  $Ag^+$ ) ditiyo (tiyoller) ile (yumuşak bazlar olarak:  $SH^-$ ) yumuşak asitler ve bazlar teorisine dayanarak (HSAB; HARD-SOFT ACID BASE) kovalent bağ yapmaktadırlar (Surface-Grafted Polyglutamate Films With Reaction-Induced Polar Order Wieringa, R.H.); (Paul E. Laibinis, 1991). Bu iki gurup bileşikleriyle fonksiyonel guruplar oluşturabilmektedirler. Alüminyum kristallere yüzey karboksil aktivasyonu ile ligand immobilizasyonunu gerçekleştirmek mümkündür. Aynı işlemi hidroksil guruplarıyla, platin oksit kristallerine uygulamak mümkündür.

### **3.3.1. Kuartz Kristallerin yüzey aktivasyonu**

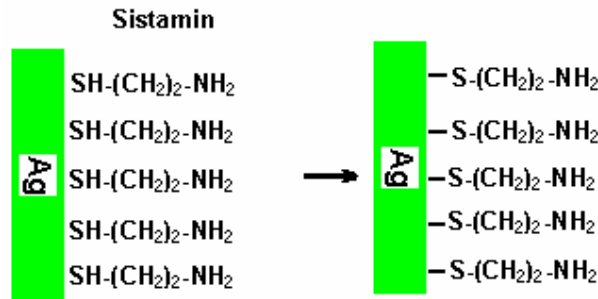
Deneylerin bu aşamasında, deneyler sırasında kullanılacak gümüş (Ag) elektrotlu kuartz kristallerin (10 MHz), yüzeylerinin aktive edilmesi amacıyla bazı ön işlemler uygulanmıştır. Bu ön işlemlere başlamadan önce kristallerin tarafımızdan tasarlanıp yapılan osilatör devre yardımıyla frekansları ölçülmüştür. Sunulan çalışmada deneyden ve cihazdan kaynaklanan hatayı en aza indirmek için hazırlanan 2 kristal osilatör devresinde aynı zamanda frekans ölçüleme özelliğine sahip oldukları için, deney başlamadan boş yüzeylerinin frekansı ölçülmüştür. Daha sonra kristallerin biri, deney aşamalarına girerken diğer kristal bir aşama geriden ama tüm deney boyunca paralel olarak ilk kristali takip etmektedir. Böylece aynı koşullarda yapılan deneylerde her zaman her iki kristalin bir biriyle kıyaslama ve cihazdan kaynaklanan hataların incelenme imkanı sağlanmıştır. Kristaller ilk aşamada 0.5 M NaOH (Sodyum hidroksit, Sigma, ABD) çözeltisinde 30 dakika reaksiyona sokulmuş, daha sonra kristaller sırasıyla 30 dakika asetonda ( $CH_3COCH_3$ , Aklar kimya, Türkiye) ve 30 dakika metanolde ( $CH_3OH$ , Aklar kimya, Türkiye) bekletilerek etkileştirilmiştir (Şekil 3.7). Böylelikle Ag elektrotların her türlü kirliliğe karşı temizlenmesi sağlanmıştır. Son olarak kristaller 30 dakika boyunca deiyonize suyla (pH; 7) yıkama işlemi yapılmıştır. Son yıkama işleminin amacı fiziksel olarak tutunan moleküllerin kristal yüzeyinden ayrılmasını sağlamaktır. Fiziksel olarak adsorbe olan moleküllerin kristal yüzeyinden elimine edilmesi sonrası kristal etüvde  $37^\circ C$ 'de kurutulur (yaklaşık 30 dakika). Kuartz kristallerin frekans değişimleri ön işlemler sırasında ölçülerek yapılan yüzey temizleme yöntemi takip edilmiştir.



**Şekil 3.7.** Kuartz Kristal Yüzey aktivasyonunun şematik gösterimi.

### 3.3.2. Birinci Sistamin immobilizasyonu

Kuartz kristallerin yüzey temizleme aşamasından sonra kristal yüzeylerine bifonksiyonel bir molekül olan Sistamin (C<sub>2</sub>H<sub>7</sub>NS, Sigma, ABD) immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. Sistamin molekülü bir tiyol(SH) ve birde amin(NH<sub>2</sub>) olmak üzere iki fonksiyonel uca sahiptir. Yumuşak bir baz olan sistamin molekülünün bu özelliğinden yararlanılarak tiyol ucundan, gene yumuşak bir asit olan Ag kristal yüzeyinden tutturulup ve diğer amin ucu fonksiyonel olarak başka bağ için hazır tutulmuştur. Bu amaçla 18 mM derişimde sistamin, fosfat tamponunda (0.1 M pH= 7) (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>/NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, Sigma, ABD) çözülmüştür (Şekil 3.8). Deneyde sistaminin hangi derişimde daha fazla immobilizasyon olduğunu araştırmak için sistamin karakterizasyon deneyleri yapılmıştır. Bunun doğrultusunda, sistaminin 6, 10, 12, 14, 18, 22 ve 24 mM derişimlerinin immobilizasyon değerleri elde edilmiştir. Kristaller elde edilen çözelti içinde 2 saat süreyle karanlık ortamda reaksiyona sokulmuştur. Süre sonunda kristaller deiyonize suyla 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama işleminde sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür.

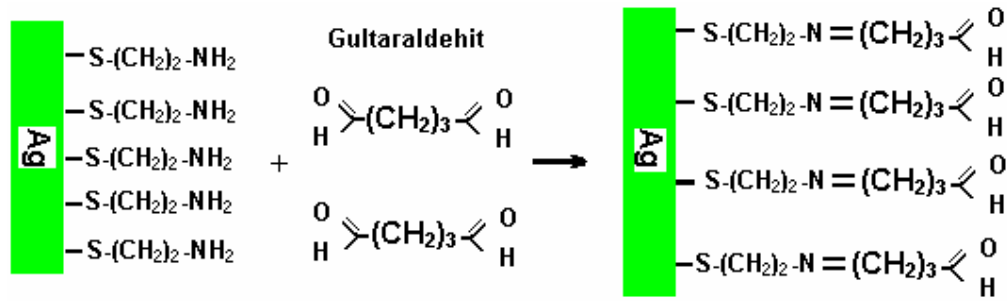


**Şekil 3.8.** Kuartz Kristal Yüzeyine Sistamin Immobilizasyonunun şematik gösterimi.

### 3.3.3. Glutaraldehit(GA) immobilizasyonu

Sistamin immobilize kuartz kristallerin üzerine uzatma kolu (spacer arm) takılması amacıyla yine bifonksiyonel özelliğe sahip olan gluteraldehit ( $\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$ ) kullanılmıştır. Burada amaç sistaminin serbest olan amin ucu ile gluteraldehitin aldehit uçlarının reaksiyona girmesi ve şift bazı reaksiyonu ile bağlanmalarının sağlanmasıdır (Şekil 3.9).

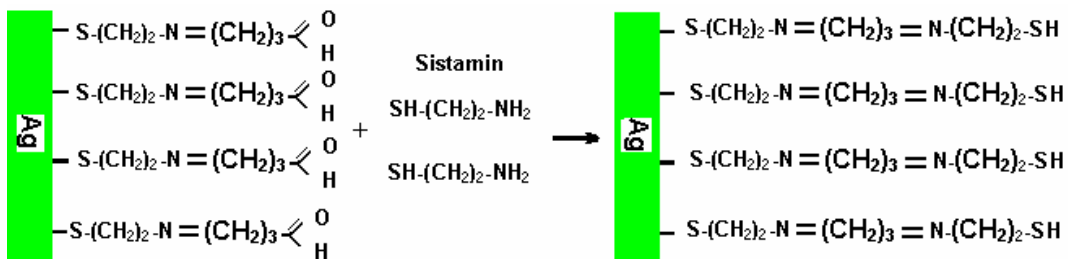
Bunun için Sistamin immobilize kuartz kristaller 0.66 M gluteraldehit ile sodyum tetraborat/HCl tamponuna pH: 8.2 karanlık ortamda reaksiyona sokulmuştur. Kristaller reaksiyon ortamında 2 saat süreyle reaksiyona sokulmuş ve süre sonunda deiyonize suyla 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.9. Sistamin immobilize kuartz kristallerin Yüzeyine GA Immobilizasyonunun şematik gösterimi.

### 3.3.4. İkinci Sistamin immobilizasyonu

Glutaraldehit takılı kuartz kristallerin yüzeylerinde açıkta kalan ikinci aldehit yararlanılarak sistamin ikinci kez immobilize edilmiştir. Burada amaç bu defa sistaminin amin fonksiyonel ucunu kullanmak ve tiyol fonksiyonel ucunun açıkta kalmasını sağlamaktır (Şekil 3.10).



Şekil 3.10. Kuartz Kristal Yüzeyine ikinci Sistamin Immobilizasyonunun şematik gösterimi.

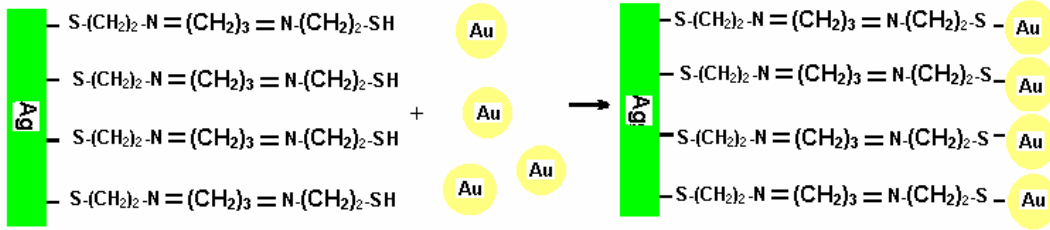
Bu amaçla yine yukarıda anlatılan yöntem kullanılmıştır. 18 mM derişimde sistamin fosfat tamponunda (0.1 M pH: 7) ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4/\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , Sigma, ABD) çözülmüştür. Kristaller elde edilen çözeltili içinde 2 saat süreyle karanlık ortamda reaksiyona sokulmuştur. Süre sonunda kristaller deiyonize suyla 15 dakika boyunca yıkanmıştır. Yıkama işleminden sonra kurutulup frekans değerleri ölçülmüştür.

### 3.4. Altın nanopartikül immobilizasyonu

Çalışmanın bu bölümünde yüzey modifikasyon işlemleri tamamlanmış olan kuartz kristaller çalışmada asıl amaç olan, altın nanopartikülleri immobilize etmek için hazır hale gelmiştir.

Deneyin bu aşamasında altın nanopartiküller ve tiyol gurupları yine yumuşak asit ve baz teorisine dayanarak kristal yüzeyine immobilize edilmişlerdir.

Bu amaçla kuartz kristaller hazırlanan altın nanopartikül çözeltilisine 2 saat süreyle daldırılarak nanopartiküllerin tiyol uçlarına bağlanması sağlanmıştır (Şekil 3.11). Bu aşamada kritik olan nokta, immobilizasyonu yapılan altın nanopartiküllerin oldukça eş boyutlu olmalarıdır. Altın nanopartiküller ne kadar eş boyutlu olurlarsa düzenli olarak kendiliğinden yerleşme yöntemi doğru çalışır ve immobilizasyon başarıyla gerçekleşir. İşlem sonunda kristaller deiyonize suyla 15 dakika boyunca yıkanmış, kurutulmuş ve frekans değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3.11. Kuartz Kristal Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İmmobilizasyonunun şematik gösterimi.

#### 3.4.1. Altın Nanopartiküllerin AFM ile görüntülenmesi

Kuartz kristal yüzeyine immobilize olan altın nanopartiküller AFM ile aşağıda izlenen yöntemle görüntülenmiştir. AFM yüzey topografisini mikron altından, 100 mikrona kadar ölçebilen bir metodudur. Çok duyarlı uc (TİP) yüzeyi taramasıyla Atomik seviyedeki kuvvetleri(nN) ölçebilir. AFM 10 pm ( $10^{-12}$ ) çözünürlükte çalışır ve elektron mikroskoplarının aksine hava ve sıvı içinde örneklerle bakabilir.

## AFM' nin Teori ve Yapısı

AFM'nin iğnesi örnek üzerinde hareket eder ve iğne-örnek arasındaki itme ve çekme kuvvetlerini ( $10e^{-11}$ – $10e^{-6}$  Newton) ölçer (Şekil 3.12). İğne denilen yaya tutturulmuştur. Lazer kaynağından gelip dirsekten yansıyan ışın pozisyona duyarlı fotodetektöre gelir. İki fotodiyotun sinyali arasındaki fark lazer spotunun pozisyonunu belirler. Bu dirseğin yükseklik bilgisi bilgisayara gönderilip x ve y pozisyonuna karşı kayıd edilir. STM'de olduğu gibi 3 boyutlu veri kullanılarak topografik grafik görünüm elde edilir.

## AFM Çalıştırma Yöntemi

“**Contact Mode**” yöntemi ilk geliştirilen yöntemdir. Bu modda dirseğin ucundaki iğneyle yüzey arasında hafif bir fiziksel dokunma vardır. İyonik itme başrol oynamaktadır. Normal havada dirsek ve yüzeyin temasında örnek yüzeyi nitrojen ve ince bir su tabakasıyla kaplıdır. Bu yüzey gerilimi yüzünden örnek üzerinde ekstra bir güç oluşturmaktadır. Sıvı içinde alınan örneklerde bu olmamakta birlikte sürtünme hatası ortaya çıkmaktadır.



Şekil 3.12. Deneylerde kullanılan AFM Cihazı.

### 3.5. Tek sarmal DNA immobilizasyonu

Tiyol modifiye gurubu içeren ssDNA (20 Timinden oluşan): 5'-SH-TTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT ve tiyol modifiye gurubu içermeyen eşleniği (20'lik Adenin): 5'-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA (TIB Mobil) kullanılmıştır. Öncelikle altın nanopartiküllerin tiyol gurubuyla çok iyi bir etkileşim sağladığı için, tiyol gurubu içeren ssDNA (SH-ssDNA) kristal üzerine immobilize edilmiştir. Bu amaçla aşağıdaki immobilizasyon yöntemi uygulanmıştır:

1. 6500 µl Tiyol uçlu ssDNA (SH-ssDNA), deiyonize suda çözülmüştür ve böylece 20 µM lık DNA çözeltisi hazırlanmıştır. Immobilizasyonun ilk aşaması olarak SH-ssDNA'nın altın nanopartikül kaplı kristal üzerinde farklı derişimleri (0.1, 0.4, 0.8, 1, 1.2, 1.4 ve 2 µM) derişimleri denenmiş ve en uygun derişim belirlenmiştir.
2. Tiyoller arasındaki disülfid bağlarını engellemek için 100 µl 1µM SH-ssDNA çözeltisine bu çözeltinin 1/5 oranında (ki bu oran standart olarak belirlenmiştir), 20 µl dithiothreitol (DTT, Sigma ABD) (1M DDT 0.1 M fosfat tamponunda pH=8.3-8.5) oda sıcaklığında, eklenmiştir (Nicole Acevedo, 2001).
3. Bu çözeltide hazırlanan SH-ssDNA, fosfat tamponunda (pH= 6.7) 600 devir/dakika hızıyla karıştırılarak nanopartikül kaplı kristal üzerine immobilize edilmiştir. Buradaki fosfat tamponunun SH-ssDNA'nın immobilize olmasında elektrostatik olarak ve tamponun iyonik güç bakımından önemli olduğu için, fosfat tamponunun farklı derişimlerde (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 ve 1 M) denenmiş ve en etkili derişim immobilizasyon aşamasında değerlendirilmiştir. Ayrıca SH-ssDNA'nın immobilizasyonu üzerinde zaman faktöründe etkisi denenmiş ve en etkili süre seçilmiştir. Bu aşamanın sonunda kristaller deiyonize suyla yıkanıp frekans derişimleri incelenmiştir.
4. Tiyol modifiye olmuş DNA'ların (SH-ssDNA), non spesifik ve yatay şekilde bağlanmaları engellemek için, SH-ssDNA immobilize olmuş kristaller 1 mM 6-mercapto-1-hexanol (Fluka, Deisenhofen, Germany) sulu çözeltide 1 saat boyunca normal oda koşullarında tutulmuştur (Munlika Satjapipat, 2001). Sonra kristaller suyla yıkanıp kurutulmuştur. Bu aşamanın sonunda frekans derişimleri izlenmiştir.

### **Hibridizasyon:**

SH-ssDNA'ların immobilize olduklarından sonra bu aşamada tiyol uçlu ve timin bazlı ssDNA eşleniği olan adenin bazlı ssDNA'yla Hibridizasyonun sırası gelmiştir. Aslında bu hibridizasyon aşamasının başarılı olması, tasarlanmış olan DNA sensörünün çalıştığı ve tamamlanması anlamına gelmektedir. Hibridizasyon, DNA'ların katalogunda erime sıcaklığı olarak belirlenen (55°C) gerçekleştirilmektedir ve kesinlikle bu sıcaklığın üzerine çıkmamaya (mesela 75°C) dikkat etmek gerekmektedir çünkü bu durumda yüzeye immobilize edilmiş olan komplementlerin yüzeyden kopmaları tespit edilmiştir. Bunun doğrultusunda, ssDNA'lar ve kristal üzerine immobilize olan SH-ssDNA'lar 55°C' de TE -1 M NaCl (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) tamponunda 10 dakika boyunca ısıtılıp sonra DNA'lar soğutularak oda sıcaklığında bekletilmiştir böylece hibridizasyon gerçekleştirilmiştir (Tonya M. Herne and Michael J. Tarlov, 1997). Hibridizasyon üzerinde zaman faktörünün etkisini belirlemek için deneyler yapılmış ve etkili olan süre değerlendirilmiştir.

Hibridizasyondan sonra kristaller bir kaç defa 10 saniye boyunca 1ml TE' ye daldırılıp, sonra kristaller kurutulup ve frekans değişimleri incelenmiştir.

Kristaller üzerinde altın nanopartikül immobilizasyonundan, amaç yüzey alanının genişletmesidir. Bu amacı elde edilip edilmediğini anlamak için aynı koşullarda bir altın nanopartikül kaplı kristal ve birde boş kristal üzerinde DNA immobilizasyon ve hibridizasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir ve elde edilen sonuçlar birbiri ile kıyaslanmıştır.

## **4. DENEYSEL BULGULAR VE TARTIŞMASI**

Bu bölümde daha önce “deneysel yöntemler” bölümünde anlatılmış olan deneylerin sonuçları tartışılmıştır. Bu bölüm altın nanopartiküllerin üretim ve karakterizasyonlarını, altın tuzu ve sodyum sitrat derişimi ile karıştırma hızının etkisini kapsamaktadır. Zeta sayıcıdan alınan veriler bu aşamaların sonuçlarını daha detaylı olarak vermektedir. Daha sonraki kısımlarda kristal yüzey modifikasyonu ve altın nanopartiküller immobilizasyonunun sonuçları gösterilmiştir. Yıkama, birinci sistamin immobilizasyonu, glutaraldehit immobilizasyonu, ikinci sistamin immobilizasyonu ve son olarak altın nanopartikül immobilizasyonu ile bunların her birinin derişimlerinin etkisi incelenmiştir. Altın immobilize edildikten sonra kristal yüzeyinin AFM ve SEM görüntüleri verilmiştir. Çalışmanın son bölümünde ise ssDNA ile etkileşim çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

### **4.1. Altın nanopartikül sentezlenmesi**

Elde edilen altın nanopartikülleri Zeta sayıcı’da inceledikten sonra ve indirgenme reaksiyonundan da beklenildiği gibi, bu partiküllerin ortamdaki sitrat iyonlarından dolayı eksi yüke sahip olmaları gerekir, bu eksi yük -4.7mV olarak altın partiküller için tespit edilmiştir. Benzer bir çalışmada Nagasaki, Y. ve Kataoka, K. 2005 yılında altın nanopartikül sentez sırasında 0- (-5mV) arasında zeta potansiyel sonuçları elde etmişler.

#### **4.1.1. Altın nanopartikül karakterizasyonu**

##### **4.1.1.1. Başlangıç altın tuz derişiminin etkisi**

Sunulan çalışmada altın nanopartikül elde etmek için izlenen yöntem, tetra kloroaurik asidin ( $\text{HAuCl}_4$ ) sodyum sitratla indirgenme metodudur. Bu yüzden bu indirgenme reaksiyonunda başlangıçta reaksiyona giren altın tuzunun derişimi ve buradan elde edilen  $\text{AuCl}^-$  miktarı, sitrat iyonları tarafından indirgenmesi için önemli faktörlerden biridir (Yi Xiao, 1999). Çizelge 4.1’de görüldüğü gibi deneylerde istenen ve altın tuzunun derişimi için uygun olan aralık 0.1 ile 0.06 mM aralığındadır. Diğer bir taraftan reaksiyon sonunda elde edilmiş olan sonuç pH değerleri, indirgenme reaksiyonunun tam olarak gerçekleşip gerçekleşmediğini göstermektedir. Zeta sayıcının partiküller için verdiği değer partiküllerin ortalama

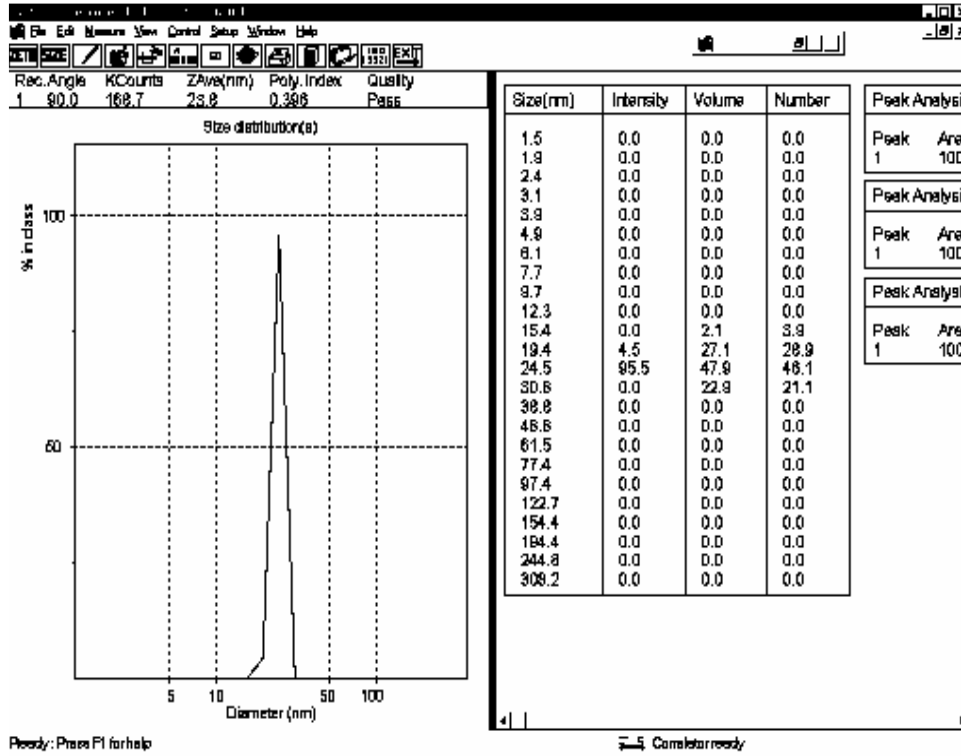
boyutudur. Zeta sayıcının verdiği bilgiler ve grafik incelendiği zaman, dikkat edilmesi gereken önemli noktalar bulunmaktadır.

**Çizelge 4.1.** Farklı altın tuzu derişimlerinin partikül boyutu üzerinde etkisi.\*

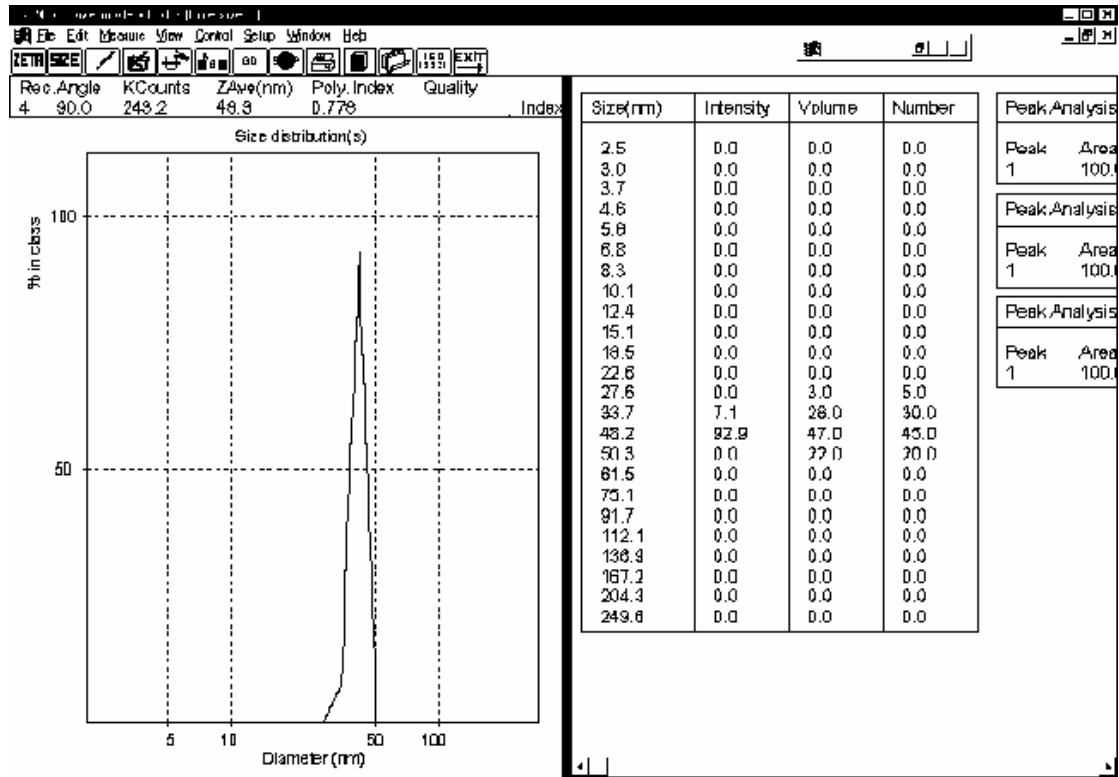
Altın tuzu Ve su oranı	Altın tuzu (mM)	Final pH	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)	Görüntü
1/10	0.0300	5.83	mikro partikül	————	Şeffaf
1/8	0.0375	5.68	mikro partikül	————	Şeffaf
1/6	0.050	5.72	120±12	84.6↔130.1	Şeffaf
1/5	0.060	3.32	23±2.3	19.4↔30.8	Şeffaf
1/4	0.075	3.35	48±4.8	33.7↔50.3	Şeffaf
1/3	0.10	3.30	80±8.0	61.0↔101.6; 237.0↔281.9	Şeffaf
1/2	0.15	2.34	agregat oluşumu	————	Bulanık+
1/1	0.30	1.98	agregat oluşumu	————	Bulanık++

\*Sodyum sitrat derişimi (0.17mM).

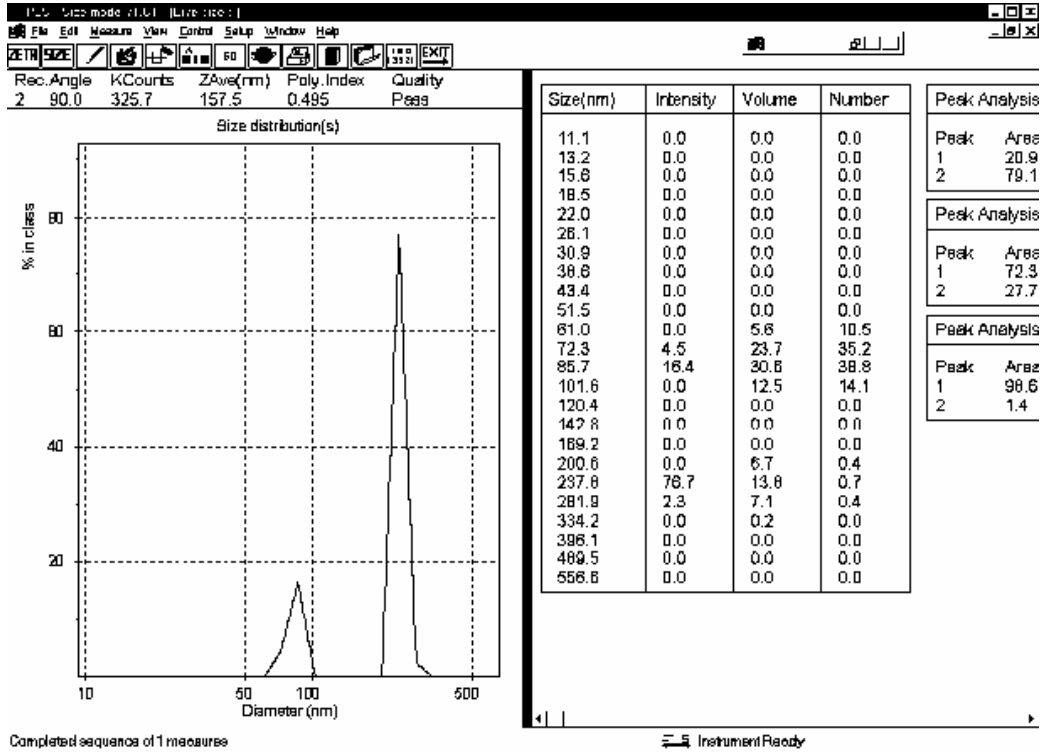
Zeta sayıcının verdiği boyut dağılım grafiğinde, pik sayısı önem taşımaktadır. Tek bir pik görülmesi halinde, zeta sayıcının verdiği boy ortalaması partiküllerin gerçek boyutunu göstermektedir. Zeta sayıcının boy dağılım grafiğinde birden fazla pik varsa, zeta sayıcının partiküller için verdiği boyut, sayı ve hacim oran tablosuna dikkat etmek gerekir. Bu tabloda hangi boyut daha fazla sayı veya hacim oranına sahip olursa, o boyut bu örneğin partikül boyutu olarak kabul edilmiştir (Şekil 4.1, 4.2, 4.3). Zeta sayıcının verdiği partikül boyutlarının %10 hataya sahip oldukları belirlenmiştir.



Şekil 4.1. 23 nm boyutlarındaki partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.



Şekil 4.2. 48 nm partiküller için verilen zeta sayıcı bilgileri.



Şekil 4.3. 80 nm partiküller için verilen zeta sayıcı bilgileri.

#### 4.1.1.2. Sodyum Sitrat Derişiminin Etkisi

Altın nanopartikül karakterizasyonunun bir başka önemli faktörü, sentez reaksiyonunda indirgenme ajanı olarak kullanılan sodyum sitrat derişimidir. Sodyum sitrat suda hidroliz olduktan sonra sitrik asit'e dönüşmektedir. Ortamda üretilen sitrat iyonları, tetrakloroaurik asitin  $AuCl_4^-$  iyonlarına indirgemektedir. Buradaki sitrat iyonlarının miktarı ve ona bağlı olarak sodyum sitrat derişiminin etkisi yapılan deneylerle incelenmiştir. Benzer bir çalışmada Andrew N. Shipway ve arkadaşları 2000 yılında, eklenen sodyum sitrat miktarına karşın, altın nanopartikül boyutlarının değişimlerini incelemişler. Bu çalışmada eklenen sodyum sitrata karşın 16- 147 nm aralığında partiküller elde etmişler. Sunulan çalışmada altın tuzu derişimi 0.06mM sabit tutularak eklenen sodyum sitrat derişimine karşın 25- 50 nm partiküller elde edilmiştir.

Çizelge 4.2'de görüldüğü gibi, sodyum sitratın çok düşük derişimlerinde reaksiyona hiçbir etkisi yoktur. Bu ortamda altınları indirgemek için yeteri miktarda sitrat iyonlarının hidroliz edilmediği anlamına gelmektedir. Sodyum sitrat konsantrasyonu arttıkça indirgenme reaksiyonu başlamakta ve devam etmektedir.

**Çizelge 4.2.** Farklı derişimlerde sodyum sitrat kullanımının partikül boyutu üzerindeki etkisi.\*

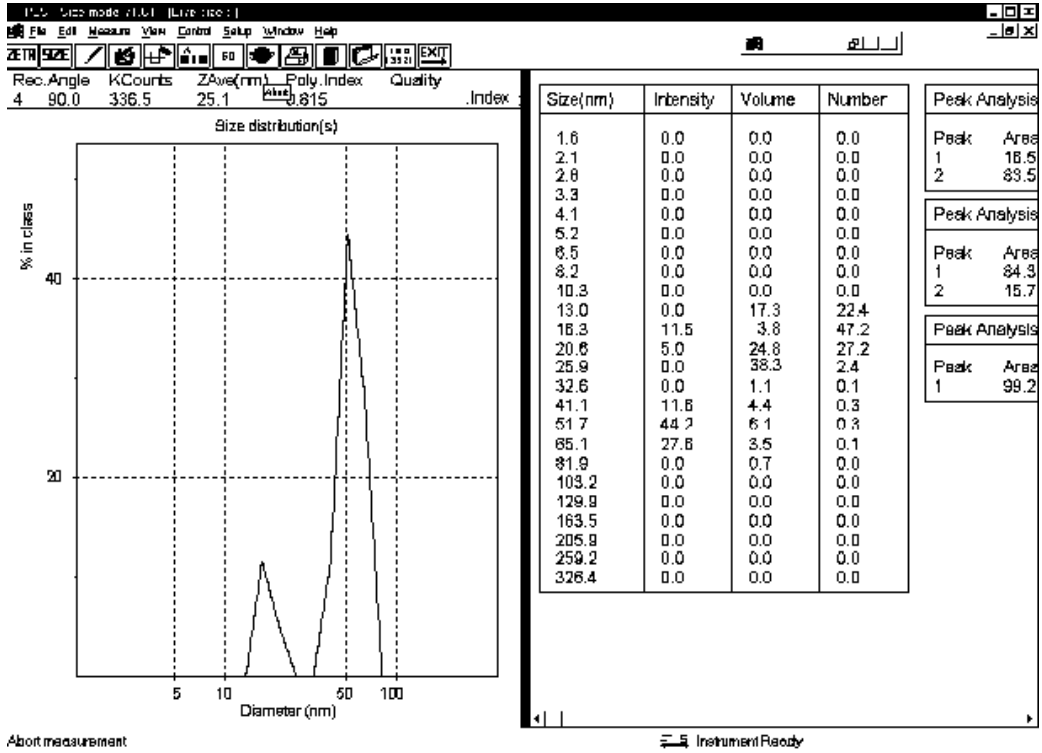
Sodyum sitrat (mM)	Final pH	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)	Görünüm
0.010	1.98	sentez olmadı		
0.025	2.15	sentez olmadı		
0.050	2.49	sentez olmadı		
0.075	2.82	agregat oluşumu	_____	Bulanık++
0.10	2.88	agregat oluşumu	_____	Bulanık+
0.15	3.18	25.1±2.5	13.0↔25.9; 44.1↔65.1	Şeffaf
0.25	3.35	35.3±3.5	33.7↔50.3	Şeffaf
0.35	4.27	37.4±3.7	26.5↔42.0; 330.0↔529.2	Şeffaf
0.50	4.79	50.4±5.0	6.0↔8.0; 40.0↔60.4; 100.5↔159.3	Şeffaf

\* Altın tuzu derişimi (0.06mM).

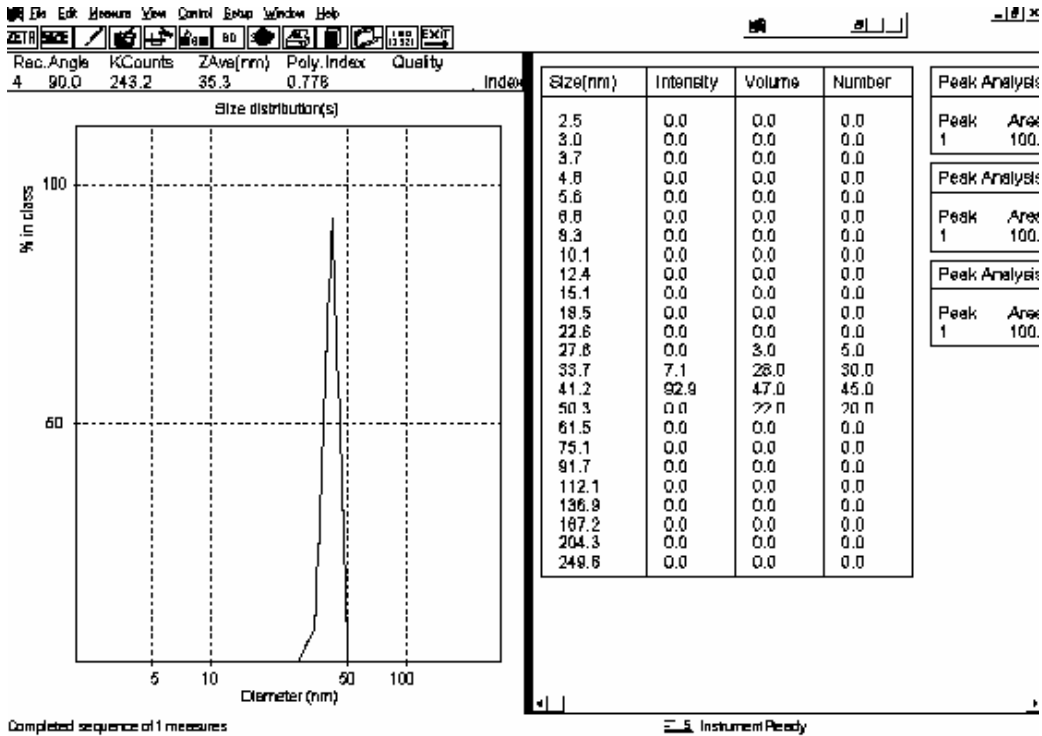
sodyum sitrat konsantrasyonu arttıkça, partiküllerin boyutlarında da artış gözlenmiştir. Yani sitrat iyonları ortamda çok fazla olduğu zaman indirgedikleri altınları daha büyük parçalara böldükleri tespit edilmiştir (Şekil 4.4). Benzer bir araştırmada Keisaku Kimura ve Suguru Takashima, 2002 yılında, yüksek sodyum sitrat derişimlerinde, sitrik asidin güçlü bir indirgenme ajanı konumuna girdiğini gözlemiştir. Bu çalışmada 1 mL 24.3 mM H<sub>AuCl</sub><sub>4</sub> ve bu reaksiyonda indirgenme ajanı olarak eklenmiş olan 106 mL 2.2 mM sodyum sitratın sentez reaksiyonu sonucunda, elde edilmiş olan partiküller ~25 nm olarak ölçülmüştür.

Partikül boyutlarının sitrat derişiminin her aşamasında pH'nın artışıyla doğru orantıda olması önemli bir noktadır. Elde edilen sonuç pH değeri indirgenme reaksiyonunun gerçekleşme oranını göstermektedir.

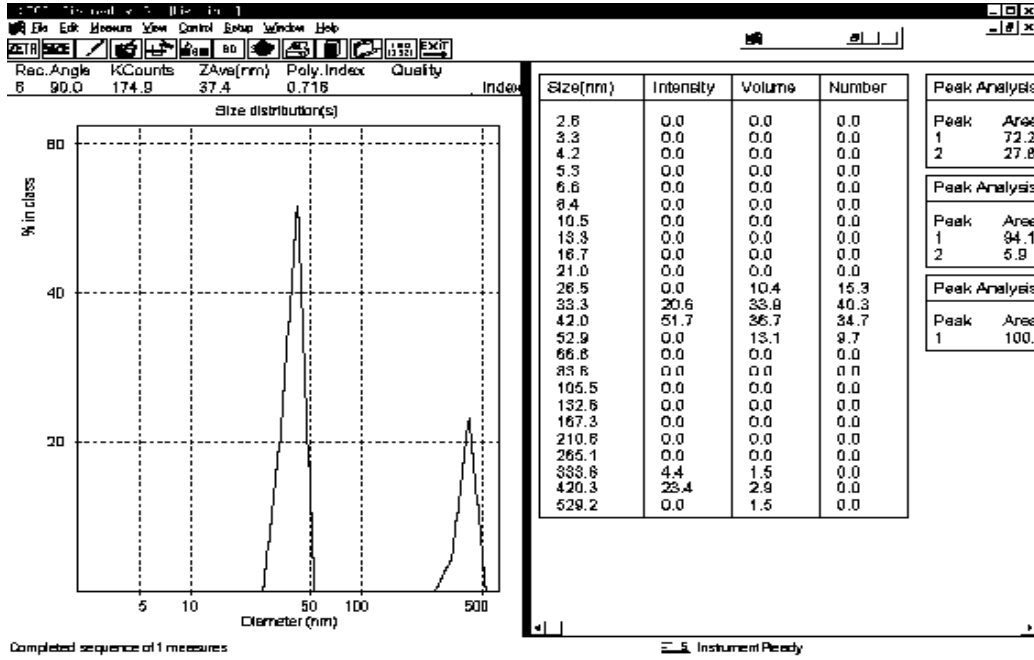
**Deneysel Bulgular ve Tartışılması**



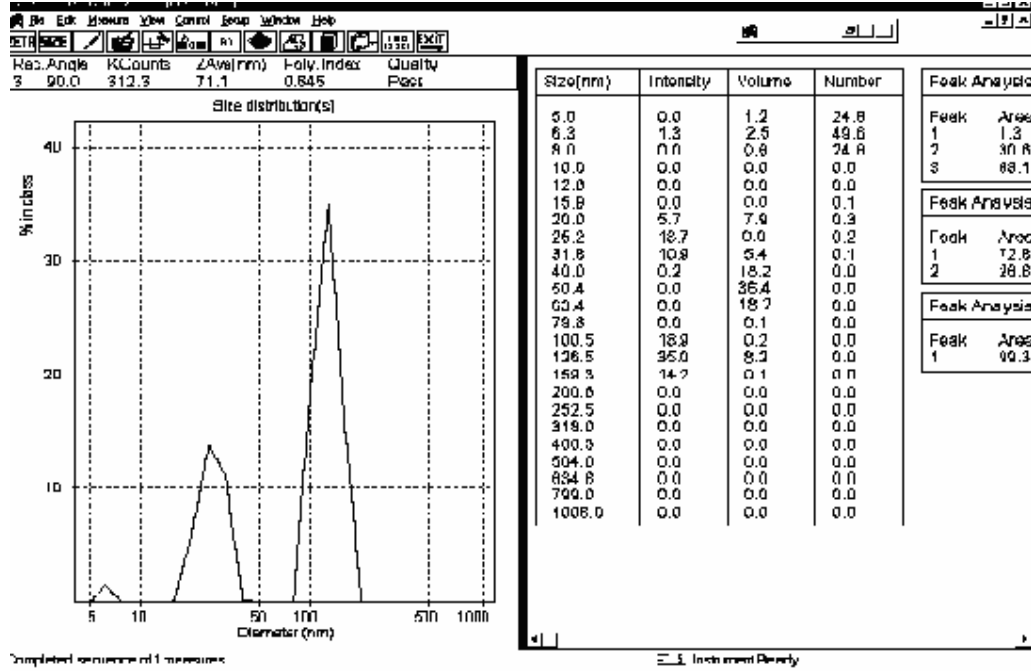
(a) 25 nm partiküllerin zeta sayıcının bilgileri.



(b) 35 nm partiküllerin zeta sayıcının bilgileri.



(c) 37 nm partiküllerin zeta sayıcının bilgileri.



(d) 50 nm partiküllerin zeta sayıcının bilgileri.

Şekil 4.4. Sodyum sitrat derişiminin partiküllerin boyutları üzerinde etkisini gösteren zeta sayıcı sonuçları. (a) 25 nm, (b) 35 nm, (c) 37 nm ve (d) 50 nm.

#### 4.1.1.3. Karıştırma hızının etkisi

Bu bölümde karıştırma hızının partikül boy ve boy dağılımına etkisi incelenmiştir. Bu amaçla altın tuzu 0.06 mM ve sodyum sitrat 0.15 mM da sabit tutularak karıştırma hızı değiştirilmiştir.

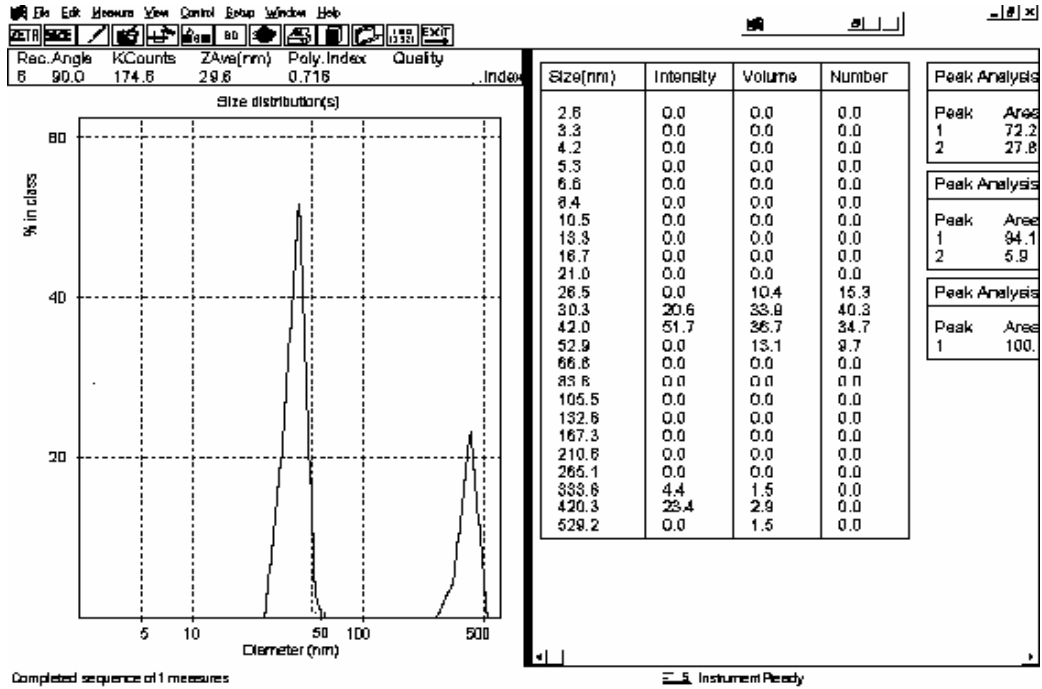
**Çizelge 4.3.** Karıştırma hızının partikül boyutları üzerindeki etkisi.\*

Karıştırma hızı Devir/Dakika	Final pH	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)	Görünüm
300	2.96	42.0±4.2	26.5↔52.9; 333↔528	Bulanık+
400	3.22	25.9±2.5	13.0↔32.6; 41.1↔81.9	Şeffaf
500	3.08	16.3±1.6	10.3↔31.1; 40.0↔71.9	Şeffaf
600	3.00	4.2±0.4	1.5↔4.2; 20.9↔126.4	Şeffaf
800	3.07	3.2±0.3	"2.6↔4.1; 8.2↔12.9; 51.5↔81.7; 205.2↔258.9"	Şeffaf

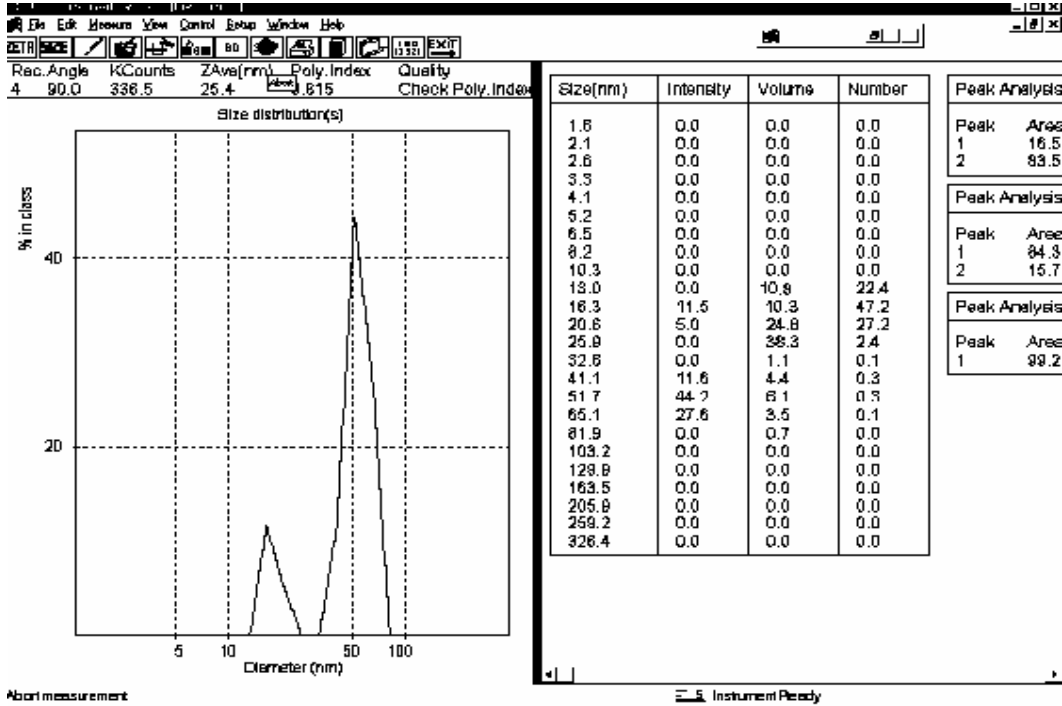
\*Altın tuzu derişimi (0.06mM), sodyum sitrat derişimi (0.15mM).

Bu aşamada elde edilen deney sonuçları (Çizelge 4.3) altın nanopartikül indirgenme reaksiyonunun başka boyutlarını göstermektedir. Düşük karıştırma hızında indirgenme reaksiyonunun tam olarak sonuçlanmadığı gözlemlenmiştir. Burada karıştırma hızının düşük olması nedeniyle eşit ısı dağılımı tam olarak sağlanamamış ve ortamda yeteri kadar sodyum sitrat olmasına rağmen, hidroliz reaksiyonu ve onun sonucunda sitrik asit oluşumu gerçekleşmemiştir. Reaksiyon sonunda elde edilen sonuç pH değerleri, indirgenme reaksiyonunun gerçekleşme oranının bir göstergesidir. Sonuç pH değerinin düşük olduğu durumlarda ve pH=3.00 seviyesine gelmeden nanopartiküller tam olarak sentezlenememiştir ve şeffaf bir görünüme de sahip değillerdir (Şekil 4.5).

**Deneysel Bulgular ve Tartışılması**

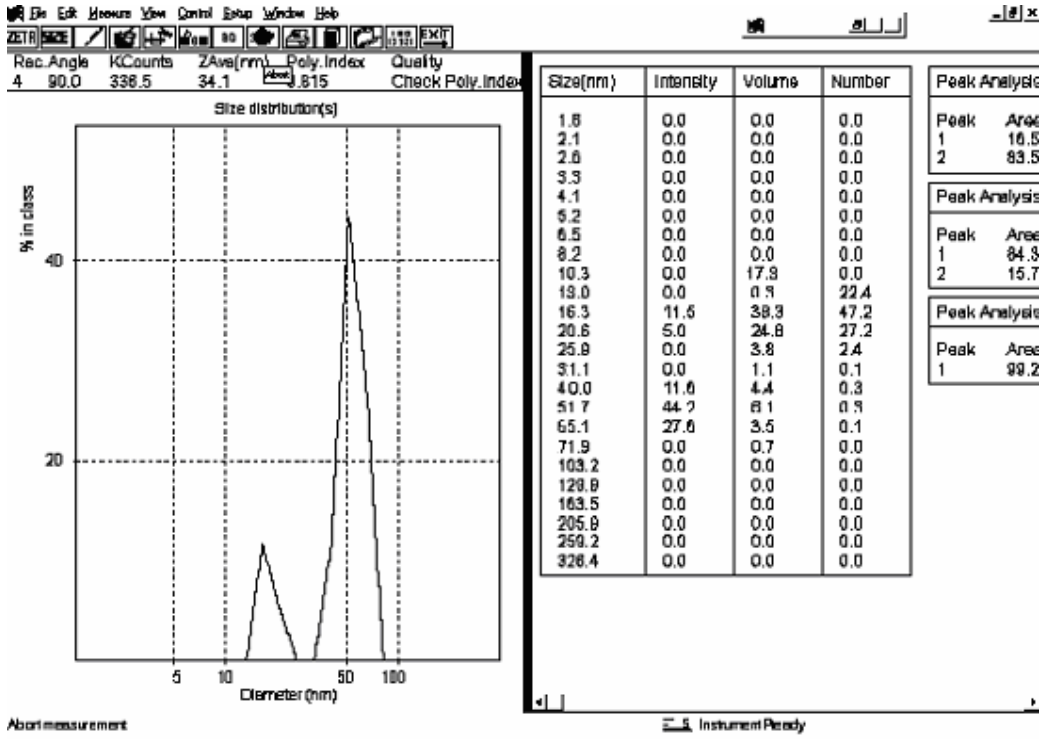


(a) 42 nm partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.

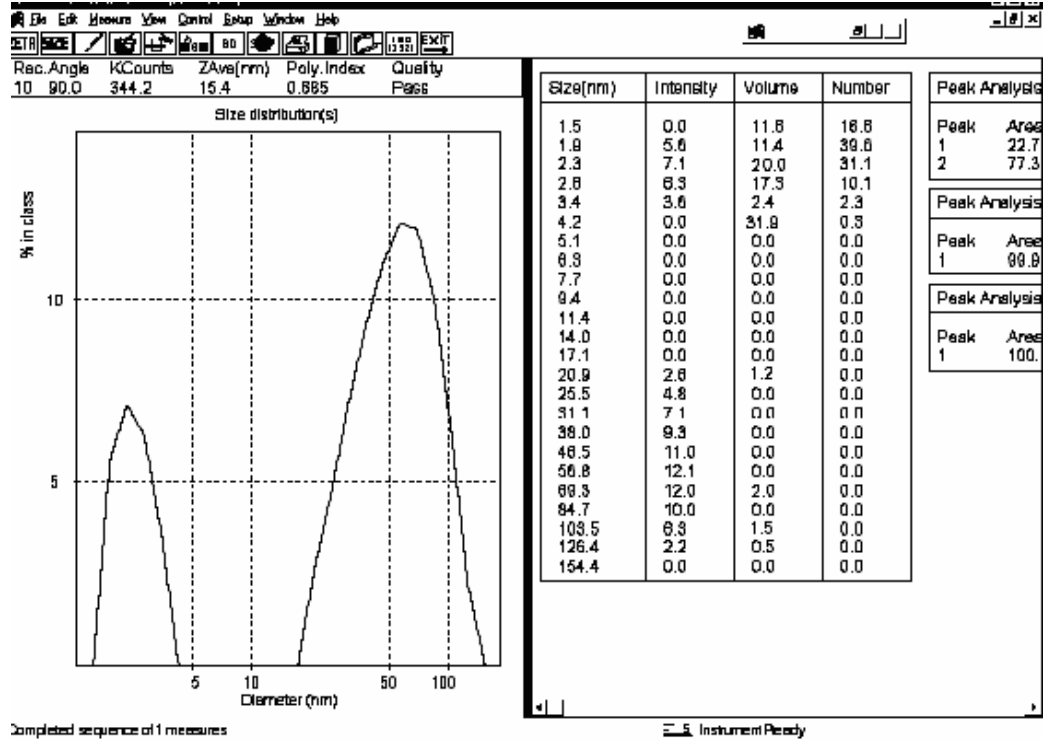


(b) 25 nm partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.

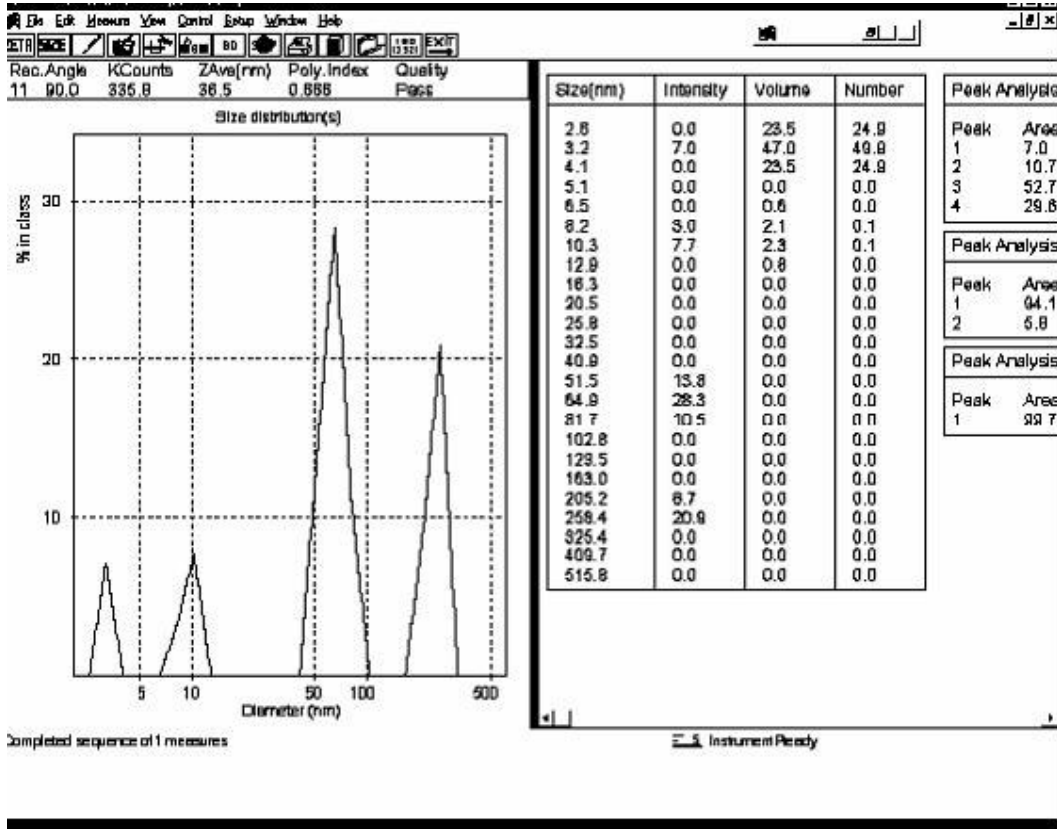
**Deneysel Bulgular ve Tartışılması**



(c) 16 nm partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.



(d) 4 nm partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.



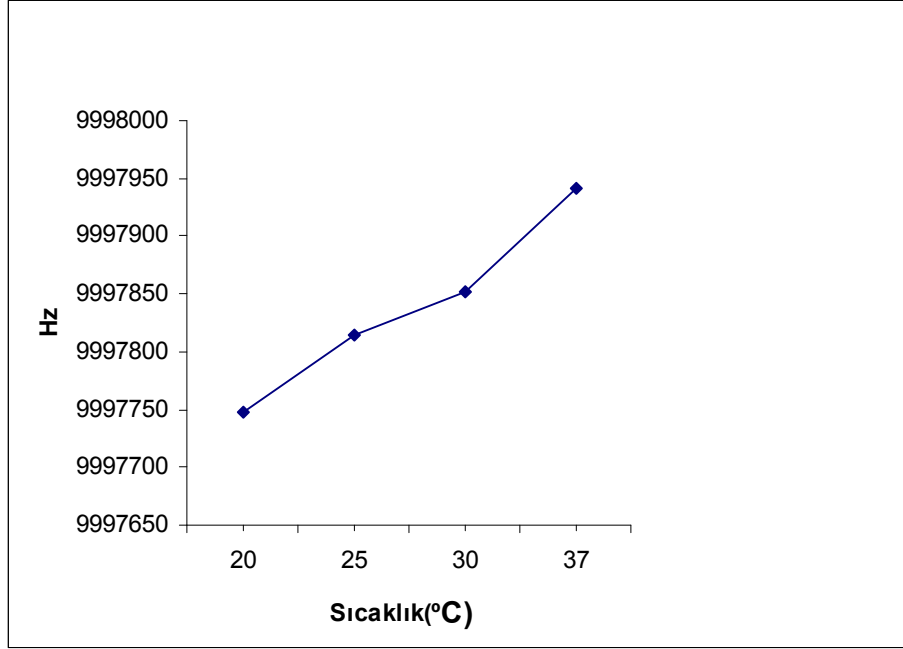
(e) 3 nm partiküllerin zeta sayıcı bilgileri.

Şekil 4.5. Karıştırma Hızının partiküllerin boyutları üzerinde Etkisini gösteren zeta sayıcı sonuçları. (a) 42 nm, (b) 25 nm, (c) 16 nm, (d) 4 nm ve (e)3 nm.

## 4.2. Kristal yüzey modifikasyonu

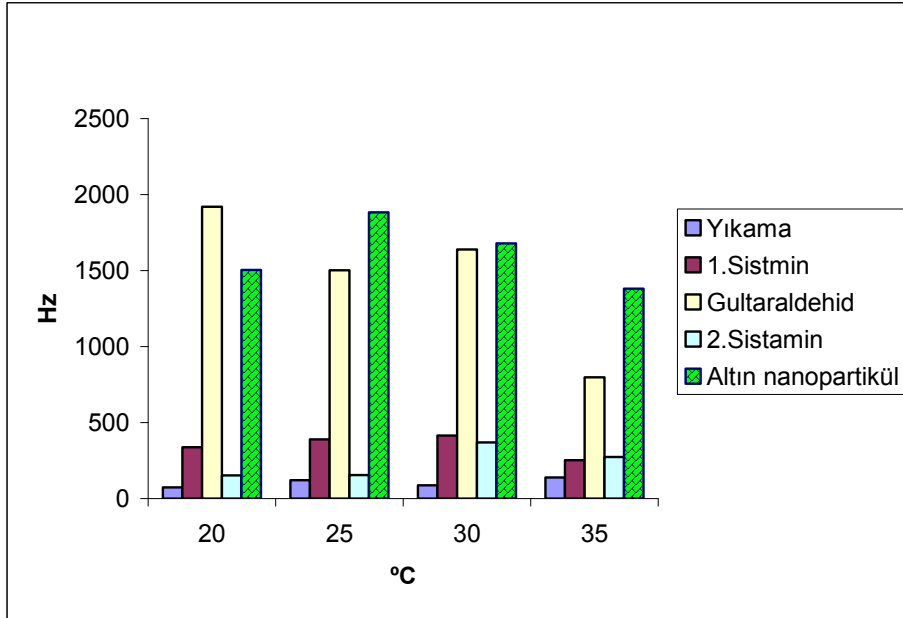
### 4.2.1. Sıcaklık etkisi

Kuartz kristaller sıcaklık ve neme çok duyarlıdır ve bu duyarlılık kristallerin dezavantajı olarak sayılmaktadır. Boş kristallerde sıcaklığının artmasıyla birlikte kristallerin kayma frekansında artma izlenmiştir (Şekil 4.6). Bu artış yaklaşık olarak doğru orantıyla devam etmektedir. Burada denenmiş olan en yüksek sıcaklık 37°C'dir. Çünkü bundan fazla bir sıcaklıkta biyolojik malzemelerde bozulma ihtimali vardır.

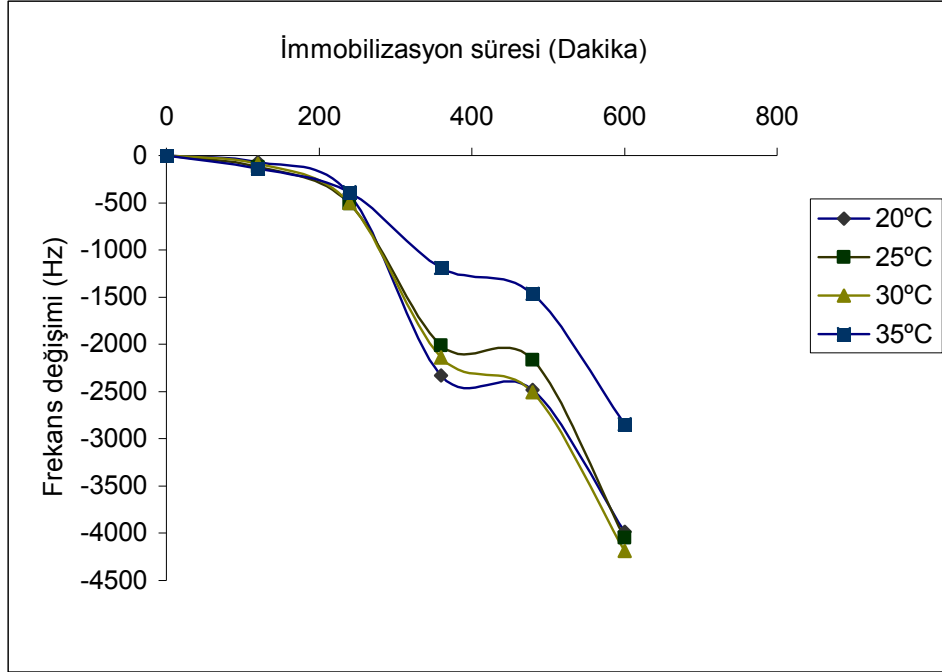


Şekil 4.6. Gümüş kristal frekanslarının sıcaklıkla bağlantısı.

Denenmiş olan bu sıcaklıklardan bir tanesi en uygun sıcaklık olarak belirlenmesi gerekir. Burada en önemli kriter, hangi sıcaklıkta daha fazla altın nanopartikül immobilize edilebildiğidir. Böylece kristalin elektrotun yüzey alanı daha fazla genişleyip ve daha fazla DNA algılayabilecektir.



Şekil 4.7. Ortam Sıcaklığının İmmobilizasyon verimine etkisi.



Şekil 4.8. İmmobilizasyon boyunca sıcaklığın kristallerin frekans değişimindeki etkisi.

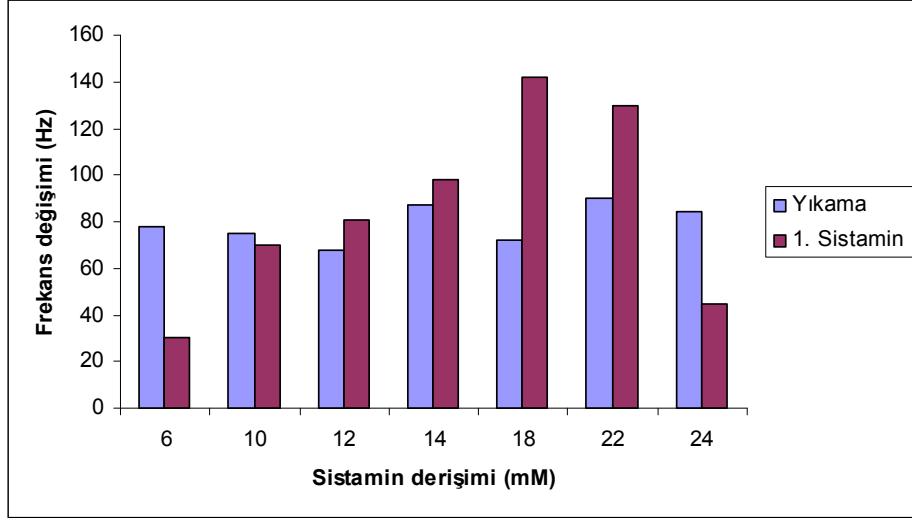
Şekil 4.7 ve 4.8'den de görüleceği gibi, 25°C'de yapılmış olan deneylerde altın nanopartikül immobilizasyonu ve kristal modifikasyon değerleri daha uygun ve daha mantıklı olmaktadır. Bunun yanısıra çalışmanın devamında yapılmış olan DNA immobilizasyonlarının, oda koşullarında gerçekleşmesi gerektiğini dikkate alarak, sıcaklık karakterizasyon deneyinden sonraki tüm deneyler, sabit sıcaklık olarak, 25°C'de yapılmıştır. Benzer bir çalışmada Fernando Patolsky, 1999 yılında altın nanopartiküllerin kuartz kristal üzerindeki immobilizasyonda, 25°C'de olmasını uygun bulmuştur.

#### 4.2.2. Yıkama etkisi

Modifikasyon ve immobilizasyon işlemlerine başlatmadan önce kristal elektrot yüzeyleri yıkama işlemine tabii tutulmuşlardır. Bu aşamada kristaller sodyum hidroksit, aseton ve metanolla temizlenip daha sonra frekans kaymaları ölçülmüştür. Frekans farkı, sodyum hidroksit, aseton ve metanol çözeltilerinin yüzeyde oluşturdukları olası OH gruplarından kaynaklanmıştır. Yıkama aşaması sırasında izlenen frekans değişimi  $100 \pm 20$  Hz olarak tespit edilmiştir.

#### 4.2.3. Birinci sistamin immobilizasyonunda sistamin derişiminin etkisi

Deneyin bu kısmında birinci immobilizasyon aşaması olan, sistamin immobilizasyonunda, sistaminin hangi derişimlerde daha etkili yani daha çok immobilize olduğu araştırılmıştır.

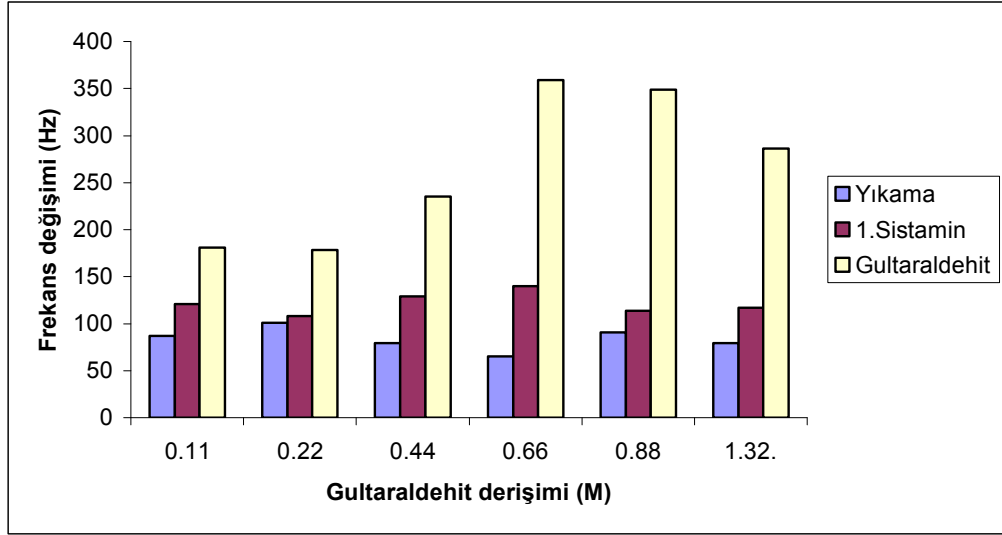


Şekil 4.9 Sistamin derişiminin Birinci Sistamin İmmobilizasyonuna Etkisi.

Buradaki yapılmış olan sistamin immobilizasyon karakterizasyonundaki amaç, yüzeye hangi konsantrasyonda daha çok sistamin immobilizasyonu olduğunu belirlemek ve ona bağlı olarak bu aşamadan sonra daha etkili bir glutaraldehit immobilizasyonunun yapılmasıdır. Benzer bir çalışmada Tonya M. Herne ve Michael J. Tarlov, 1997 yılında altın yüzey üzerinde immobilize olmuş DNA problemlerinin karakterizasyonunda, sistaminin 18 mM derişimini en etkin derişim olarak belirlemişlerdir (Şekil 4.9).

#### 4.2.3. GA derişiminin Etkisi

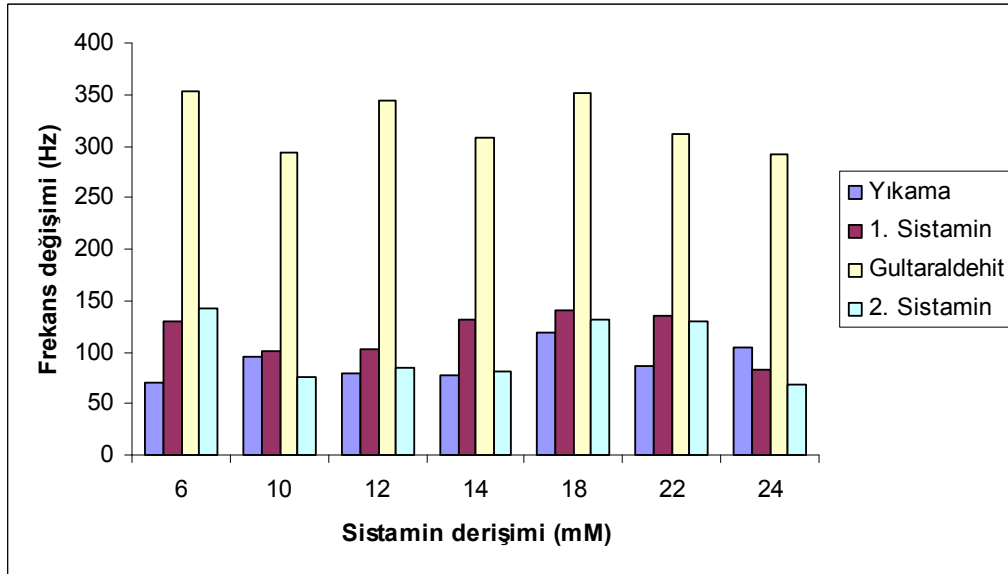
Sistamin immobilizasyonundan sonra glutaraldehit(GA) immobilizasyonu karakterizasyon deneyleri yapılmıştır. Bu deneylerde glutaraldehit derişiminin etkisi incelenmiştir. İlk aşamada, düşük derişimlerde görünen küçük frekans değişimleri GA'nın ortamdaki düşük miktarından kaynaklanmıştır. Ama daha yüksek derişimlerdeki frekans düşüşü, GA'nın kendi üzerine dönüşümlerinden ve istenmeyen bağlarından oluşmuştur (Şekil 4.10). Benzer bir çalışmada Joseph Wang ve arkadaşları, 2002 yılında, kuartz kristal üzerindeki sistamin ve glutaraldehitin şift baz reaksiyonu için, 0.6 M derişimini uygun bulmuşlardır.



Şekil 4.10. Glutaraldehit derişiminin immobilizasyona etkisi.

#### 4.2.4. İkinci Sistamin İmmobilizasyonunda Sistamin derişiminin etkisi

Glutaraldehit immobilizasyonundan sonra, GA ile çift baz reaksiyonu yapmak üzere ikinci sistamin immobilizasyonu yapılmıştır. Bu aşamada daha önceki sistamin immobilizasyon sırasında yapılan derişim araştırma çalışmaları, ikinci sistamin immobilizasyonunda da aynı şekilde yapılmıştır.



Şekil 4.11. Sistamin derişiminin ikinci sistamin immobilizasyonuna etkisi.

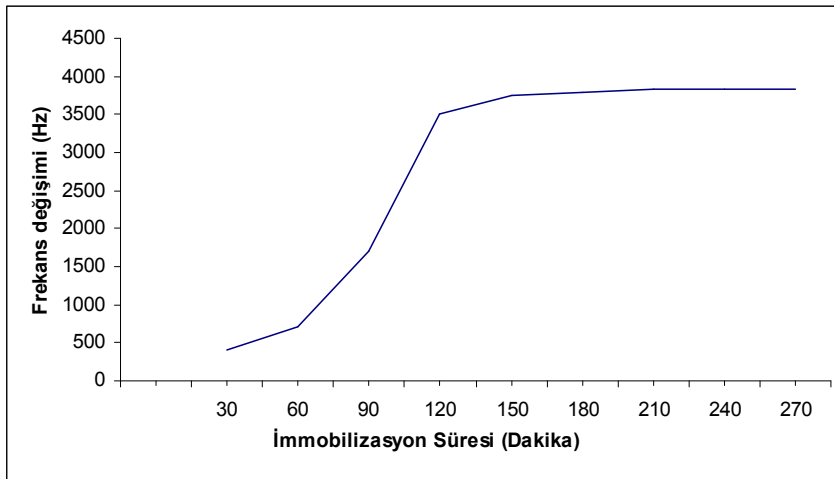
İkinci sistamin immobilizasyon karakterizasyonu altın nanopartikül immobilizasyonu için önemli faktörlerden biridir. İkinci sistaminin açıkta olan tiyol grupları altın nanopartiküllerle etkileşmektedir. Tiyol gruplarının oranına bağlı altın nanopartikül immobilizasyonu gerçekleşmektedir. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi bu aşamada sistamin derişiminin belirgin bir etkisi yoktur. İkinci sistamin immobilizasyon aşamasındaki etkili frekans kaymaları, bir önceki immobilizasyon aşamasıyla, yani GA immobilizasyonuyla bağlantılıdır.

#### **4.2.5. Altın nanopartikül immobilizasyonu**

Yüzey modifikasyon işlemleri ( yıkama, birinci sistamin, GA, ikinci sistamin immobilizasyonu) tamamlandıktan sonra sıra altın nanopartikül immobilizasyonuna gelmiştir. Altın nanopartikül immobilizasyonun da yüzey modifikasyon işlemleri doğru bir şekilde yapıldıktan sonra, en önemli etken, sentezlenmiş olan altın nanopartiküllerin boyutudur. Çünkü partiküller ne kadar küçük ve eş boyutlu olursa, kristalin yüzey alanında partikül tutturma imkanı o kadar artmaktadır. Nanopartiküller kristal elektrotu üzerinde oturarak yüzey alanın genişlenmesini sağlamaktadırlar. Bunun sayesinde kristal üzerinde daha çok malzemenin bağlanması ve algılanması planlanmıştır. Bir başka anlamda yapılması tasarlanan sensörün hassasiyetinin artması sağlanmıştır.

##### **4.2.5.1. Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde sürenin etkisi**

Altın nanopartikül immobilizasyonu sırasında en etkili ve kayıda değer frekans kaymalarının incelemek için, en etkili immobilizasyon süresini belirlemek gerekmektedir.



**Şekil 4.12.** Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde sürenin etkisi.

Şekil 4.12’de görüldüğü gibi altın nanopartikül immobilizasyonunun doyumluk durumuna ulaşması için, grafiğin plato bölgesine girmesi gerekmektedir. Bu doyumluk durumuna ulaşma süresi yaklaşık 2 saat olarak görünmektedir. Doyumluk durumuna ulaştıktan sonra altın nanopartikül immobilizasyonunda ve ona bağlı olarak frekans kaymasında her hangi bir önemli değişiklik gözlenmemiştir. Bu nedenle de yapılmış olan deneylerde aynı süreç altın immobilizasyonu için kullanılmıştır. Benzer bir çalışmada Shubo Han, 2001 yılında üç boyutlu DNA sensörü için yaptıkları kuartz kristal üzerindeki altın nanopartikül immobilizasyon süresi için, 2 saatlik süreyi en etkili süre olarak belirlemiştir.

#### **4.2.5.1. Altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde altın tuzu derişiminin etkisi**

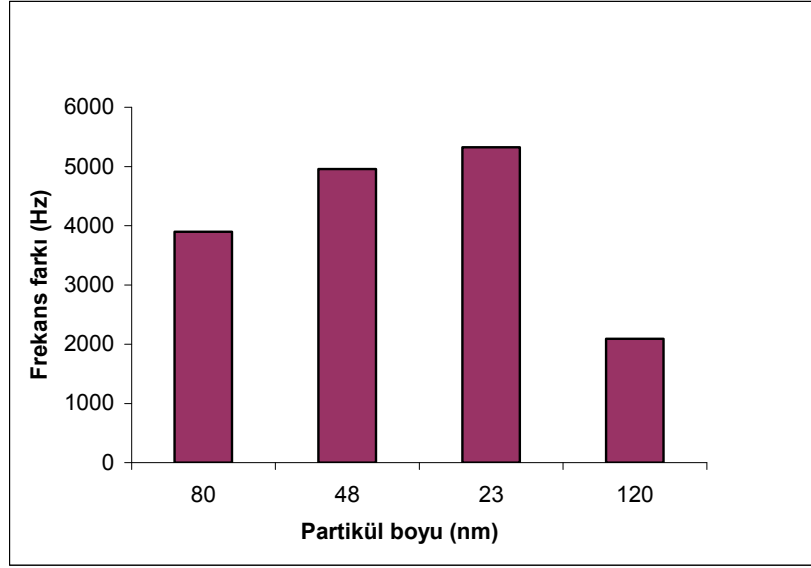
Daha önce altın nanopartikül karakterizasyonunda belirlendiği gibi altın tuzunun derişimi partiküllerin boyutlarının büyüklüğünde önemli etkenlerden biridir. Bununla da orantılı olarak partiküllerin büyüklüğü kristal üzerindeki immobilizasyonda etkilidir.

**Çizelge 4.4.** Farklı altın tuzu derişimlerinin partikül boyutu üzerinde etkisi.\*

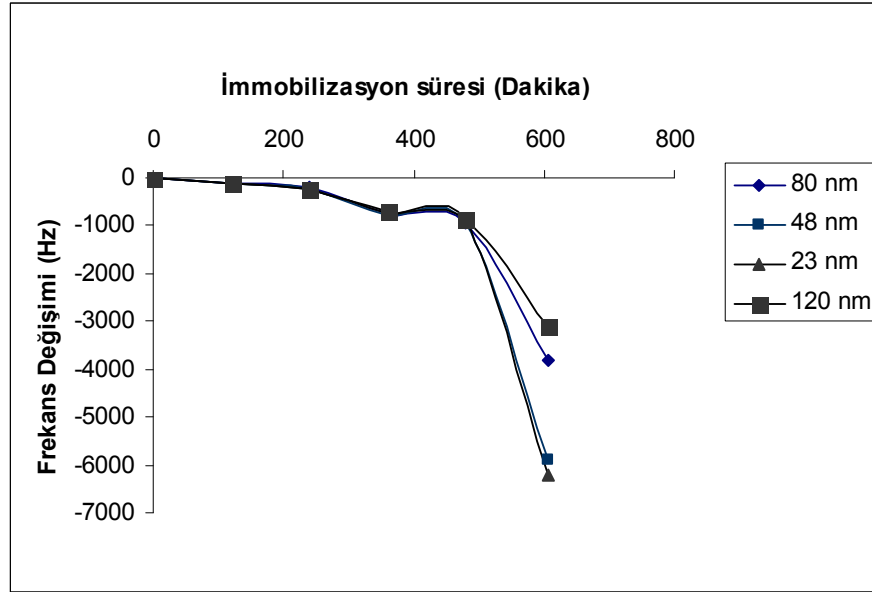
Altın tuzu	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)
0.050	120±12	84.6↔130.1
0.060	23±2.3	19.4↔30.8
0.075	48±4.8	33.7↔50.3
0.10	80±8.0	61.0↔101.6; 237.0↔281.9

\*Sodyum sitrat derişimi (0.17mM).

Şekil 4.13, 4.14 ve çizelge 4.4’de görüldüğü gibi, altın tuzu derişiminin 0.06 mM ve sodyum sitrat derişiminin 0.17 mM olduğu durumlarda diğer derişimlere göre daha fazla tek boyutlu ve küçük partiküller elde edilmiştir. En çok bu derişimde altın nanopartikül kristal üzerine immobilize olmuştur. Bu yüzden yapılmış olan tüm deneylerde, kristal üzerine immobilize etmek amacıyla daha küçük ve eş boyutlu partiküller elde edilmeye çalışılmıştır. Benzer bir çalışmada Wiley ve arkadaşları, 2000 yılında, kuartz kristaller üzerindeki altın nanopartiküllerin immobilizasyonunda, altın tuzunun derişiminin etkisini önemli bir etken olarak belirtmişlerdir.



Şekil 4.13. Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerindeki etkisi.



Şekil 4.14. Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerinde zamana karşı etkisi. (Tüm aşamalar birlikte değerlendirilmiştir).

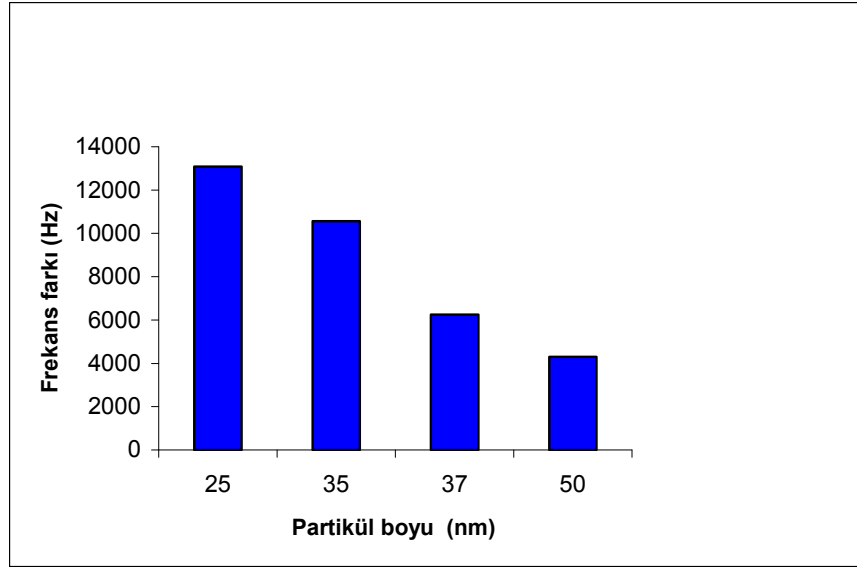
#### 4.2.5.3. Değişik sodyum sitrat derişimlerinde elde edilen Altın nanopartiküllerin immobilizasyonu

Nanopartiküllerin üretiminde ve karakterizasyonunda ve ona bağılı olarak kristal üzerinde immobilizasyonunda en önemli faktörlardan biri, indirgenme ajanı (sodyum sitrat)'ın derişimidir.

**Çizelge 4.5.** Sodyum sitrat derişiminin partikül boyuları üzerindeki etkisi.\*

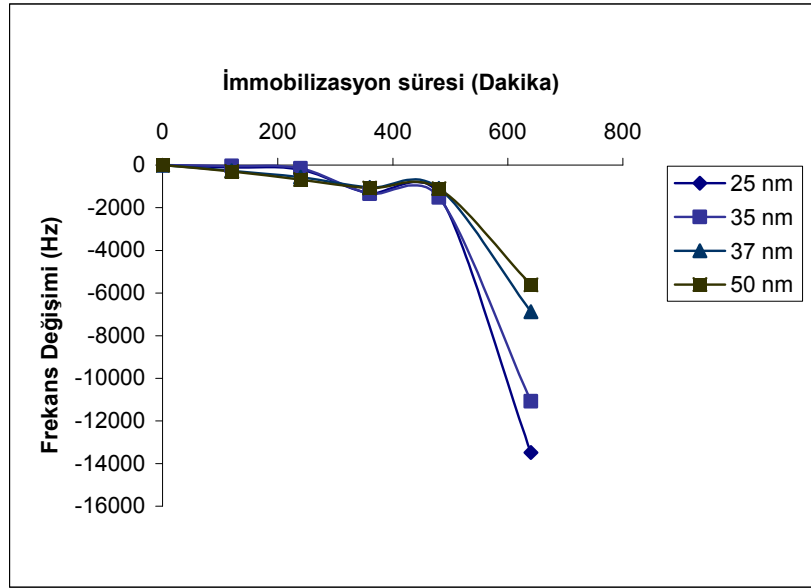
Sodyum sitrat (mM)	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)
0.15	25.1±2.5	13.0↔25.9; 44.1↔65.1
0.25	35.3±3.5	33.7↔50.3
0.35	37.4±3.7	26.5↔42.0; 330.0↔529.2
0.50	50.4±5.0	6.0↔8.0; 40.0↔60.4; 100.5↔159.3

\* Altın tuzu derişimi (0.06mM).



**Şekil 4.15.** Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerindeki etkisi.

Şekil 4.15, 4.16 ve çizelge 4.5'de de görüldüğü gibi, eklenen sodyum sitratın miktarının 0.15 mM ve altın tuzu derişiminin 0.06 mM olduğu durumda daha küçük ve tek boyutlu partikül elde edilmiştir. Bu nedenle altın nanopartiküllerin en fazla immobilize olduğu derişim, 0.15 mM olmuştur. Eklenen sodyum sitrat derişimiyle ilgili önem taşıyan bazı noktalar bulunmaktadır:



**Şekil 4.16.** Altın nanopartikül boyutunun, nanopartikül immobilizasyonu üzerinde zamana karşı etkisi. (Tüm aşamalar birlikte değerlendirilmiştir)

1. 0.15 mM derişimindeki immobilizasyon frekans kayması, oldukça büyük bir miktardadır. Ama bu frekans kayması, partiküllerin boyutlarının küçük ve tek boyutlu olmalarından kaynaklanmıştır.

2. Normalde eklenen sodyum sitrata karşı partiküllerin boyutu daha küçük olması ve bununda sonucunda burada daha fazla olan konsantrasyonlarda mesela 0.50 mM da daha fazla frekans kaymasını beklenmektedir ama bu noktada bir şeyi unutmamak gerekir, o da buradaki konsantrasyonlar daha önce 3.1.1'de bahs edilmiş olan uç noktalarıdır. Altın nanopartikül sentezinde bir seviyeden sonra yine pH'nın artmasıyla birlikte partiküllerinde boyutları büyümeye başlamıştır. Bu yüzden diğer konsantrasyonlarda daha az frekans kayması görünmüştür. Stephan Link ve Mostafa A. El-Sayed, 1999 yılında benzer bir çalışmada eklenen sodyum sitrat derişiminin etkisini altın nanopartikül immobilizasyonu üzerinde araştırmak için 5 ml %1 sodyum sitratı 95 ml %5  $HauCl_4$ 'e karşı artırarak 9, 15, 22, 48 ve 99 nm büyüklüğünde partiküller elde etmişlerdir ve böylece eklenen sodyum sitrat derişiminin etkisini önemli bir etken olarak belirlemişlerdir.

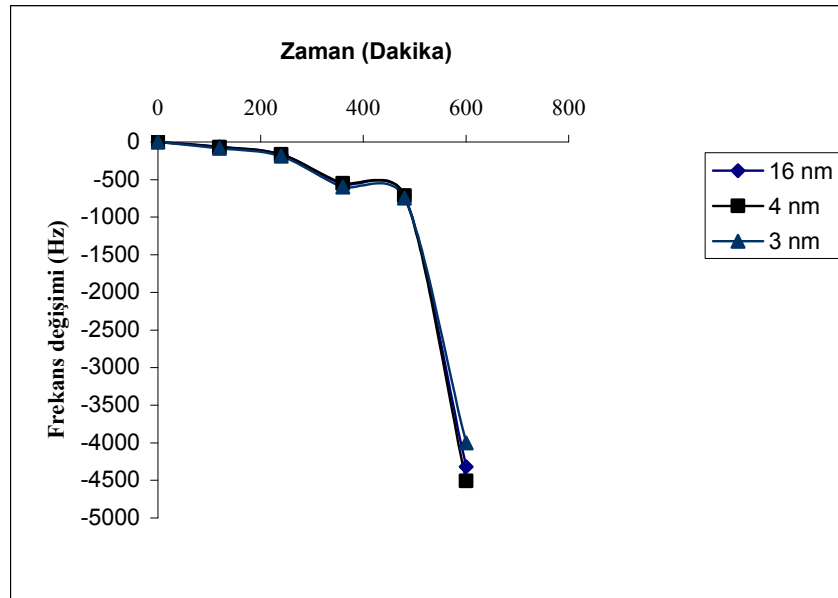
#### 4.2.5.4. Karıştırma hızının Altın nanopartiküllerin immobilizasyonu üzerideki etkisi

Altın nanopartikül sentezinde, eşit ısı dağılımı sağlamak ve sentez reaksiyonunda sodyum sitratın tam olarak sitrik asite dönüşmesini gerçekleştirmek için tüm reaksiyon boyunca devamlı bir karıştırma işlemi yapılmıştır.

**Çizelge 4.6.** Karıştırma hızının partikül boyutları üzerindeki etkisi.\*

Karıştırma hızı Devir/Dakika	Boyut (nm)	Boy dağılımı (nm)
300	42.0±4.2	26.5↔52.9; 333↔528
400	25.9±2.5	13.0↔32.6; 41.1↔81.9
500	16.3±1.6	10.3↔31.1; 40.0↔71.9
600	4.2±0.4	1.5↔4.2; 20.9↔126.4
800	3.2±0.3	"2.6↔4.1; 8.2↔12.9; 51.5↔81.7; 205.2↔258.9"

\*Altın tuzu derişimi (0.06mM), sodyum sitrat derişimi (0.15mM).

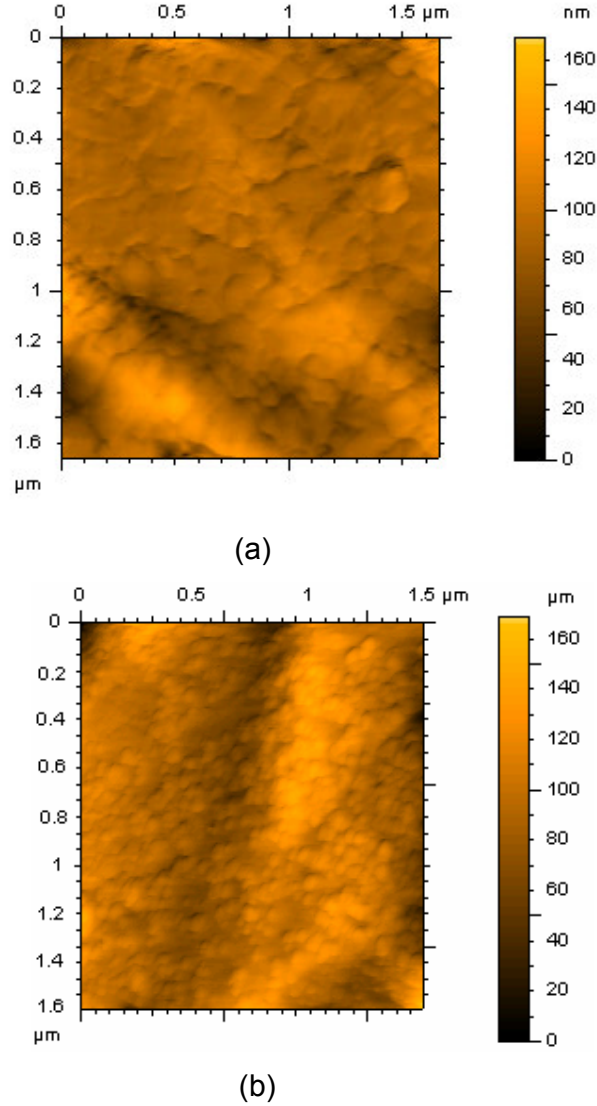


**Şekil 4.17.** Karıştırma Hızının Altın nanopartiküllerin immobilizasyonunda zamana karşı etkisi. (Tüm aşamalar birlikte değerlendirilmiştir).

Şekil 4.17 ve çizelge 4.6'den de anlaşılacağı gibi en iyi altın nanopartikül immobilizasyonu en iyi ısı dağılımının sağlandığı reaksiyonda görülmüştür. Karıştırma hızının 600 devir/dakika, altın tuzu derişiminin 0.06 mM ve sodyum sitrat derişiminin 0.15 mM olduğu durum sodyum sitratın tam hibridizasyon olduğu reaksiyondur ve bu yüzden küçük ve eş boyutlu partiküller üretilmiştir ve bunun sonucunda bu karıştırma hızında daha fazla frekans düşüşü ve ona bağlı olan altın nanopartikül immobilizasyonu izlenmiştir. Gerçi çizelge 4.3 ve şekil 4.5. (e) de zeta sayıcının verdiği partikül boyut bilgilerinde, karıştırma hızının 800 devir/dakika olduğunda, daha da küçük partiküller elde edilmiştir. Ama buna rağmen altın nanopartikül immobilizasyonu daha düşük frekans kaymasına neden olmuştur. Bu

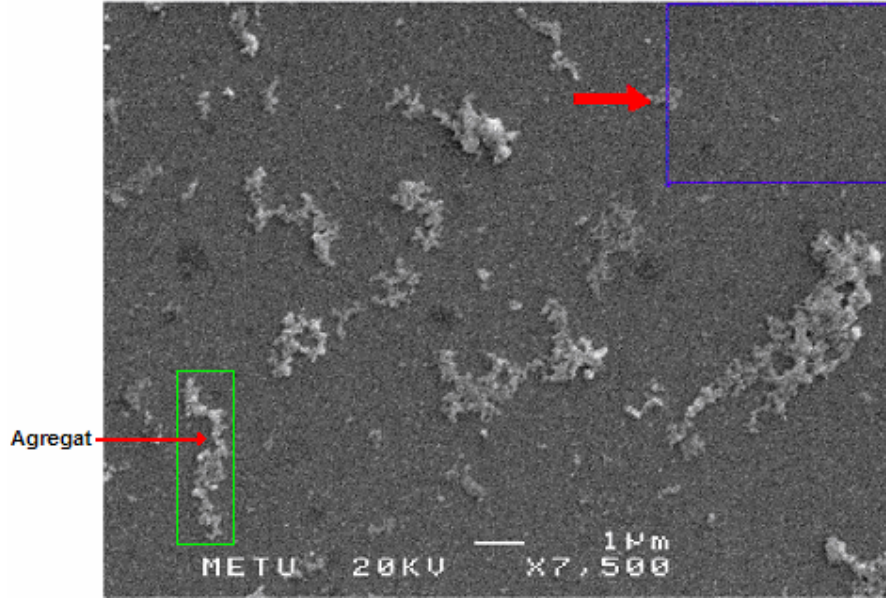
durumun açıklaması, 800 devir/dakika karıştırma hızında elde edilmiş olan partiküllerin geniş aralıklı boy dağılımında saklıdır.

#### 4.2.6. Altın nanopartiküllerin Kristal yüzey görüntüleri

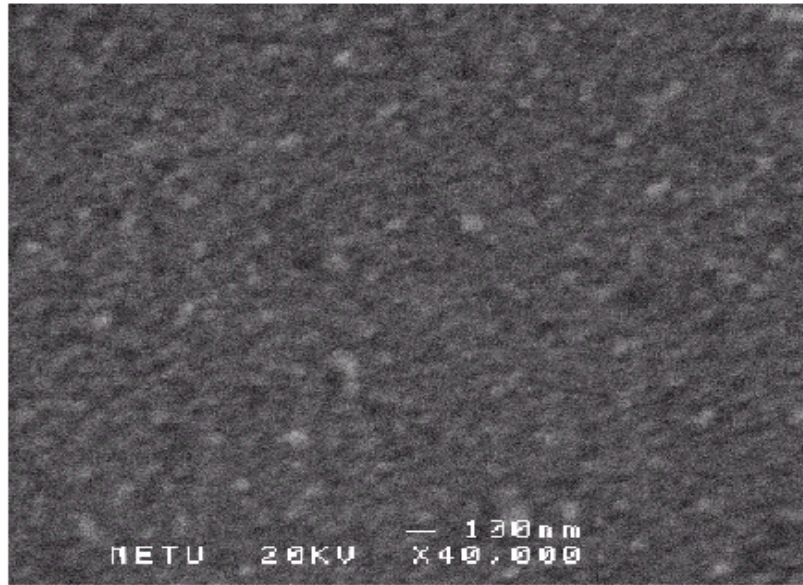


**Şekil 4.18.** AFM görüntüleri: (a) boş bir gümüş kristal ve (b) altın nanopartikül immobilize olmuş gümüş kristal.

Kullanılan gümüş kristallerin çok iyi bir yüzeye sahip olmadığından dolayı, daha detaylı bir görüntü elde etmek için, çok iyi bir yüzeye sahip olan altın elektrotlu kristaller kullanılmıştır. Gümüş kristallerin üzerinde yapılan uygulamanın aynısı altın elektrotlu kristaller üzerinde uygulanmıştır. Şekil 4.19'da gösterilen SEM görüntüleri altın nanopartikül immobilize edilmiş altın elektrotlu kristallere aittir.



(a) Altın kristal yüzeyi üzerinde immobilize ve agregat olmuş altın nanopartiküller.



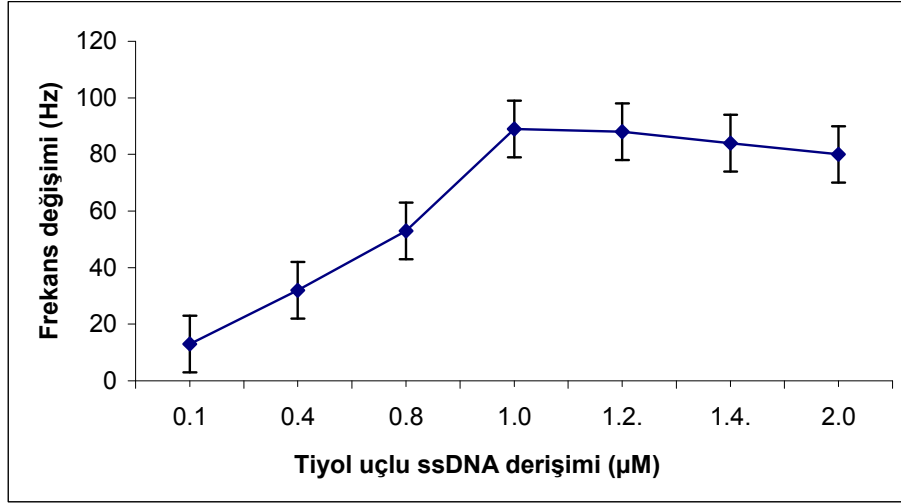
(b) Altın kristal üzerine immobilize edilmiş altın nanopartiküller.

**Şekil 4.19.** Altın nanopartiküllerin, altın elektrotlu kristal üzerindeki SEM görüntüleri.

### 4.3. Tek sarmal DNA immobilizasyonu

#### 4.3.1. SH-ssDNA'nın derişiminin immobilizasyon üzerinde etkisi

İlk aşamada SH-ssDNA'yı kristal üzerinde immobilize etmek için öncelikle immobilizasyon için SH-ssDNA'nın uygun derişimini belirlemek gerekmektedir. Bunun doğrultusunda SH-ssDNA'nın farklı derişimleri kristal üzerinde denenmiştir.

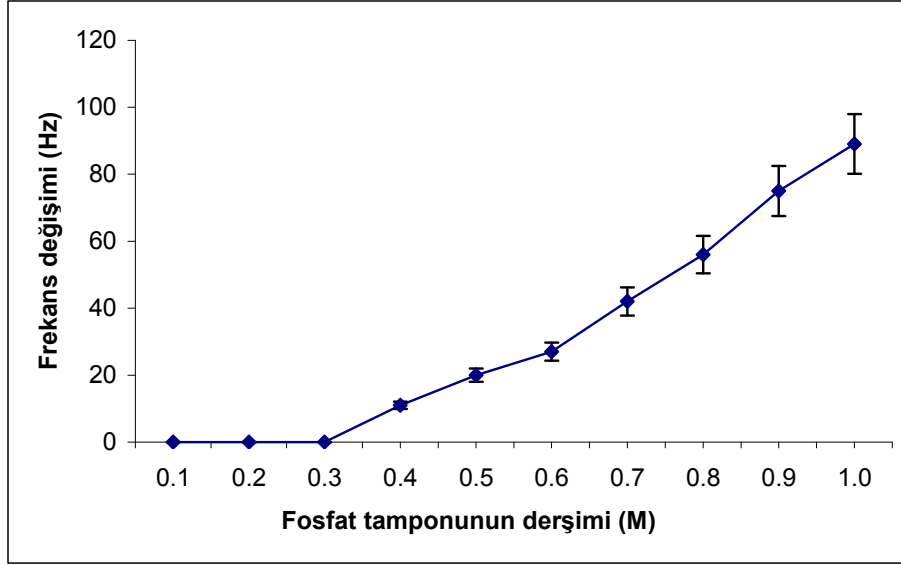


Şekil 4.20. SH-ssDNA'nın farklı derişimlerin etkisi

Sunulan çalışmada kullanılan 20-mer'lik SH-ssDNA , üzerinde bulunduğu iyonize olabilen fosfat gruplarından dolayı, negatif bir yüke sahiptir. Bu iyonize olabilen gruplar, SH-ssDNA'nın yapısını oluşturan fosfat grubunun yaptığı diester bağlarından kaynaklanmaktadır. Yukarıda, şekilde görüldüğü gibi, 1 µM SH-ssDNA derişiminde en yüksek immobilizasyon izlenmiştir. Daha yüksek konsantrasyonlarda SH-ssDNA'nın negatif yükünden dolayı elektrostatik olarak SH-ssDNA'nın immobilizasyonu engellenmiştir (Şekil 4.20). Rastislav Levicky, 1998 yılında benzer bir çalışmada SH-ssDNA immobilizasyonunda aynı elektrostatik sebeplerden dolayı immobilizasyonun engellenmesini tespit etmiştir.

#### 4.3.2. Fosfat tamponun derişiminin DNA immobilizasyonu üzerinde etkisi

SH-ssDNA'nın immobilizasyonu önce suda denenmiş ve frekans değişimi izlenmemiştir. Sonuç olarak bu aşamada SH-ssDNA kristal üzerinde immobilize edilmemiş ve buyüzden kayıda değer bir frekans kayması gözlenmemiştir. Daha sonra SH-ssDNA'lar fosfat tamponunu(pH= 6.7) farklı derişimlerde denenmiş ve sonuç şekil 4. 21 de gösterilmiştir.

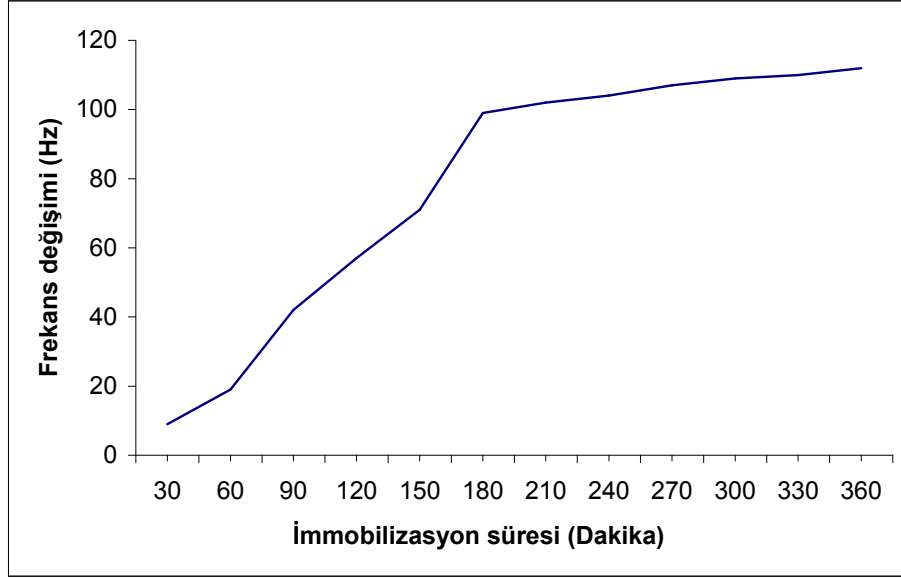


**Şekil 4.21.** Fosfat tampon derişiminin SH-ssDNA'nın immobilizasyonu üzerinde etkisi

DNA zincirleri iyonize olabilen fosfat grupundan dolayı eksi bir yüke sahipler. SH-ssDNA'nın moleküller arasındaki elektrostatik uzaklaşma yüksek güçlü iyonik koşullarda minimum seviyeye gelmektedir. Şekilden de anlaşılacağı gibi yüklü zincirler bu koşullarda elektrostatik olarak daha iyi korunmaktadırlar. Böylece 1M fosfat tampon derişiminde SH-ssDNA'ların en yüksek yüzey immobilizasyonu gerçekleşmiştir. Benzer çalışmada A. Csáki, 2001 yılında SH-ssDNA'nın kristal üzerindeki immobilizasyonda fosfat tamponunun derişimine deyinmiş ve en yüksek SH-ssDNA immobilizasyonunu fosfat tamponunun 1 M derişiminde elde etmiştir.

#### 4.3.3. Zaman faktörünün SH-ssDNA immobilizasyonu üzerinde etkisi

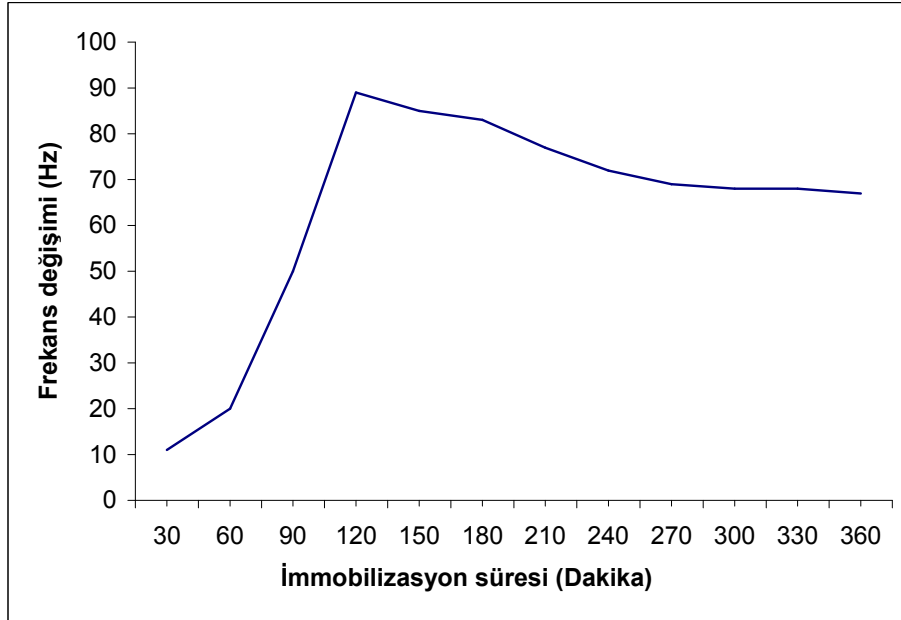
Çalışmanın diğer immobilizasyon aşamalarında izlendiği gibi, SH-ssDNA immobilizasyonunda da zaman faktörünün etkisi incelenmiştir ve bunun sayesinde immobilizasyonun en etkili süresi elde edilmiştir. Bu deneyden elde edilen frekans değişiminin, sonuçlarına dayanarak ve şekil 4.22'den de anlaşılacağı gibi, ilk başta çok hızlı yükselen frekans değişimi, yaklaşık 3 saatte maksimuma ulaşır ve sonra daha az ve küçük artışlarla devam etmiştir. Bu yüzden bu aşamada immobilizasyon süresi için 3 saat uygun görünmüştür. Munlika Satjapipat, 2001 yılında ,SH-ssDNA'nın altın nanopartikül kaplı kuartz kristal yüzeyi üzerindeki daha verimli immobilizasyonun için, ~3 saat süreyi en etkili immobilizasyon süresi olarak belirlemiştir.



Şekil 4.22. SH-ssDNA immobilizasyonu üzerinde immobilizasyon süresinin etkisi.

#### 4.3.4. Hibridizasyon üzerinde zaman faktörünün etkisi

Bu aşamada immobilize olmuş SH-ssDNA ve ssDNA'ların arasında hidrojen bağları oluşmakta ve bunun sonucunda da hibridizasyon gerçekleşmektedir. Yine burada da hibridizasyonun zamanla değişimi, önemli bir faktör olarak incelenmiştir.

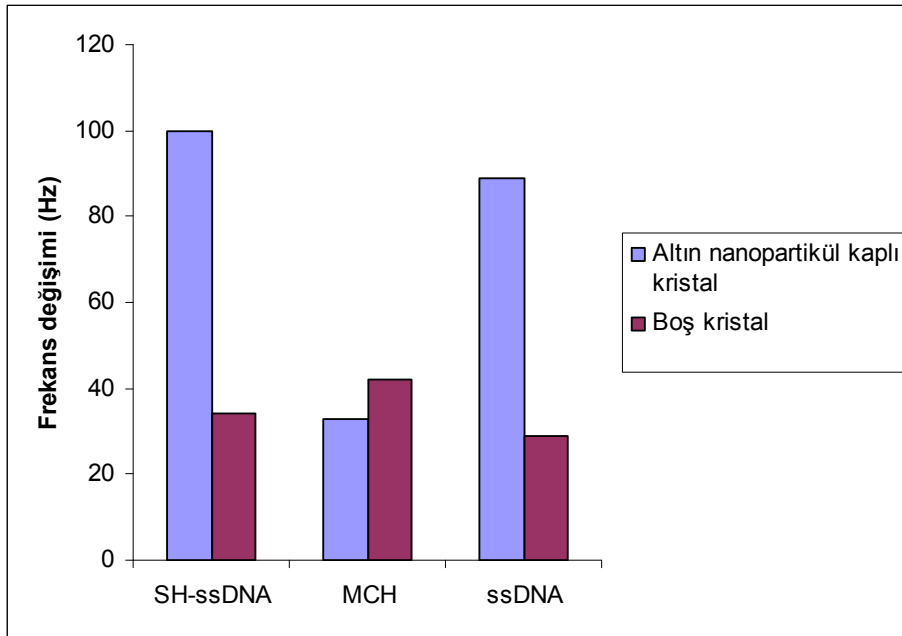


Şekil 4.23. Hibridizasyon üzerinde zaman faktörünün etkisi

Şekil 4.23'de görüldüğü gibi frekans kayması hibridizasyon süresince yaklaşık 2 saatten sonra en yüksek miktara ulaşmış ve daha sonra yavaş yavaş azalmaya başlamıştır. DNA'ların elektrostatik yükünün artmasından ve DNA'ların sıkışmış olarak yüzeye bağlanmalarından dolayı, bir süre sonra(2 saat) hibridizasyon engellenmiştir. Bu yüzden bu aşamada hibridizasyon için etkili bir sürenin 2 saat olduğu kabul edilmiştir. Aynı sonuç benzer bir çalışmada Tonya M. Herne ve Michael J. Tarlov, tarafından 1997'de, HS-ssDNA ve onun eşleniğinin arasındaki hibridizasyonunda, altın elektrotlu kuartz kristal üzerinde elde edilmiştir.

#### 4.3.5. Altın nanopartikül kaplı yüzeyin DNA immobilizasyonu ve hibridizasyonu üzerindeki etkisi

Çalışmanın asıl hedeflerinden biri; altın nanopartikülleri kullanarak kuartz kristal yüzeyinde daha geniş bir yüzey alanı elde etmektir. Bu yüzden kuartz kristalleri kullanarak DNA sensörü geliştirmenin yanısıra altın nanopartiküllerin kristal yüzeyi üzerindeki, DNA immobilizasyon ve hibridizasyonundaki etki araştırılmıştır.



Şekil 4.24. DNA immobilizasyon ve hibridizasyonu üzerinde altın nanopartikül immobilizasyonunun etkisi

Şekil 4.24'de görüldüğü gibi buradaki frekans değişimindeki fark çok belirgindir. Hem SH-ssDNA immobilizasyonunda ve hem ssDNA hibridizasyonundaki fark yaklaşık olarak boş kristalin 3 katıdır. Yüzey üzerinde kullanılan MCH (6-merkaptto hegzanol) immobilizasyonunda, boş kristalde görünen yüksek frekans değişimi (altın nanopartikül kaplı kristale karşı), boş kristalin yüzeyinde düşük

miktarda SH-ssDNA immobilizasyonundan ve ona bağlı olarak MCH'nin tiyol uçlarının daha fazla boş alan bulduklarından kaynaklanmıştır. Böylece altın nanopartiküller kullanarak, yüksek yüzey alan elde edildiği kanıtlanmıştır. Benzer bir çalışmada Z. Wang, 2005 yılında, altın nanopartiküllerin SH-ssDNA ve ssDNA'nın immobilizasyonu ve hibridizasyonu üzerindeki etkisini araştırmış ve ~4 kata kadar artış gözlenmiştir.

## 5. SONUÇLAR

Sunulan çalışmada elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir:

- Altın nanopartikül sentez reaksiyonu, sodyum sitratı indirgenme metoduyla yapılmıştır ve istenen boyutlarda nanopartiküller elde edilmiştir.
- Altın nanopartikül karakterizasyonunda, üç önemli faktörün partiküllerin boyutları üzerindeki etkisi incelenmiştir. Altın tuzu derişimi, sodyum sitrat derişimi ve karıştırma hızının etkisi.
- Altın tuzu derişimi karakterizasyonunda, altın tuzu 0.06 mM ve eklenen sodyum sitrat 0.17 mM ve karıştırma hızının 450 devir/dakika sabit tutulduğu zaman en küçük partiküller (23 nm) elde edilmiştir. Bu aşamadaki ortamın pH'sının 3.32 olduğu izlenmiştir.
- Sodyum sitrat derişimlerine karşı, altın nanopartiküller boyutların incelemek için, altın tuzu derişimini 0.06 mM ve karıştırma hızı 450 devir/dakika'da sabit tutulduğu zaman en küçük partiküller (25 nm), sodyum sitratın 0.15 mM deişiminde elde edilmiştir. Buradaki ortamın pH'sı 3.18 olarak izlenmiştir.
- Karıştırma hızının partiküllerin boyutları üzerindeki etkiyi incelemek için altın tuzu derişimin 0.06 mM ve eklenen sodyum sitrat derişimin 0.15 mM de sabit tutarak, karıştırma hızları değiştirilmiştir. Buradaki elde edilen en küçük(15 nm) partiküllerin 600 devir/dakika karıştırma hızında görünmüştür.
- Sodyum sitrat indirgenme metodundan elde edilen partiküllerin -4 mV yüke sahip oldukları belirlenmiştir.
- Elde edilen altın nanopartiküllerin kuartz kristal üzerinde immobilizasyonu için, kristal elektrot yüzeyleri üzerinde yıkama ve modifikasyon işlemleri gerçekleştirilmiştir.
- Yapılan deneylerde önce yüzey modifikasyon ve immobilizasyonu üzerindeki sıcaklık etkisi araştırılıp ve 25°C en uygun sıcaklık olarak belirlenmiştir.
- Kristal yüzey modifikasyon işlemleri başlatılmadan önce yıkama işlemine tabii tutulmuştur. Bu amaçla kristal elektrot yüzeyi sodyum hidroksit, aseton ve metanolla temizlenip daha sonra frekans kaymaları ölçülmüştür.
- Kristal yüzey modifikasyon aşamasında, yüzey üzerinde birinci sistamin, glutaraldehit ve ikinci sistamin immobilizasyonu yapılmıştır ve burada en iyi immobilizasyonu gerçekleştirmek için her aşama farklı derişimlerde denemiş ve en uygun derişim belirlenmiştir. Birinci sistamin immobilizasyonunda 0.18 mM,

glutaraldehit immobilizasyonunda 0.66 M ve ikinci sistamin immobilizasyonunda yinede 0.18 mM en etkili derişimler olarak belirlenmiştir.

- Altın nanopartikül immobilizasyonunda, immobilizasyon süresinin etkisi, altın tuzunun etkisi ve karıştırma hızının etkisi araştırılmıştır. Bunun doğrultusunda altın tuzu derişimi, sodyum sitrat derişimi ve karıştırma hızını değiştirerek elde edilen altın nanopartiküller kristal üzerine immobilize edilmiş ve frekans değişimleri incelenmiştir ve her aşamada en etkili immobilizasyon belirlenmiştir.
- Altın nanopartikül immobilizasyonunda, altın tuzunun derişiminin 0.06 mM, sodyum sitrat derişiminin 0.15 mM ve karıştırma hızının 450 devir/dakika olduğunda en çok frekans değişimi izlenmiştir.
- Gümüş ve altın kristaller üzerinde altın nanopartikül immobilize edilip ve AFM ve SEM görüntüleri elde edilmiştir.
- Altın nanopartikül kaplı kristaller üzerinde SH-ssDNA immobilize edilmiş ve daha sonra kristal üzerinde SH-ssDNA ve ssDNA'nın hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Her aşamada frekans değişimleri ölçülmüştür.
- Kullanılan SH-ssDNA çözeltisinde disülfid bağları engellemek için bu çözeltinin 1/5 oranında(ki bu oran standart olarak belirlenmiştir), dithiothreitol (1M DDT 0.1 M fosfat tamponunda pH=8.3-8.5) oda sıcaklığında, eklenmiştir
- SH-ssDNA immobilizasyonu üzerinde SH-ssDNA'nın derişiminin, bu aşamada kullanılan fosfat tamponunun derişimi ve immobilizasyon süresinin etkisi incelenmiştir. Yapılan deneylerde SH-ssDNA için en etkili derişim 1 µM, fosfat tamponu için 1 M olarak belirlenmiştir. Ayrıca en etkili immobilizasyon süresi 3 saat olarak belirlenmiştir.
- Tiyol modifiye olmuş DNA'ların (SH-ssDNA), non spesifik ve yatay şekilde bağlanmaları engellemek için, SH-ssDNA immobilize olmuş kristaller 1 mM 6-mercapto-1-hexanol sulu çözeltide 1 saat boyunca normal oda koşullarında tutulmuştur.
- Hibridizasyon, ssDNA'lar ve kristal üzerine immobilize olan SH-ssDNA'lar 55°C' de TE -1 M NaCl (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1 M NaCl) tamponunda 10 dakika boyunca ısıtılıp sonra DNA'lar soğutulularak oda sıcaklığında bekletilerek gerçekleştirilmiştir.
- Hibridizasyon aşamasının üzerinde zaman faktörünün etkisi araştırılıp ve en etkili süre 2 saat olarak belirlenmiştir.

### *Sonuçlar*

- Altın nanopartiküllerin kristal yüzeyi üzerindeki, DNA immobilizasyon ve hibridizasyonundaki etki araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda altı nanopartikül immobilize edilmiş ve boş kristal elektrot yüzey üzerinde DNA immobilizasyon ve hibridizasyonu yapılmıştır ve elde edilen sonuçlara göre altın nanopartikül immobilizasyonunun, DNA immobilizasyon ve hibridizasyonu üzerinde açıkça etkili olduğu gözlenmiştir.

## 6. KAYNAKLAR:

- Andrew N. Shipway, Nanoparticle Arrays on Surfaces for Elektronik, Optical and sensor applications, CHEMPHYSCHEM, 2000, 1, 18-52.
- Amihod Doron, Langmuir 1995,11, 1313-1317.
- Chun Xiu Zhang, Analytical Biochemistry 320 (2003) 136-140.
- Csáki, A. DNA monolayer on gold substrates characterized by nanoparticle labeling and scanning force microscopy, Nucleic Acids Research, 2001, Vol. 29, No. 16-81.
- Daniel H. Murgida and Peter Hildebrandt, J. Phys. Chem. B 2001, 105, 1578-1586.
- DeSilva, A. P. Gunazatne, H. Q. N. McCoy, C. P. Nature 1993, 364, 42-44.
- Fayi Song, Detection of oligonucleotide hybridization at femtomolar level and bsequence-specific gene analysis, Nucleic Acids Res. 2002 July 15; 30(14): e72.
- Frank Caruso, Quartz Crystal Microbalance Study of DNA Immobilization, Anal. Chem.1997, 69,2043-2049.
- Fu-Ken Llu, J. Am. Chem. Soc, 13, 403- 406, 2002
- Göpel, W. Biosens, Bioelectron, 1998, 13, 723-728.
- Haizhen Huang, Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 226 (2003) 77–86.
- Iddo Ben-Dov and Itamar Willner, Anal. Chem.1997, 69,3506-3512.
- Joseph Wang, Biosensors and Bioelectronics 18 (2003) 255\_ 260.
- Keisaku Kimura and Suguru Takashima, Molecular Approach to the Surface Potential Estimate of Thiolate-Modified Gold Nanoparticles, J. Phys. Chem. B 2002, 106, 7260-7266.
- Khairutdinov, R. F. Colloid J. 1997, 59, 535-548.
- Lehn, J. M. Supramolecular Chemistry, VCH, Weinheim, 1995.
- Lewis, L. N. Chem. Rev. 1993, 93, 2693-2730.
- Link, S. Langmuir, 18, 230-233, 1999.
- Matthews, O.A. Shipway, A. N.. Stoddart, J.F. Prog. Polym. Sci. 1998, 23, 1-56.
- Meinkoth, Anal. Biochem. 1984, 138, 267-284.
- Meldrum, F.C. 1997, Angew. Chem, 241, 334-337.
- Mulvaney, P. Langmuir, 1996, 12, 788-800.
- Munlika Satjapipat, Langmuir 2001, 17, 7637-7644.

- Nagasaki, Y. and Kataoka, K. IEE Proc.-Nanobiotechnol., Vol. 152, No. 2, April 2005.
- Nicole Acevedo, Submitted to the Faculty of the Virginia Polytechnic Institute and State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in Dairy Science, 2001.
- Niemeyer, C. M. Angew. Chem. 1997, 109, 603-606.
- Paul E. Laibinis, Monolayers of *n*- Alkanethiols on the Coinage Metal Surfaces, Cu, Ag, Au, J. Am. Chem. SOC. 1991, 113, 7152-7167.
- Rastislav Levicky, J. Am. Chem. Soc. 1998, 120, 9787-9792.
- Sheela Berchmans, Materials Chemistry and Physics 77 (2002) 390–396
- Shubo Han, A three-dimensional heterogeneous DNA sensing surface formed by attaching oligodeoxynucleotide-capped gold nanoparticles onto a gold coated quartz crystal, Chem. Commun., 2001, 609–610.
- Shu-Fen Chou, Clinical Chemistry. 2002;48:913-918.
- Shuichiro Yamaguchi and Takeshi Shimomura, Adsorption, Immobilization, and Hybridization of DNA Studied by the Use of Quartz Crystal Oscillators Anal. Chem. IB99, 65, 1925-1927.
- Stephan Link and Mostafa A. El-Sayed, Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles, J. Phys. Chem. B 1999, 103, 4212-4217.
- Tonya M. Herne and Michael J. Tarlov, Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 8916-8920.
- Wang, Z. Selective enzymatic cleavage of gold nanoparticlelabelled DNA on a microarray, IEE Proc.-Nanobiotechnol., Vol. 152, No. 2, April 2005.
- Weinheim, Clusters and colloids (Ed.:G. Schmid), VCH.
- Wieringa, R.H. ISBN. 90-367-1306-4.
- Wiley, Nanosystems, Molecular, Machinery, Manufacturing and Computation(Ed,: K. E. Drexler), New York, 1992.
- Xi Chun Zhou, Biosensors & Bioelectronics 16 (2001) 85–95.
- Ye-Fu Wang, Journal of Medical Virology 70:205-211, 2003.
- Yi Xiao, Analytica Chimica Acta 391 (1999) 73±82.