

**KENDİLİĞİNDEN DÜZENLENEN TEK TABAKA YÖNTEMİ İLE
IŞIK KONTROLLÜ DNA ÇİP TASARIMI**

Gökçen DEMİREL

DOKTORA TEZİ

KİMYA

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ARALIK 2009

ANKARA

Gökçen DEMİREL tarafından hazırlanan KENDİLİĞİNDEN DÜZENLENEN TEK TABAKA YÖNTEMİ İLE IŞIK KONTROLLÜ DNA ÇİP TASARIMI adlı bu tezin Doktora tezi olarak uygun olduğunu onaylarım.

Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Tez Danışmanı, Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mehmet ÇAKMAK

Tez Danışmanı, Fizik Anabilim Dalı

Bu çalışma, jürimiz tarafından oy birliği ile Kimya Anabilim

Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Olgun GÜVEN

Kimya, Hacettepe Üniversitesi

Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA

Kimya, Gazi Üniversitesi

Prof. Dr. Şinasi ELLİALTIOĞLU

Fizik, ODTÜ

Prof. Dr. Bekir SARI

Kimya, Gazi Üniversitesi

Yrd. Doç. Dr. M. Fatih DANIŞMAN

Kimya, ODTÜ

Tarih: 28/12/2009

Bu tez ile G.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu Doktora derecesini onamıştır.

Prof. Dr. Bilal TOKLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada orijinal olmayan her türlü kaynağa eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Gökçen DEMİREL

KENDİLİĞİNDEN DÜZENLENEN TEK TABAKA YÖNTEMİ İLE IŞIK KONTROLLÜ DNA ÇİP TASARIMI

(Doktora Tezi)

Gökçen DEMİREL

GAZİ ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Aralık 2009

ÖZET

Bu çalışmada, Si(100) yüzeyleri üzerinde yeni bir ışık kontrollü DNA çip tasarlanmıştır. Bu ışık kontrollü malzeme Si(100) üzerinde 3-Glisidoksipropiltrimetoksisilan (GPTS) ve 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) moleküllerinden oluşan azobenzen içeren birimlerin kendiliğinden düzenlenen tektabakaları (KDT) ile hazırlanmıştır. Işık-duyarlı APABA molekülü *Schündehütte* metodu kullanılarak sentezlenmiş ve yapısal analizi FTIR, NMR ve LC-MS ile gerçekleştirilmiştir. Azobenzen tektabakaları Si(100) yüzeyleri üzerine GPTS ara bağlanmalarıyla oluşturulmuştur. Hazırlanan modifiye yüzeyler, X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS), değme açısı ölçümleri ve atomik kuvvet mikroskopisi (AFM) ile karakterize edilmiştir. APABA moleküllerinin tersinir fotoanahtar performansları DMSO ortamında UV spektrofotometresi ile incelenmiştir. Yüzeylerin foto-geri dönüşümlülük mekanizmasını anlamak ve kontrol edebilmek için yüzeyler UV ve vis ışık ile ışınlandıktan sonra farklı sıvılar kullanılarak değme açısı ölçümleri alınmıştır. Bu değme açısı ölçümleri UV ve vis ışık ile ışınlanan APABA-modifiye yüzeylerinin, yüzey enerji bileşenlerinin Lifshitz-van der Waals/asit-baz yaklaşımı yardımı ile hesaplanmasında

kullanılmıştır. Fotoanahtar yüzeylerin toplam yüzey enerjileri, vis ve UV ışınlamalarından sonra sırasıyla 37.28 mJ/m^2 ve 36.95 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Işık kontrollü DNA çipin hazırlanması için, Cy3 etiketli amino-uç gruplu tek iplik prob-DNA dizileri fotoanahtar yüzeylere immobilize edilmiştir. Prob-DNA derişimi ve inkübasyon zamanı floresans mikroskobu kullanılarak araştırılmıştır. Optimum hibridizasyon şartları Cy5 etiketli eşlenik DNA ile floresans mikroskobu kullanılarak çalışılmıştır. Ayrıca hazırlanan yüzeylerin vis ve UV ışık ile ışılandıktan sonraki DNA hibridizasyonlarının ışık ile kontrolü konfokal mikroskobu ile gösterilmiştir. Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için hibridizasyon yüzdeleri, çipin açık ve kapalı pozisyonları için sırasıyla % 61 ve % 5 olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, Yoğunluk Fonksiyonları Teorisi (DFT) kullanılarak teorik hesaplamalar yapılmıştır. APABA moleküllerinin epoksi-sonlu Si(100)-(2x2) yüzeyleri üzerine bağlanma mekanizmaları ve enerjileri teorik olarak incelenmiştir. Öncelikle, *trans*-APABA moleküllerinin epoksi-sonlu Si(100) yüzeyleri üzerine kimyasal bağlanması için iki olası model önerilmiştir; (i) karboksil ucundan bağlanma (Model 1), (ii) amino ucundan bağlanma (Model 2). Hesaplamalar, Model 1'in 0.43 eV daha kararlı olduğunu göstermiştir. İkinci olarak ise, *trans*-APABA molekülleri farklı açılarla bükülerek yüzeyler üzerinde *cis*-APABA molekülleri elde edilmiştir. Sonuç olarak *trans*-APABA yüzeylerinin *cis*-APABA yüzeylerinden 1.65 eV daha kararlı olduğu bulunmuştur.

Bilim Kodu	: 201.1.041
Anahtar Kelimeler	: Nanobioteknoloji, kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar, ışık-duyarlı molekül, DNA çip, yoğunluk fonksiyonu teorisi(DFT), β -Talasemi
Sayfa Adedi	: 202
Tez Yöneticileri	: Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA Prof. Dr. Mehmet ÇAKMAK

**DESIGN OF PHOTOCONTROLLABLE DNA CHIP BY
SELF-ASSEMBLED MONOLAYER METHOD**

(Ph. D. Thesis)

Gökçen DEMİREL

GAZI UNIVERSITY

INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY

December 2009

ABSTRACT

In this study, a new photocontrollable DNA chip was designed on Si(100) wafer. The photo-controllable substrate was prepared by azobenzene-containing self-assembled monolayers (SAMs) on the Si(100) via chemisorption of 3-glycidoxypyltrimethoxysilane (GPTS) and 4-(4'-aminophenylazo)benzoic acid (APABA). Photosensitive APABA was synthesized by using *Schünderhütte* method and characterized by FTIR, NMR and LC-MS. The azobenzene monolayers were formed on Si(100) surfaces by GPTS linkages. The modified surfaces were characterized by X-ray photoelectron spectroscopy (XPS), contact angle analysis and atomic force microscopy (AFM) techniques. The reversible photoswitching performances of APABA molecules were investigated by UV Spectroscopy in DMSO solution. In order to understand and control this reversible photoswitching mechanism, contact angle measurements were performed by using a variety of liquids after UV and visible light irradiation. These contact angle results were used to calculate the components of the APABA-modified surface energy under UV and visible light with the aid of the

Lifshitz–van der Waals/acid–base approach. The total surface energies of photoswitchable surfaces after visible and UV light irradiation were calculated as 37.28 mJ/m² and 36.95 mJ/m², respectively. To prepare a photo-controllable DNA chip, Cy3 labeled amino-terminated single stranded probe-DNA arrays were then immobilized onto the photoswitchable surface. Using fluorescence microscopy, the probe-DNA concentration and the incubation time were investigated. The optimum hybridization conditions were studied with Cy5 labeled complementary-DNA using fluorescence microscopy. In addition, the photocontrolling of DNA hybridizations onto prepared surfaces were verified by confocal microscopy after vis and UV light irradiation. The percentenge hybridization ratios for the on and off state of the DNA chip were calculated as 61% and 5%, respectively. Furthermore, the theoretical calculations were performed by using Density Functional Theory (DFT). The binding mechanisms and energies of APABA molecules on the epoxy-terminated Si(100)-(2x2) surfaces were theoretically investigated. Firstly, two possible models for chemisorption site of the trans-APABA molecule on the epoxy-terminated surface were considered; (i) amino-site binding (Model 1) and (ii) carboxyl-site binding (Model 2). The results showed that the Model 1 was energetically more favorable than Model 2 by 0.43 eV. Secondly, *trans*-APABA molecule was folded at different angles to obtain *cis*-APABA molecule on the surface. As a result, *trans*-surfaces were found energetically more favorable than *cis*-surfaces by 1.65 eV.

Science Code	:201.1.041
Key Words	:Nanotechnology, self-assembled monolayers, photo-sensitive molecule, DNA chip, density functional theory (DFT)
Page Number	: 202
Advisers	: Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA Prof. Dr. Mehmet ÇAKMAK

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımlarını hiç bir zaman esirgemeyen değerli hocalarım sayın Prof. Dr. Tuncer ÇAYKARA'ya ve sayın Prof. Dr. Mehmet ÇAKMAK'a sonsuz teşekkürlerimi sunmayı bir borç bilirim.

Çalışmalarım sırasında ilgi, destek ve yardımlarını esirgemeyen Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Nursel DİLSİZ'e, Biyoloji Bölümü öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Leyla AÇIK'a ve Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi öğretim üyesi sayın Doç. Dr. Mehmet Ali ERGÜN'e çok teşekkür ederim.

Tezimin şekillenmesinde destek ve yardımlarından ötürü TİK komisyonumda bulunan değerli hocalarım Prof. Dr. Bekir SARI ve Prof Dr. Şinasi ELLİALTIOĞLU'na sonsuz teşekkürler.

Bana her zaman destek olan ve beni her zaman umutlandıran, en zor zamanlarımda destekleriyle tekrar toparlanmamı sağlayan anneme ve kardeşime sonsuz teşekkürler.

Bu tezin ortaya çıkmasında bana en büyük desteği veren, her zaman yanımda olan, en zor zamanlarımda sevgisi ve anlayışıyla güç veren canım babacığım Vedat Birlik, keşke bu tezin bittiğini günü de görebilseydin. Bu tez babacığımın eseridir ve babacığma ithaf edilmiştir.

Bu uzun yolculuğa birlikte başladığım, her zaman desteğini hissettiğim canım dostum Dr. Eylem TURAN'a ve tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler.

Hayattaki en büyük varlığım olan sevgili eşim Dr. Gökhan Demirel'e sonsuz desteği, anlayışı ve sabrı için çok teşekkürler.

108M018 nolu proje kapsamında çalışmalarımı destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu'na ve 05/2008-43 nolu Gazi Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET	iv
ABSTRACT	v
TEŞEKKÜR	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xxii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Nanodünya İçine Yolculuk	4
2.2. Nanobiyoteknoloji.....	6
2.3.Kendiliğinden Düzenlenme Yöntemi	9
2.3.1.Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar	12
2.3.2. Altın yüzeyler üzerine oluşan kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar	13
2.3.3. SiO ₂ yüzeyleri üzerinde kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar	14
2.4. Işık kontrollü Yüzey Tasarımı.....	16
2.4.1. Fotokimya	16
2.4.2. Işık duyarlı molekül	17
2.4.3. Azobenzen fotokimyası	18
2.4.4. Moleküler hareketlilik ve fotoanahtar moleküller	21
3. YÜZEY KARAKTERİZASYON YÖNTEMLERİ	24
3.1. X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)	25
3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM).....	27
3.3. Elipsometre	28
3.4. Değme Açısı Ölçümleri	30

Sayfa

3.4.1. Van Oss & Good'a göre asit-baz yöntemi.....	33
3.5. Floresans Mikroskobu.....	34
3.6. Konfokal Mikroskobu.....	36
4. HESAPLAMALI TEORİK KİMYA	39
4.1. Moleküler Mekanik Yöntemler (MM)	39
4.2. Yarı-denel (semi emprical) Yöntemler.....	39
4.3. Ab initio Yöntemler	40
4.3.1. Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT)	40
4.3.2. Hartree-Fock teorisi	41
4.3.3. Yerel yoğunluk yaklaşımı (LDA)	42
5. DENEYSEL KISIM.....	43
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	43
5.1.1. Si(100) yüzeylerin temizlenmesinde kullanılan maddeler	43
5.1.2. Si(100) yüzeyler üzerinde tekli ve çoklu tabakaların hazırlanmasında kullanılan maddeler	43
5.1.3. Işık kontrollü DNA çip için kullanılan DNA dizileri ve gerekli kimyasallar	44
5.2. Yüzeylerin Temizlenmesi	45
5.3. Temizlenmiş Yüzeylere Organik Moleküllerin Bağlanması	46
5.3.1. Epoksi-sonlu yüzeylerin hazırlanması	46
5.3.2. Işık duyarlı 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) Sentezi ..	47
5.3.3. Işık-duyarlı yüzeylerin hazırlanması	48
5.4. Işık kontrollü DNA Çip.....	49
5.4.1. Pro-DNA dizilerinin ışık kontrollü yüzeylere bağlanması	49
5.4.2. Işık kontrollü DNA çip için hibridizasyon çalışması	50

Sayfa

5.4.3. Işık kontrollü Prob-DNA bağlı yüzeyler için kontrol hibridizasyon çalışması	51
5.4.4. Işık kontrollü DNA çip için gerçek DNA numunesi ile kontrol çalışması	52
5.5. Yüzeylerin Kimyasal ve Biyokimyasal Karakterizasyonu	52
5.5.1. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)	52
5.5.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi.....	53
5.5.3. Elipsometre.....	53
5.5.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	53
5.5.5. UV spot lambası cihazı	53
5.5.6. Değme açısı ölçümleri	54
5.5.7. Floresans mikroskobu	54
5.5.8. Konfokal mikroskobu	55
5.6. Teorik Yüzey Dizaynı	55
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	56
6.1. Epoksi-sonlu Yüzeylerin Hazırlanması.....	56
6.2.GPTS ile Hazırlanmış Epoksi-sonlu Yüzeylerin Karakterizasyonu.....	58
6.2.1. Yüzeyin kimyasal bileşimi.....	58
6.2.2. Epoksi-sonlu yüzeyler için optimum hazırlama şartları	62
6.3. Işık kontrollü Yüzeylerin Hazırlanması	73
6.3.1. Işık-duyarlı 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) bileşiğinin sentezi ve karakterizasyonu.....	73
6.3.2. Işık kontrollü yüzeylerin kimyasal bileşimi	86
6.3.3. Işık kontrollü yüzeyler için optimum hazırlama şartlarının belirlenmesi	90

Sayfa

6.4. Işık kontrollü Yüzeylerin Fotoizomerizasyon Özellikleri.....	97
6.4.1. Foto-tekrarlanabilirlik çalışması	97
6.4.2. Işık-duyarlı yüzeylerin ışınlama zamanına bağlı fotoisomerizasyon özellikleri	98
6.4.3. Işık kontrollü yüzeylerin farklı sıvılarla alınan değme açısı ölçümleri ile yüzey formasyonunun incelenmesi	102
6.5. Işık kontrollü DNA Çip için Hazırlama Şartlarının Belirlenmesi	111
6.5.1. Prob-oligonükleotid (Prob-DNA) derişimi etkisi.....	111
6.5.2. Prob-DNA için immobilizasyon süresi etkisi.....	116
6.6. Işık kontrollü DNA Çip için Hibridizasyon	119
6.6.1. Eşlenik oligonükleotid derişiminin hibridizasyon üzerine etkisi.....	120
6.6.2. Hibridizasyon süresi etkisi	123
6.6.3. Eşlenik olmayan oligonükleotid dizisini ile hibridizasyon kontrolü	127
6.7. Hazırlanan DNA Çip için Hibridizasyonun Işık ile Kontrolü	130
6.7.1. Kullanılan floresans boyalarının özellikleri.....	130
6.7.2. Işık kontrollü hibridizasyon çalışması	132
6.8. Işık kontrollü DNA çip için Gerçek Numunesi ile Kontrol Çalışması.....	136
7. IŞIK KONTROLLÜ YÜZEYLERİN TEORİK TASARIMI	141
7.1. Teoriksel Metot	141
7.2. Si (100) Yüzeyleri.....	141
7.2.1. Temiz Si(100)-2x2 yüzeyi	143
7.2.2. Kısmen hidroksillenmiş Si(100)-2x2 yüzey	143
7.3. Epoksi-sonlu yüzeylerin teorik tasarımı.....	145

Sayfa

7.3.1. GPTS molekülü	145
7.3.2. GPTS bağlı Si(100)-(2x2) yüzeylerinin teoriksel tasarımı	147
7.4. Işık kontrollü yüzey tasarımı için teorik hesaplamalar	150
7.4.1. APABA molekülü	150
7.4.2. Işık kontrollü çok tabakalı yüzeylerin hazırlanma mekanizması	159
8. SONUÇLAR.....	172
KAYNAKLAR	177
ÖZGEÇMİŞ	200

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 6.1. Hidroksillenmiş ve farklı bekletme sürelerinde GPTS bağlanmış Si(100) yüzeyleri için elipsometrik kalınlık ve su değme açısı ölçümleri	64
Çizelge 6.2. Hidroksillenmiş ve farklı derişimlerde hazırlanan GPTS çözeltilerde bekletilmiş Si(100) yüzeyleri için elipsometrik kalınlık ve su değme açısı ölçümleri	68
Çizelge 6.3. 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu molekülündeki fonksiyonel gruplara ait titreşim frekansları	75
Çizelge 6.4. 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu molekülünün ¹ H-NMR kimyasal kayma değerleri.....	78
Çizelge 6.5. Farklı sıcaklıklarda hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin elipsometrik kalınlıkları ve su değme açıları	95
Çizelge 6.6. Işık kontrollü yüzeylerin farklı sıvılar kullanılarak alınan değme açıları ile değme açısı değışimi ve histerizi değerleri.....	104
Çizelge 6.7. Yüzey enerjilerin hesabında kullanılan sıvılar ve enerji bileşenleri (mJ/m ²).	108
Çizelge 6.8. Van Oss eşitliği kullanılarak hesaplanan ışık kontrollü yüzeylere ait yüzey enerji bileşenleri (mJ/m ²)	108
Çizelge 7.1. APABA molekülü için hesaplanan bağ uzunlukları (Å).....	152
Çizelge 7.2. Farklı konformasyonlardaki APABA molekülü için bağl enerjiler.....	158
Çizelge 7.3. Işık kontrollü yüzeylerdeki APABA molekülü için farklı modellere ait trans-cis isomerizasyonları için moleküler boy ve sistemin bağl enerjileri.....	168

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Etiketli prob-DNA zinciri ile teşhis amaçlı kullanılan hedef-DNA zincirinin eşleşmesinin şematik gösterimi.....	9
Şekil 2.2. Langmuir-Blodget filmin hazırlanışın şematik gösterimi.....	11
Şekil 2.3. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (KDT) oluşumunun şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.4. Altın yüzeyi üzerinde tiyol türevi moleküllerin düzenlenme Mekanizması	13
Şekil 2.5. SiO ₂ yüzey üzerine trialkilsilanların kendiliğinde düzenlenmesinin şematik gösterimi.....	15
Şekil 2.7. Fonksiyonel gruplarına göre sınıflandırılan azobenzen molekülleri; (a) Azobenzen, (b) Aminoazobenzen ve (c)Yalancı stilben.	18
Şekil 2.8. Azobenzen molekülünün fotoizomerizasyonu sırasındaki,(a)konformasyonel değişimi, (b) Farklı konformasyonlar arasındaki enerji ve kuantum verimi farkı.	19
Şekil 3.1. XPS tekniğinin şematik gösterimi.....	25
Şekil 3.2. X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisinin (XPS) şematik gösterimi.	26
Şekil 3.3. Bir Atomik Kuvvet Mikroskobunun genel şeması	28
Şekil 3.4. Elipsometrinin genel şeması	29
Şekil 3.5. Bir sıvı damlasının yüzey üzerinde (a) tutunması, (b)yayılmasının şematik gösterimi.	30
Şekil 3.6. Değme açısı ölçümünün şematik gösterimi;(a) İleri yönlü değme açısı, $\theta_{İleri}$ ve (b) Geri yönlü değme açısı, θ_{geri}	31
Şekil 3.7. Floresans Mikroskobu'nun şematik gösterimi	36
Şekil 3.8. Konfokal Mikroskobunun şematik gösterimi.....	37
Şekil 5.1. Kullanılan kimyasal maddelerin moleküler yapıları	44

Şekil	Sayfa
Şekil 5.2. Kimyasal maddelerin moleküler yapıları	45
Şekil 5.3. UV spot lambası cihazı	54
Şekil 6.1. Hazırlanan yüzeylerin şematik gösterimi; (a) Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler, (b) Epoksi-sonlu Si(100) yüzeyler	57
Şekil 6.2. Hazırlanan Si(100) yüzeylerin XPS spektrumları; (A) Hidroksillenmiş Si(100) ve (B) GPTS bağlanmış Si(100) yüzeyleri	59
Şekil 6.3. Epoksi-sonlu yüzeylere ait Si 2p için yüksek ayrımlı XPS spektrumu.....	60
Şekil 6.4. Yüksek ayrımlı XPS spektrumları; (A) Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyleri için C 1s piki ve (B) GPTS bağlanmış Si(100) yüzeyleri için farklı elektronik çevreye sahip karbon atomlarına ait C 1s piki.....	61
Şekil 6.5. Elipsometrik 2D- görüntüleri; (A) Si-OH, (B) GPTS (5h)/Si, (C) GPTS(10h)/Si, (D) GPTS (18h) /Si ve (E) GPTS (24h)/Si	63
Şekil 6.6. Epoksi-sonlu yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine bekletme.....	65
Şekil 6.7. Elipsometrik 2D görüntüleri; (A) Si-OH, (B) % 0.5 (v/v) GPTS/Si, (C) %1.0 (v/v) GPTS/Si, (D) %1.5 (v/v) GPTS/Si, (E) GPTS % 2.0 (v/v) GPTS/Si.....	67
Şekil 6.8. Epoksi-sonlu yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine GPTS derişimi etkisi	69
Şekil 6.9. Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler için (a) iki boyutlu, (b) üç boyutlu yüzey morfolojileri (5 µm x 5 µm)	71
Şekil 6.10. Epoksi-sonlu Si(100) yüzeyler için (a) iki boyutlu, (b) üç boyutlu yüzey morfolojileri (5 µm x 5 µm).	72
Şekil 6.11. Işık-duyarlı 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit bileşiğinin sentezinin şematik gösterimi.....	74

Şekil	Sayfa
Şekil 6.12. ATR-FTIR Spektrumu (a) p-Fenilendiamin, (b) 4-Nitrobenzoik asit, (c) 4, (4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu	75
Şekil 6.13. (4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu (APABA) bileşiğine ait d-DMSO içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumu.....	76
Şekil 6.14. (4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu (APABA) bileşiğine ait d-DMSO içerisinde alınan 6-8 ppm bölgesi için genişletilmiş ^1H -NMR spektrumu.....	77
Şekil 6.15. (4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) bileşiğine ait sıvı kromatografisi kütle spektrumu (LC-MS).	79
Şekil 6.16. APABA bileşiğinin DMSO içerisinde hazırlanan 20 μM 'lık çözeltisinin 366 nm UV ışık altına ışınlanması sonucu zamanla değişen trans→cis isomerizasyonuna ait UV Spektrumu	82
Şekil 6.17. APABA bileşiğinin DMSO içerisinde hazırlanan 20 μM 'lık çözeltisinin 450 nm ışık altına ışınlanması sonucu zamanla değişen cis→trans isomerizasyonuna ait UV Spektrumu	83
Şekil 6.18. Fotoizomerizasyon kinetiği; (a) APABA bileşiğinin trans-cis izomerizasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiği eğrisi, (b) APABA bileşiğinin absorptans değerlerinin UV ışınlama zamanla değişimi.	85
Şekil 6.19. Işık kontrollü sonlu silikon yüzeylerin düşük ayırmalı XPS spektrumu.....	87
Şekil 6.20. Işık kontrollü yüzeylerin N 1s pikine ait yüksek ayırmalı XPS spektrumu.....	88
Şekil 6.21. Işık kontrollü yüzeyler için C 1s piklerinin yüksek ayırmalı XPS spektrumu.....	89
Şekil 6.22. Işık kontrollü elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine bekletme etkisi	91
Şekil 6.23. Işık kontrollü yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine APABA derişimi etkisi	93

Şekil	Sayfa
Şekil 6.24. Farklı sıcaklıklarda hazırlanan yüzeylerin elipsometrik 3-D görüntüleri; (A) 22°C, (B) 50°C	94
Şekil 6.25. APABA bağlı Si yüzeylere ait 2-boyutlu ve 3-boyutlu yüzey morfolojileri (5 µm x5 µm)	96
Şekil 6.26. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyleri için ışınlamaya bağlı trans→cis→trans döngüsüne ait su değme açısı ölçümleri.....	98
Şekil 6.27. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için ışınlamaya bağlı trans→cis değişimine ait su değme açısı ölçümler.....	100
Şekil 6.28. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için ışınlamaya bağlı cis→trans değişimine ait su değme açısı ölçümleri.	101
Şekil 6.29. APABA-modifiye yüzeyler için sıvıların yüzey gerilimi değişimlerine bağlı görünür bölge ve UV ışık altındaki farklı sıvılardaki ileri değme açısı ölçümleri	106
Şekil 6.30. Işık kontrollü yüzeylerin trans ve cis konumlarına bağlı yüzey enerjileri ve bunların bileşenlerinin değişimleri.....	109
Şekil 6.31. Işık kontrollü yüzeyler üzerine prob-DNA iplikçiklerinin kovalent olarak bağlanmasının şematik gösterimi.....	112
Şekil 6.32. Farklı derişimlerdeki prob-DNA çözeltileri kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin 20 X büyütme floresans.....	114
Şekil 6.33. Işık kontrollü DNA çip için artan prob-DNA derişimine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi.....	115
Şekil 6.34. Farklı bekletme süreleri hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin 20X büyütme floresans mikroskobu görüntüleri	117
Şekil 6.35. Işık kontrollü DNA çip için artan bekletme süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi.....	118
Şekil 6.36. Işık kontrollü DNA çip için artan hedef-DNA derişimine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimine ait Floresans Mikroskobu görüntüleri	121
Şekil 6.37. Işık kontrollü DNA çip için artan hedef-DNA derişimine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi.....	122

Şekil	Sayfa
Şekil 6.38. Işık kontrollü DNA çip için artan hibridizasyon süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimine ait Floresans Mikroskobu görüntüleri	124
Şekil 6.39. Işık kontrollü DNA çip için artan hibridizasyon süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi	125
Şekil 6.40. Floresans Mikroskobu görüntüleri; (A) İki boyutlu;(a) APABA bağlı yüzeye, (b) prob-DNA bağlı yüzeye, (c) hibridizasyon sonrası yüzeye ait; (B) üç boyutlu	126
Şekil 6.41. Işık kontrollü DNA çip için hibridizasyon kontrolüne ait; (a) prob- DNA, (b), eşlenik olmayan DNA (c) eşlenik hedef-DNA ile hibridizasyon sonrası Floresans Mikroskobu görüntüleri.	128
Şekil 6.42. Eşlenik olan (hedef-DNA) ve eşlenik olmayan (kontrol- DNA) ile yapılan hibridizasyon sonucu elde edilen floresans şiddeti değişimleri.	129
Şekil 6.43. Floresans boylarının; (A) Cy3 ve Cy5 boylarının moleküler yapıları ve renkleri, (B) Cy3 ve Cy5 boylarının filtrelele bağlı renk spektrumu.	131
Şekil 6.44. Işık kontrollü bu DNA çip için çalışma mekanizması şematik olarak gösterimi.	133
Şekil 6.45. Işık kontrollü DNA çipin açık (450 nm) ve kapalı (366 nm) durumlarındaki hibridizasyonlarına ait Konfokal Mikroskobu görüntüleri.	135
Şekil 6.46. Işık kontrollü DNA çipin gerçek kan numunesinde elde edilen DNA dizileri ile hibridizasyonuna bağlı yüzeylerin floresans şiddetlerindeki değişim.	139
Şekil 7.1. Si(100) yüzeylerinin geometrik şekli; (a) Si(100)-(1x1), (b) Si(100)-(2x2), (c) Si(100)-(4x2)	142
Şekil 7.2. Temiz Si(100)-2x2 yüzeyinin; (A) yandan,(B) üstten görünüşü.	143
Şekil 7.3. Kısmen hidroksillenmiş Si(100)-(2x2) yüzeyler için önerilen, (a) Model a, (b) Model b ve (c) Model c modellerinin yandan ve üstten görünüşü.	145

Şekil	Sayfa
Şekil 7.4. GPTS molekülünün relaksasyonu sonucu elde edilen en olası geometrik yapısı.	146
Şekil 7.5. GPTS molekülünün (a) Model 1 ve (b) Model 2 olmak üzere Si(100)-2x2 yüzeyine farklı modellerde bağlanması.....	149
Şekil 7.6. trans-APABA molekülünün yapısı ve fonksiyonel grupları	151
Şekil 7.7. trans-APABA molekülü için önerilen olası geometriler; (a) Model A (b) Model B.....	153
Şekil 7.8. cis1-APABA molekülünün en olası geometrisi.	154
Şekil 7.9. cis2-APABA molekülünün en olası geometrisi	155
Şekil 7.10. cis3-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü.....	155
Şekil 7.11. cis4-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü.....	156
Şekil 7.12. cis5-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü.....	157
Şekil 7.13. APABA molekülü için tras-cis konformasyonel değişimine ait modellerin bağıl enerji değişimleri.	158
Şekil 7.14. GPTS-modifiye yüzeylerdeki epoksi halkasının; (A) –NH ₂ fonksiyonel grubuyla (B) –COOH fonksiyonel uç grubundan açılmasının şematik gösterimi.	160
Şekil 7.15. trans-APABA molekülünün epoksi-sonlu yüzeye –NH ₂ fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi (Model 1).	161
Şekil 7.16. trans-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi (Model 2).	162
Şekil 7.17. Model 1a: cis-APABA molekülünün –NH ₂ fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi.	164
Şekil 7.18. Model 2a: cis-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi.	165

Şekil	Sayfa
Şekil 7.19. Model 1b: cis-APABA molekülünün –NH ₂ fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi.	166
Şekil 7.20. Model 2b: cis-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi.	167
Şekil 7.21. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için trans-APABA (Model 1) ve cis-APABA (Model 1b) molekülünün en kararlı konumları	169

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

V_{ks}

Khon-Sham potansiyeli

Kısaltmalar

Açıklamalar

AFM

Atomik kuvvet mikroskobu

APABA

4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit

Cy3 ve Cy5

Siyano türevi boyalar

DFT

Yoğunluk fonksiyonu teorisi

DMSO

N,N-Dimetilsülfoksit

DNA

Deoksiribo nükleik asit

EDAC

1-Etil-3-(3-dietilamino-propil)karbodiimid

EDTA

Etilendiamintetraasetik asit

FT-IR

Fourier transform infrared spektroskopisi

GPTS

(3-Glisidoksipropil)trimetoksisilan

KDT

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar

LDA

Yerel yoğunluk yaklaşımı

NHS

N-Hidroksisüksinimit

tris

tris(hidroksimetil) aminometan

VASP

Viyana *ab initio* simulasyon paket programı

XPS

X-ışınları fotoelektron spektroskopisi

1. GİRİŞ

Son yıllardaki bilimsel çalışmaların temel amacı hızla artan dünya nüfusuna sağlıklı yaşam koşulları hazırlamak üzerine yoğunlaşmıştır. Modern bilim bunu sağlamak için biyolojik olaylara moleküler düzeyde bakarak yaşamda gerçekleşen biyolojik reaksiyonları anlamaya çalışmaktadır. Buradan çıkaracağı bilgiler ile hayatı kolaylaştıracak ve daha kaliteli yaşam koşulları sağlayacak yeni teknolojik ürünler geliştirmeye çalışmaktadır. Özellikle günümüz bilim adamları, doğal ve sentetik biyolojik moleküllerin kullanıldığı yeni özelliklere sahip, nano boyutta malzemeler ve sistemler tasarlaması ve üretimi üzerine yoğunlaşmıştır [1]. Bu tür yeni malzemeler nanoteknoloji ve biyoteknolojinin birlikte gelişmesi ile oluşan *nanobiyoteknolojinin* temel araştırma konusunu oluşturmaktadır. Nanobiyoteknoloji'nin gelişmesiyle birçok hastalığın, genetik bozuklukların ve birçok genetik hastalığın teşhis ve/veya tedavisi için yeni yöntemlerin ve ürünlerin geliştirilmesini mümkün hale gelmiştir [2-3].

DNA yaşamla ilgili tüm bilgiyi taşıyan sihirli bir anahtardır. DNA'da zamanla meydana gelebilecek değişiklikler (mutasyon), yanlış ürün (biyolojik molekül) üretimi nedeniyle biyolojik fonksiyonların bozulmasını ve buna bağlı olarak birçok hastalığın ortaya çıkmasına yol açmaktadır. Genetik değişikliklerin ve/veya oluşan biyolojik moleküllerin izlenmesi ile oluşan veya oluşabilecek hastalıkların erken tanısı ve etkin tedavisi mümkündür. Şüphesiz bu analizlerin doğru ve hızlı bir şekilde yapılabilmesi bu hastalıklara ait birçok sorunun çözümünü oluşturmaktadır. Bu durum hastalıklardan korunmada ve tedavisinde çok önemlidir. Biyolojik moleküllerin tanısında kullanılabilecek en duyarlı ve özel yaklaşımlar tanıyıcı olarak bu moleküllerin eşleniklerinin (örneğin DNA tek sarmalının eşleniği oligonükleotid, proteinin karşıtı antikor molekülü, vb.) kullanıldığı biyoafinite sistemlerini oluşturan ve biyoçip olarak adlandırılan tanı kitleridir [4]. Yeni nesil nanoteknolojik ürünlerden

biri olan “Biyoip” çeşitli yöntemlerle hazırlanabilmektedir [5-9]. Bu hazırlama tekniklerinden biri de çeşitli yüzeyler üzerinde kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ile yapılan nanoboyuttaki tasarımlardır. Kendiliğinden düzenlenme olgusu biyoçip teknolojisinde önemli bir yere sahiptir. Kendiliğinden düzenlenme (Self-assembly) işlemleri ile iki boyutlu nanoyapıların oluşturulması moleküler seviyede yüzey modifikasyonu, tıbbi teşhis, biyoteknoloji, mikro ve nano-elektromekanik sistemler (MEMS ya da NEMS) gibi çok geniş bir uygulama alanına sahiptir [10]. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (KDT) yöntemi, katı yüzey üzerinde hazırlanan biyolojik sistemler için oldukça önemlidir.

Son zamanlarda, biyoçip teknolojisinde ışık, sıcaklık ve pH gibi dış etkenlere duyarlı akıllı sistemlerin hazırlanmasında kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (KDT) yöntemi kullanılmaktadır [11]. Bu tür sıcaklık ve pH duyarlı sistemler için özellikle biyoçip’in hazırlanacağı yüzeyler (SiO_2 , Au vb.) sıcaklık veya pH değişimine duyarlı polimerik filmler ile kaplanarak akıllı sistemler hazırlanmaya çalışılmaktadır [12-22]. Bunların yanında ışık-duyarlı azobenzen türevi bileşikler fotoizomerizasyon özellikleri nedeniyle son yıllarda özellikle biyoteknolojide geniş bir uygulama alanına sahiptir [23-28]. *Zhang* ve arkadaşları tiyol uç grulu ışık duyarlı azobenzen türevi bileşiklerin altın yüzeyi üzerindeki *trans* durumdan *cis* duruma fotoizomerizasyonunu gözlemlemişlerdir [29]. *Moroder* ve arkadaşları azobenzen türevi bileşikleri kullanarak halkasal peptitler oluşturmuşlar ve bunların iki farklı dalga boyundaki konformasyon değişimlerini incelemişlerdir [30-33]. *Kwak* ve arkadaşları bir başka çalışmada ise akıllı membranlar oluşturmak amacıyla azobenzen türevi bileşikleri ile yazılıp silinebilir özellikte süper hidrofobik yüzeyler elde etmişlerdir [34]. *Asanuma* ve *Komiyama* azobenzen türü bileşikler içeren sentetik oligonükleotidler kullanarak ışık kontrollü DNA ift sarmallarının oluşumunu gözlemlemişlerdir [35]. *Masahiko* ve ark.(1999) ise yaptıkları bir çalışmada, mika yüzeyi üzerine *anti-trans* azobenzen antibadi bağlamışlar ve AFM kullanarak azobenzen

gruplarındaki *cis-trans* dönüşümleri ile antibadi bağlanmasının ışık ile kontrol edilebileceğini gözlemlemişlerdir [36]. Asanuma ve Kamei yaptıkları çalışmalarda ışık-duyarlı azobenzen türü bileşikler içeren oligonükleotitler kullanılarak çözelti ortamındaki konformasyonel değişimleri ve ışık-duyarlı moleküllerin etkisiyle oluşan hibritleşmeleri incelemişlerdir [37, 38].

Bu çalışmada, kalıtsal bir hastalık olan β -talasemi'nin teşhisine yönelik ışık kontrollü yeni bir DNA çip tasarlanması amaçlanmıştır. Bu yeni ışık ile kontrol edilebilen, akıllı malzeme kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yöntemi kullanılarak hazırlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle Si(100) yüzeyleri ıslak aşındırma tekniği kullanılarak temizlenmiş ve aktif hale getirilmiştir. Bu aktif yüzeyler üzerine (3-Glisidoksipropil)trimetoksisilan (GPTS) moleküllerinin kendiliğinden düzenlenmesi sonucu kendiliğinden düzenlenen ilk tabakayı oluşturan epoksi-sonlu yüzeyler hazırlanmıştır. Bu epoksi-sonlu yüzeyler üzerine ışık-duyarlı azobenzen türevi bir bileşik olan 4,4'-aminofenilazo benzoik asit (APABA) moleküllerinin kovalent olarak bağlanmasıyla ışık kontrollü yüzeyler hazırlanmıştır. Bu ışık kontrollü yüzeylere β -talasemi hastalığının gen dizisine sahip olan floresans etiketli prob oligonükleotid dizisi immobilize edilmiştir. Hazırlanan DNA çip için hibridizasyonun ışık ile kontrolü incelenmiştir.

Hazırlanan yüzeylerin kimyasal karakterizasyonu X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi (XPS) ile incelenmiştir. Ayrıca, yüzeylerin topolojisi Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM), hidrofilik-hidrofobik karakteri değme açısı ölçüm cihazı (Contact angle), ve kalınlıkları ise Elipsometre kullanılarak araştırılmıştır. Işık kontrollü DNA çip için hibridizasyon çalışmaları ise Floresans Mikroskobu ve Konfokal Mikroskobu kullanılarak yapılmıştır.

Çalışmanın ikinci kısmında, hazırlanan bu çok tabakalı ışık kontrollü sistem teorik çalışmalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır. Bu çok tabakalı ışık kontrollü sistemi oluşturan her bir molekülün ve tabakaların, *ab initio*

kodunu kullanan Viyana *ab initio* simulasyon paket programı (VASP) kullanılarak en kararlı geometrik şekilleri ve enerjileri hesaplanmıştır. Bu şekilde, yüzeyler üzerine moleküller farklı şekillerde bağlanarak en düşük enerjili ve en kararlı halde bulundukları yapıları belirlenmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan ışık kontrollü DNA çip deneysel ve teorik çalışmalar ile incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Nanodünya İçine Yolculuk

Mikroteknolojinin bulunuşu ile hayatımız çarpıcı bir şekilde değiştirmiştir. En büyük etkisini bugün en önemli endüstrilerin başını çeken bilgisayar teknolojisi üzerinde göstermiştir. Bu gelişmelerden, mikroteknoloji ve mikroelektronik alanlarının dışında birçok yeni alan etkilenmiştir. Mikroteknoloji ile ancak ışık mikroskobu ile görülebilen büyüklükteki yapılara ulaşılabilmekteydi. Bu yapıların boyutları, çıplak gözle görülebilen yapılardan bin kat (1/1000) daha hala küçük fakat bir atomdan bin kat daha büyüktür. Bugün ise gelişen teknoloji ile daha küçük boyutlara kadar inilebilmektedir. Bu yeni ve gelişen teknoloji nanoteknoloji kavramını tanımlamaktadır. Nanoteknoloji, nano boyutta yeni malzemelerin üretilmesine ve bu ölçekteki yapıların incelenmesine olanak sağlayan yeni bir teknolojidir. Bu teknoloji, yakın alan iyon mikroskobu, elektron mikroskobu ve son olarak taramalı elektron mikroskobunun bulunması ile daha da gelişmiştir. Bu şekilde nano ölçekteki yapıların ve hatta atomun bile görüntülenmesi sağlanmıştır [39, 40].

Kimya ve mikroteknoloji temelde birbirinden farklı görünmesine rağmen, aslında birbirleriyle oldukça ilgili iki bilim dalıdır. Çünkü her iki bilim dalı da malzemelerin özellikleri konusunda ortak bir alanda buluşmaktadır. Nano boyuttaki malzemelerin özellikleri mikroteknoloji geleneksel mekanik metodlarını kullanarak incelenememektedir. Plazma işlemleri, ıslak kimyasal aşındırma ve foto-dirençli teknikler gibi kimyasal metotlar

yeniden yapılandırma ve kesme gibi mekanik metotlara göre çok daha üstündür. Klasik kimyadaki gibi, mikroteknolojideki kimyasal işlemler çok sayıda benzer parçacığı kullanır. Çeşitli uygulamalarda ve fabrikasyon metotlarında tek bir parçacık bile kendi başına çok önemli bir rol oynar [40-42].

Nanoteknolojide ise klasik fiziksel prensipleri yerini moleküler ve atomik boyuttaki yaklaşımlarla değiştirir. Fiziksel ve kimyasal bakış açıları, nano yapıların uygulamalarını ve fabrikasyonlarını eşit şekilde etkiler. Kuantum olgusunu kullanan ve bu alandan etkilenen *mesoskopik* fiziğin etkileri bu görüşü tamamlar niteliktedir. Klasik kimyanın aksine, bir araya gelen benzer moleküllerin oluşturduğu küçük parçacıklar hatta tek bir tanecik bile bu sistem içerisinde belirleyici bir rol oynar.

Nanoteknoloji literatürü birbirinden farklı olan iki temel yaklaşım üzerinde odaklanmıştır. Nano ölçekte yeni malzemeler, yukarıdan-aşağı (top-down) ve aşağıdan-yukarı (bottom-up) olarak adlandırılan bu iki farklı yaklaşım kullanılarak üretilmektedir [43]. Yukarıdan-aşağı yaklaşımı, mikroteknolojiden, nanometre ölçekteki yapı boyutuna ulaşmak için metotlar geliştirmeye çalışır. Bu yaklaşım, diğer yaklaşımın aksine atomik ve moleküler birimlerin bir araya gelerek oluşturdukları, nanometre boyutundan supramoleküler yapılara kadar uzanan ölçekteki değişen fiziksel ve kimyasal özellikler üzerine kurulmuştur. Aşağıdan-yukarı yaklaşımı ise kimyasal ilkelerden büyük ölçüde etkilenir. Aşağıdan-yukarı yaklaşımında basit moleküler yapıların moleküler tanınması ile kendiliğinden düzenlenmesinde, mikro ve nanoyapıların oluşumunda, kimyasal ve fiziksel özelliklerin rolü büyüktür [40-43]. Her iki teknik de yeni nanoteknolojik malzemelerin üretilmesinde yeni imkânlar sağlamaktadır. Litografik teknikler (aşağıdan-yukarı), çevre ve yapılar arasındaki iletişimi kurarken, kimyasal yaklaşım (yukarıdan-aşağı) ile bu mümkün değildir. Aynı zamanda, fonksiyonel mikro çevre içerisindeki nanoyapıların birleşmesine olanak sağlar. Diğer taraftan, kimyasal teknoloji ise kimyasal

bağlanma dayanıklılığının, bağların tercih ettikleri yönelimlerinin ve bağ açılarının düzenlenmesini sağlar. Sonuç olarak, nanoteknoloji klasik mikroteknoloji ve kimya bilimi üzerine kurulmuştur.

Doğa yapısı içerisinde ürettiği her malzemede, bu anlatılan metotları ve yaklaşımları ilk günden beri çok düzenli ve hatasız bir şekilde kullanmaktadır. Doğadaki disiplinler arası yapılanmayı anlayabilmek için, biyolojik nanoyapıların nasıl oluşturulduğunu, daha büyük biyolojik sistemler ve inorganik malzemeler ile nasıl etkileştiğini bilmek gereklidir. Biyolojik moleküller ile inorganik malzemelerin arayüzeyini anlayabilmek son yıllarda bilim adamlarının yoğunlukla üzerinde çalıştıkları bir konu haline gelmiştir. Bu çalışmalar sonucunda yeni bir yaklaşım olan ve nanoteknoloji ile biyoloji bilimini bir araya getiren *Nanobiyoteknoloji* kavramı ortaya atılmıştır.

2.2. Nanobiyoteknoloji

Nanoteknoloji bir önceki bölümde bahsedildiği gibi son yılların en heyecan verici ve ilgi çekici teknolojilerinin başında gelmektedir. Bu teknolojiyi bu kadar önemli yapan atomik ve moleküler düzeyde 1 nm ile 100 nm arasındaki boyutlarda ve değişik şekillerdeki (silindirik, kübik, çubuk v.b.) malzemelerin üretimine olanak sağlamasıdır [39, 44-48]. Günümüzde nanoteknoloji, görüntüleme, ilaç salımı, gen terapi gibi biyomedikal amaçlı uygulamaların yanı sıra, nanokristaller, veri depolanması ve değişimi gibi bilgisayar bilimleri ile ilgili uygulamalarda da kullanılmaya başlanmıştır [44-48]. Bu popüler bilim dalının biyolojik sistemlere uygulanması ile yeni bir bilim dalı olan nanobiyoteknoloji ortaya çıkmıştır. Doğa; DNA, proteinler, membranlar ve hücre bileşenleri gibi kusursuz fonksiyonel nanoyapıları milyarlarca yıldır üretmektedir. Bu biyolojik nanoyapılar üç boyutludur ve çok büyük miktardaki komplekslerin bir araya gelmesinin bir ürünüdür. Doğada bu nanoyapıların oluşumu kendiliğinden yapılanma prensibine dayanmaktadır. Bu kendiliğinden yapılanma eğilimi;

kendiliğinden tamir etme, kendiliğinden tekrarlama, kendiliğinden yok etme ve kendiliğinden düzenlenme şeklinde gözlenmektedir [44-48].

Nanobiyoteknoloji alanındaki bilim adamları ve mühendisler, biyolojik moleküllerin nanoboyutta istenilen şekilde ve boyutta moleküler tasarımını yapabilmek için çalışmaktadırlar. Nanoboyutta sentetik biyolojik malzemeleri üretilebilmesi oldukça önemli bir konudur. Bu tür sentetik biyolojik malzemelerin başarılı bir şekilde üretilebilmesi bu malzemelerin otak alanlarda kullanılmasına olanak sağlayacaktır. Diğer bir ifadeyle, biyolojik maddelerin moleküler tanıma, kendiliğinden düzenlenme ve kalıp olabilme özelliklerinden esinlenerek üretilen bu sentetik biyolojik malzemeler ile fiziksel ve kimyasal özellikleri büyük çapta genişletilebilmiş yeni biyolojik nanoyapılar (biomimetic) tasarlanabilecektir. Bu amaç için, inorganik ve organik maddelerin nanoboyuttaki supramoleküler yapıların sentezlenebilmesi ve tasarımı önemli bir rol oynar.

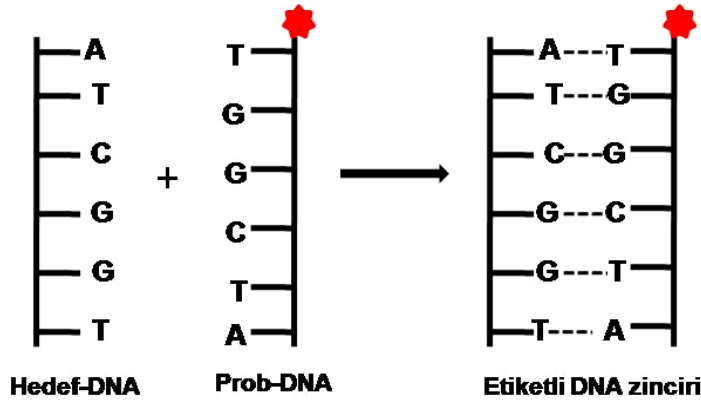
Doğadaki disiplinler arası yapılanmayı anlayabilmek için, biyolojik nanoyapıların nasıl oluşturulduğunu, daha büyük biyolojik sistemler ve inorganik malzemeler ile nasıl etkileştiğini bilmek gereklidir. Biyolojik moleküller ile inorganik malzemelerin arayüzeyini anlayabilmek bu doğrultuda en önemli basamaktır. Bu yukarıdan-aşağı yaklaşımında büyük boyutlu materyallerden istenen nanoyapıları oluşturmak için fiziksel metotlardan yararlanılır. Bu metotta, iyi kontrol edilebilen moleküler birimlerin kendi aralarında düzenlenmesiyle nano ölçekteki malzemelerin üretimi yapılabilmektedir. Yukarıdan-aşağı yaklaşımı genellikle mikrofabrikasyon metotlarında kullanılmaktadır [40]. Bu yaklaşımlar, biosensor ve ilaç salımı uygulamaları için biyolojik nanomateriyallerin fabrikasyonu, yüksek duyarlılıkta biyoanalitik gereçlerin ve litografik metotların geliştirilmesi gibi birçok alanda yeni malzemelerin ve yaklaşımların geliştirilmesinde kullanılabilmektedir. Nanobiyoteknolojide gelişmekte olan en popüler alanlar: (1) sentetik biyo-taklitçi nanomakineler için biyolojik nanoyapıların geliştirilmesi [49], (2)

nanotanecekler [50-52] ve(3) DNA tabanlı nanoteknoloji üzerinde yoğunlaşmaktadır [53-55].

DNA merkezli nanoteknoloji 1970'li yıllardan günümüze artan bir ilgiyle çalışılan bir konudur [56]. Yeni yüzey analizi teknikleri ve DNA hibridizasyonunun daha duyarlı izlenebildiği oligonükleotid duyarlı cihazların geliştirilmesi ile DNA merkezli nanoteknoloji hızla gelişmeye devam ettirmektedir. Bu yeni geliştirilen cihazlar; gen analizi, gen dizisi tespiti, mutasyonlu gen bölgesinin tespiti ve genetik hastalıkların tespiti gibi uygulamalarda kullanılabilmektedir. Genetik değişikliklerin izlenmesi, oluşan veya oluşabilecek hastalıkların erken tanısında oldukça önemlidir. Bu amaçla geliştirilen DNA temelli hazırlanan biyosensörler oldukça önemlidir.

DNA, deoksiribonükleotid molekül zincirlerinin bir araya gelmesiyle oluşan bir çeşit polimerdir. Bir deoksiribonükleotid; bir şeker molekülü, bir veya daha fazla fosfat grupları ve bir azotlu baz molekülünden oluşmaktadır. Bir DNA molekülünde; Adenin (A), Guanin (G), Timin (T) ve Sitosin (C) olmak üzere dört farklı baz bulunmaktadır. Deoksiriboz şekerleri fosfat grupları tarafından bir araya getirilerek DNA'nın destek temelini oluşturur. Yapı içerisindeki değişime açık olan bu baz dizisi yaşamla ilgili genetik bilgiyi taşır. Şekerler ve fosfatlar bir araya geldiklerinde fosfodiester bağı oluştururlar. Bir şeker molekülünün 3'-hidroksil grubu, diğer molekülün 5'-hidroksil grubuna bağlanır. Bu şekilde bir DNA dizisindeki bazların sırası 5'-3' yönünde yazılır [57, 58]. DNA iplikçiklerinin eşleşme mekanizması çok özel ve yarı-korunaklı bir işlemdir. Sadece birbirinin eşleniği olan DNA iplikçikleri birbiriyle eşleşerek çift iplik ve sarmal DNA molekülünü oluştururlar. DNA molekülüne ait bu spesifik olan eşleşme mekanizması genetik hastalıkların ve genetik bozuklukların teşhisinde güvenilir bir biçimde kullanılabilmektedir. Bu amaçla geliştirilen DNA çip içerisindeki, eşlenik oligonükleotid dizisi "prob" olarak adlandırılır. Prob-DNA etiketlenebilir. Prob-DNA, kimyasal, sentetik ve enzimatik olmak üzere üç

farklı şekilde etiketlenebilir. Bunlardan en yaygın olarak kullanılan kimyasal bir etiketleme metodu olan Floresans işaretleyiciler ile etiketleme yöntemidir [58]. DNA çip tasarımı; floresans işaretleyiciler ile işaretlenen bir katı destek üzerine immobilize edilmiş prob-DNA dizisi, hedef-DNA olarak adlandırılan ve teşhis amaçlı kullanılan eşlenik hedef-DNA dizisi ile hibritleştirilmesi prensibine dayanmaktadır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Etiketli prob-DNA zinciri ile teşhis amaçlı kullanılan hedef-DNA zincirinin eşleşmesinin şematik gösterimi

Genetik hastalıkların ve bozuklukların teşhisinde önemli bir yere sahip olan DNA çiplerin hazırlanmasında kullanılan en popüler yöntemlerden biri çeşitli yüzeyler üzerinde kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (KDT) ile yapılan nanoboyuttaki tasarımlardır. Kendiliğinden düzenlenme (KD) yöntemi ile atomik ve moleküler etkileşimler ile bir araya gelen tanecikler nano ölçekte, istenilen şekilde çok düzgün yapılar meydana getirirler. Moleküler düzeyde kendiliğinden düzenlenme yöntemi; protein katlanması, nükleik asitlerin ve makromoleküllerin biyolojik sistemlere uyumlu olarak oluşturulması, yöntemin ucuzluğu ve istenilen biyolojik tasarımın kolayca gerçekleştirilebilmesi gibi avantajları bulunduğu için biyoçip teknolojisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [59].

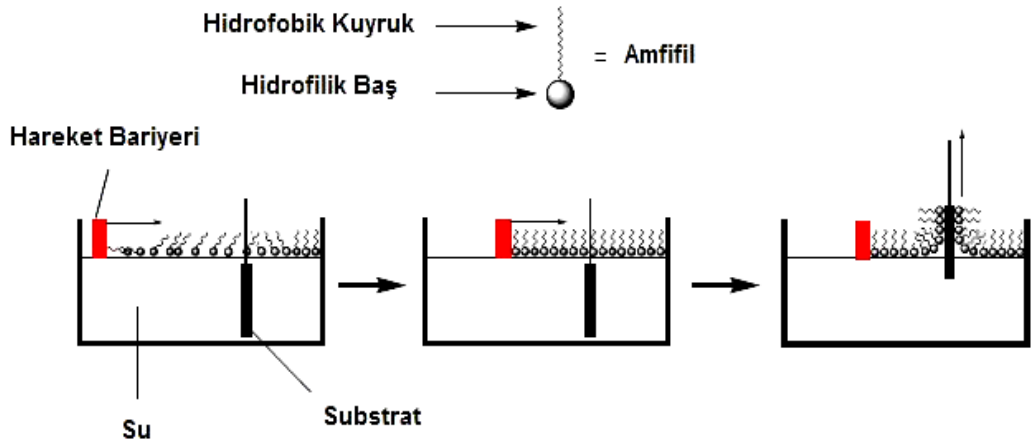
2.3. Kendiliğinden Düzenlenme Yöntemi

Kendiliğinden düzenlenme, dışarıdan hiçbir yardım almadan bir araya toplanma ve düzenlenme anlamındadır. Bu terim, küçük ve büyük

yapıların bir araya gelerek daha büyük ve düzenli yapıları oluşturmaları anlamında kullanılmaktadır. Yaşayan organizmaların oluşumu ve uzay sistemindeki galaksilerin kendiliğinden oluşumu, bu terimi açıklayan en güzel ve çarpıcı örneklerdir. M.Ö. 400 yılında Yunanlı bir düşünür olan Democritus evrendeki tüm materyallerin atomik boyutta evrim geçirdiklerini ve bu evrim sonucunda dünyanın, güneş sisteminin, yıldızların ve galaksilerin kendiliğinden düzenlenerek oluştuğunu öne sürmüştür [60]. Democritus'dan 2000 yıl sonra Fransız düşünür Descartes ise, evrenin oluşumunu doğanın içerisindeki küçük nesnelerin mükemmel ve eksiksiz bir kanunu izleyerek bir araya gelmesinin sonucu olduğunu savunmuştur [60]. Farklı zamanlarda yaşamış bu her iki düşünürün ortak noktası kendiliğinden düzenlenme olgusu üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu iki düşünürden sonraki dönemlerden günümüze kadar bu olgunun popülerliği artan bir ilgiyle devam etmiştir. Kendiliğinden düzenlenme olgusunu anlayabilmek ve bunu sentetik sistemlere uygulayabilmek amacıyla fizik, biyoloji ve kimya bilim dallarındaki bilim adamları bu konu üzerine çalışmalar yapmaktadır. Doğa başlangıcından bu yana bize kendiliğinden düzenlenmenin nasıl olduğunu kendi içerisindeki her yapısında gösterirken bizlerin bunu fark etmesi çok uzun zaman almıştır [61]. Kendiliğinden düzenlenme 1935 yılında Langmuir-Blodgett tekniği ile su yüzeyi üzerinde, Blodgett tarafından ise katı yüzeyler üzerinde amfifilik moleküllerin sıkı istiflenmesi ile gelişmeye başlamıştır [61]. Bu süreci 1946 yılında uzun alkilamin bileşiklerinin platin yüzeyler üzerine sıkı istiflenmesi izlemiştir [62]. Bu dönemler içerisinde hala kendiliğinden düzenlenme kavramı tam olarak açıklığa kavuşturulamamışken, 1983 yılında Nuzzo ve Allara altın yüzeyler üzerine alkil disülfidlerin düzenlenmesini keşfetmişler ve alkentiyollerin bu tek tabaka halinde sıkı istiflenmiş kimyasal adsorpsiyonunu “Kendiliğinden Düzenlenmiş Tek Tabakalar (Self-Assembled Monolayers, SAMs) olarak adlandırmışlardır [63-65].

Eski bir kendiliğinden düzenlenme yöntemi olmasına rağmen Langmuir-Blodgett tekniği günümüzde optik kaplamalarda, biyosensörlerde,

antikorlarda ve enzimlerde kullanılmaktadır. Hava-su ara yüzeyinde oluşan bu tek tabakaya “Langmuir-Blodgett Film” denir. Bu filmlerin hazırlanışı oldukça zor olmasına rağmen farklı amaçlar için kullanılmakta ve tercih edilmektedir.



Şekil 2.2. Langmuir-Blodgett filmin hazırlanışın şematik gösterimi

Bu hava-su arayüzeyinde hazırlanan filmlerin yanı sıra metal yüzeyler üzerinde hazırlanan kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ise oldukça kararlı, kolay hazırlanabilen ve geniş kullanım alanlarına sahip malzemelerdir [66, 39].

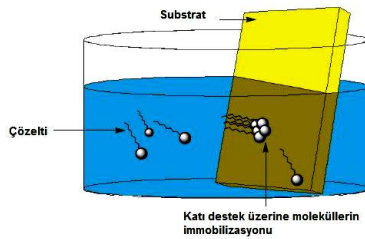
Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ve çoklu tabakalar farklı metalik ve inorganik substrat olarak, Ag, Au, Cu, Ge, Pt, Si, GaAs, SiO₂ gibi malzemeler kullanılarak hazırlanabilir. Bu kendiliğinden oluşan tek tabakalar, alkanetiyoller (R-SH), sülfidler (R-S-R'), disülfidler (R-SS-R'), asitler (R-COOH), ve siloksanlar (R-SiOR₃) gibi ligandlar ya da moleküllerin yüzeyler üzerine bağlanmaları ile oluşmaktadırlar.

Kendiliğinden düzenlenme işlemi, katı yüzey ile üzerine adsorbe olan molekül arasındaki kimyasal etkileşimler sonucu oluşmaktadır. Moleküllerin yüzey üzerinde düzenlenmesini, moleküller ve yüzey arasındaki etkileşim kuvveti ve bu kuvvetin çeşidi etkilemektedir.

Moleküllerin kendi aralarındaki ve moleküller ile yüzey arasındaki etkileşim kuvveti; hidrojen bağına, donör/akseptör veya iyon çiftlerine ve kovalent bağların düzenlenmesine bağlıdır. Kimyasal bağlanma bu nedenle fiziksel etkileşimden daha kararlı ve kuvvetlidir [67]. Kimyasal bağlanmada; yüzeye bağlanacak moleküller ile metal yüzeyler arasındaki etkileşim oldukça kuvvetli ve kararlıdır. Kendiliğinden düzenlenme yönteminde yüzeyin, son fonksiyonel grubu, yüzeyin genel hidrofobik yapısını, tutma (adhesive) karakteri ve reaktivlik özelliğini değiştirirken bu yüzey üzerine moleküllerin tutunması ve düzenlenmesinde de oldukça önemlidir.

2.3.1. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar

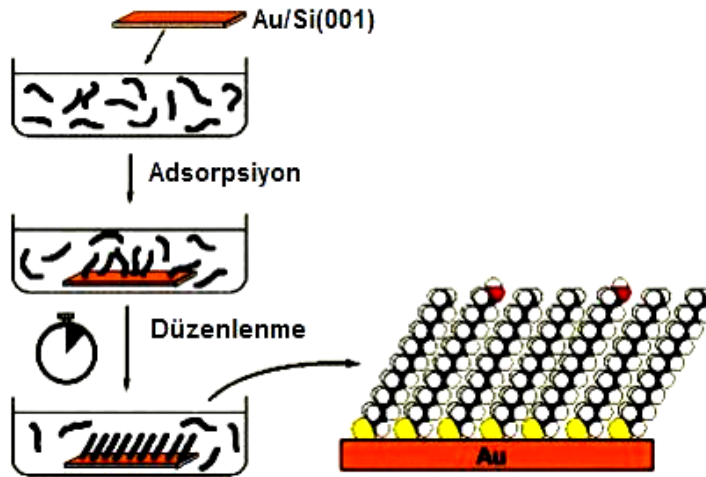
Ulman ve arkadaşları, kendiliğinden düzenlenen tek tabakaları, organik bir çözücünde hazırlanmış surfaktan çözeltisi içerisine daldırılan katı bir destek üzerinde moleküllerin kendiliğinden oluşturdukları düzenlenmenin bir sonucu olarak tanımlar (Şekil 2.3) [68]. Bir önceki bölümde tanımlandığı gibi bu katı destek maddeleri farklı olabilir. Kullanılan katı desteklere bağlı olarak da bu destekler üzerine immobilize olacak moleküller değişmektedir. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar önceki bölümde bahsedildiği gibi katı destek ile üzerine immobilize olacak moleküller arasında gerçekleşen birtakım kuvvetlerin sonucudur. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar çözelti ortamında gerçekleşebildiği gibi gaz fazında da gerçekleşebilmektedir.



Şekil 2.3. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka (KDT) oluşumunun şematik gösterimi

2.3.2. Altın yüzeyler üzerine oluşan kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar

Altın yüzeyler üzerine n-alkantiyollerin kendiliğinden bağlanarak oluşturdukları tek tabakalar 20 yılı aşkın bir süredir üzerinde çalışılan bir araştırma konusudur. Altın yüzeyler üzerine iyi düzenlenmiş SAM'ler sülfür içeren (tiyol, sülfid ve disüfitler) maddeler kullanılarak kolaylıkla hazırlanabilir [67,68]. Altın yüzeylerin 1-10 mM derişimde hazırlanan tiyol ve/veya türevlerinde oluşan çözelti içerisinde en çok 16 saat bekletilmesi sonucu rahatlıkla hazırlanabilmektedir. Şekil 2.4'de tiyol moleküllerinin altın yüzeyi üzerine düzenlenmesi şematik olarak gösterilmektedir. Tiyollerin altın yüzeyi üzerinde düzenlenmesinin kinetik mekanizması iki basamaklı olarak gerçekleşmektedir. Hızlı olan basamakta, molekülleri altın yüzeyi üzerinde birkaç dakika içerisinde fiziksel olarak tutunur, yavaş basamakta ise tiyol moleküllerinin baş kısmını oluşturan kükürt atomları kimyasal olarak altın yüzeyine bağlanırken, kuyruk kısımları kendi aralarında düzenlenerek sıkı istiflenmiş yapıyı oluştururlar [69-72].



Şekil 2.4. Altın yüzeyi üzerinde tiyol türevi moleküllerin düzenlenme mekanizması

Altın yüzeyler üzerine alkantiyollerin kendiliğinden düzenlenmesi oldukça düzenli bir yapıdadır. Sülfür atomları, altın atomları arasında bulunan üç

katlı oyuk bölgelere adsorbe olur. SAM'in düzenlenmesinde yürütücü kuvvet S-Au bağı (~184 kJ/mol) ve alkil zincirleri arasındaki van der Waals etkileşimleridir (~6-8 kJ/mol her CH₂ için) [69-72].

Bununla birlikte, altın yüzeyler üzerine alkanetiyollerin kendiliğinden düzenlenmesinde; hazırlanan tek tabakalar 100°C'un üzerinde kararsızlaşması ve altının Si kristaline difüzyon eğilimi gibi iki önemli sınırlaması vardır [69-72].

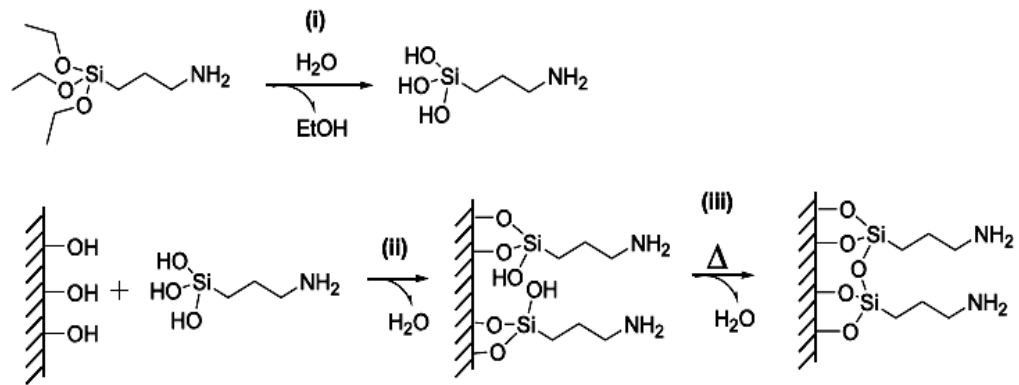
2.3.3. SiO₂ yüzeyleri üzerinde kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ile üretilen malzemelerde kararlılık çok önemlidir. Altın yüzeyler üzerine tiyollerin düzenlenmesindeki en büyük dezavantaj sıcaklığın artışıyla azalan kararlılıktır. Bu bakımdan, SiO₂ yüzeyler üzerine organosilan moleküllerinin düzenlenmesi ile oluşan SAM'ler kararlı nano yapıların üretiminde önemli bir yere sahiptir. Organosilanlar genellikle, tetrahedral bir yapıya sahip olan silisyum (Si) atomuna benzer fonksiyonel grupların (Alkoksi veya Klor) bağlanması ile oluşan yapılardır. Şekil 2.5'de cam yüzeyler üzerine trialkilsilanların kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi görülmektedir. Au-S etkileşimi çoğunlukla yük transferi ile gerçekleşirken SiO₂'de bu durum farklıdır. Bu organik tek tabakalar moleküler seviyede belli bir amaca göre fiziksel özelliklerinin ve yüzey kimyalarının değiştirilmesine olanak sağlayabilmektedirler.

SiO₂ yüzeyler üzerine tek tabaka oluşum mekanizmasında öncelikle silan molekülleri üzerindeki Si-X (X= Cl, OR ya da NR) grupların Si-OH gruplarına dönüştüğü düşünülür [73-75]. Daha sonra oksit yüzey (SiO₂) ile silanların Si-OH'ları arasında bir kondenzasyon reaksiyonunun meydana gelerek çapraz bağlı yüzey düzenlenmesinin gerçekleştiği söylenilebilir. SiO₂ yüzeyler üzerine kendiliğinden oluşan tek tabakaların

popüleritelerine rağmen su miktarı, sıcaklık ve substratdaki –OH gruplarının yoğunluğu gibi faktörler SAM'i olumsuz yönde etkiler [73]. Ancak, bu mekanizma tam olarak açık değildir.

Bu şekilde elde edilen tek tabakalardaki Si-O bağı (bağ kuvveti= 368 kJ/mol) Au-S bağından çok daha karardır ve kimyasal grupların düzenlenmesi kendiliğinden gerçekleşir [76]. Silikon oksit yüzeyler üzerine organik moleküllerden oluşturulan tek tabakalar mikroeletromekanik sistemler (MEMS) [77], mikroakışkanlar [78] ve biyoçip düzenlenmesi [79] gibi birçok teknolojide önemli bir yere sahiptir.



Şekil 2.5. SiO₂ yüzey üzerine trialkilsilanların kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi

Son yıllarda, sıcaklık, pH, manyetik alan ve ışık gibi herhangi bir dış uyarıya karşı özelliklerini değiştirerek cevap veren maddeler ile geliştirilen akıllı malzemeler üzerinde yoğunlukla çalışılan bir konudur. Bu tip akıllı malzemelerin hazırlanmasında kendiliğinden düzenlenme olgusu sıklıkla kullanılmaktadır. Yüzey özelliklerinin dışarıdan bir uyarı ile değiştirilmesi, sonuçta elde edilen bu akıllı yüzeylere inorganik partiküllerin, proteinlerin, hücrelerin, ilaç moleküllerinin yerleştirilmesine olanak sağlamaktadır. Bununla birlikte, elde edilen akıllı yüzeyler, yeni biyoanalitik yöntemlerin, biyoçiplerin, sensörlerin geliştirilmesinde büyük potansiyel oluşturmaktadır.

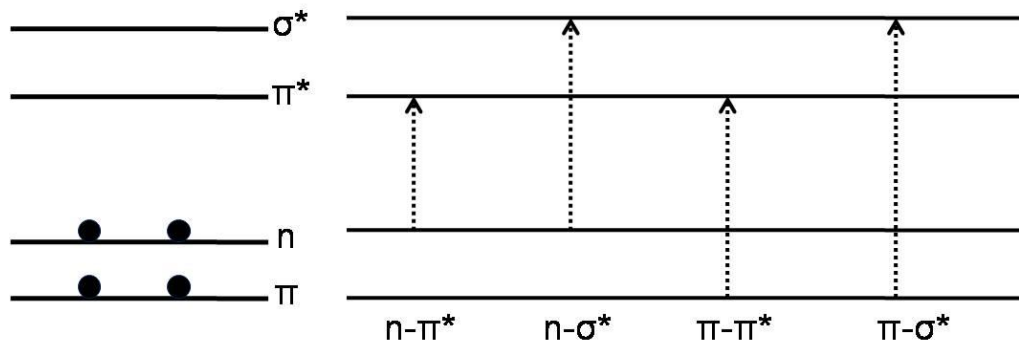
2.4. Işık Kontrollü Yüzey Tasarımı

2.4.1. Fotokimya

Fotokimya, ışığın meydana getirdiği kimyasal değişimleri inceleyen bir bilim dalıdır. Fotokimyasal bir olay başlıca üç basamakta gerçekleşmektedir;

- Elektronik olarak uyarılmış bir durum yaratan soğurucu hareket,
- Elektronik olarak uyarılmış halleri içeren birincil fotokimyasal işlem,
- Birincil işlemler sonucunda ortaya çıkan kimyasal türlerin ikincil ya da “karanlık” (termal) reaksiyonları.

Fotokimyasal bir işlem sırasında elektronik orbitallerdeki n , σ , σ^* , π ve π^* enerji düzeyleri arasındaki çeşitli geçişler gerçekleşmektedir. Organik moleküllerde karşılaşılan geçişler; π - π^* , n - π^* , n - σ^* yük-transfer ve Rydberg geçişleridir. π - π^* geçişi, etilen gibi çift bağı bileşikler ile konjugasyon bileşiklerinde görülmektedir. n - π^* geçişi, heteroatomlarla çift bağ yapmış kromofor moleküllerini içeren bileşiklerde görülmektedir. n - σ^* geçişi ise, alkil halojenürler ile karbon atomuna tek bağ ile bağlı heteroatomlar içeren bileşiklerde görülürler.



Sekil 2.6. Orbitallerdeki elektronik geçişlerin şematik gösterimi

Yaşamın içindeki, görme, fotosentez gibi çok sayıda olay karmaşık ışık-duyarlı sistemlerden oluşmaktadır. Bu sistemler temel iki kısımdan

oluşmaktadır. Birincisi, optik sinyalleri alarak fizikokimyasal sinyallere çeviren ışık-duyarlı bir bileşen, ikincisi fizikokimyasal sinyali algılayarak buna bir fonksiyon oluşturan kısımdır. Bu tür sistemlerde biyomoleküler bir matriks içerisinde kromofor olarak da adlandırılabilen fotokromik bir molekül bulunmaktadır. Soğurulan ışık kromofor içerisinde kimyasal bir transformasyona (örn. fotoizomerizasyon) neden olmaktadır. Bu transformasyon ile biyomolekül ya da biyomembranın konformasyonunun kontrol edilmesini sağlar. Bu biyolojik sistemler, biyomoleküler tanıyı kontrol edecek sentetik fotoanahtar sistemlerinin geliştirilmesine model teşkil etmektedirler [81]. Fotoanahtarlar sistemler; fotokontrollü enzimatik çalışmalarda, ışık ile kontrol edilen ilaç salım sistemlerinde, fotokontrollü ayırma/geri kazanım sistemleri gibi birçok biyoteknolojik uygulamada kullanılabilmektedirler [81].

Işık duyarlılık fotokromizm olarak da bilinmektedir. Fotokromizm, bir kimyasal türe ait iki farklı yapı arasında gerçekleşen tersinir bir geçiş olarak tanımlanır. Bu iki molekül arasındaki farklılıklar nedeniyle, her iki izomer, absorpsiyon davranışı, kırılma indisi ve dielektrik sabiti gibi özellikleri bakımından birbirlerinden farklılık gösterirler. Foto-uyarmaya bağlı olarak değişime uğrayan moleküller son yıllarda, optik hafıza, foto-optik anahtar gibi optoelektronik araçlar konusunda uygulanmaktadırlar. Fotokromik bir sistemin gerçek bir fotonik araçta kullanılabilmesi için; her iki izomerin termal olarak kararlı olması, hızlı cevap ve yüksek seçicilik özelliklerini göstermesi gereklidir.

2.4.2. Işık duyarlı molekül

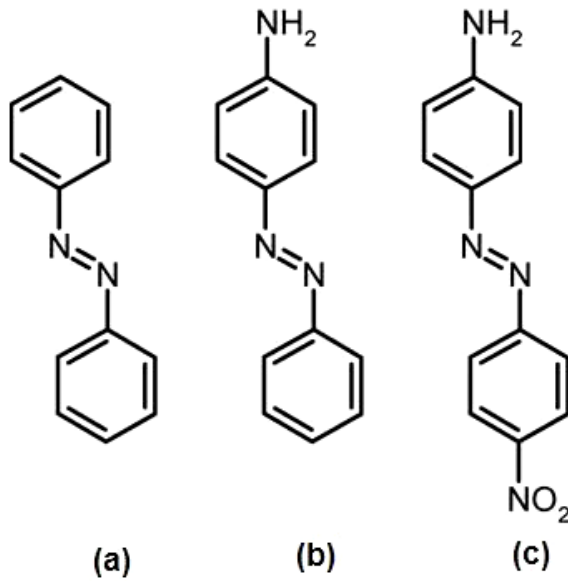
Işık ile kontrol edilebilen malzemelerin üretilmesinde bir çeşit ışık-duyarlı molekül olan azobenzen türevi kromoforlar kullanılmaktadır [82]. Azobenzen türevi kromoforlar, yapılarındaki iki fenil halkasını birbirine bağlayan $N=N$ bağı ile tanınırlar. Genişletilmiş bu aromatik yapı bu maddelere ışık-duyarlılığını sağlamaktadır. Azobenzen türevi kromoforlar

çoğunlukla azo moleküller olarak adlandırılmaktadır. Azo molekülü bir foton absorpladığında fotoizomerizasyon özelliği göstermektedir.

2.4.3. Azobenzen fotokimyası

Azo molekülleri taşıdıkları fonksiyonel gruplara ve bunlara bağlı gösterdikleri foto-fiziksel özelliklerine göre Şekil 2.7’de verildiği gibi üç grup altında toplanabilirler;

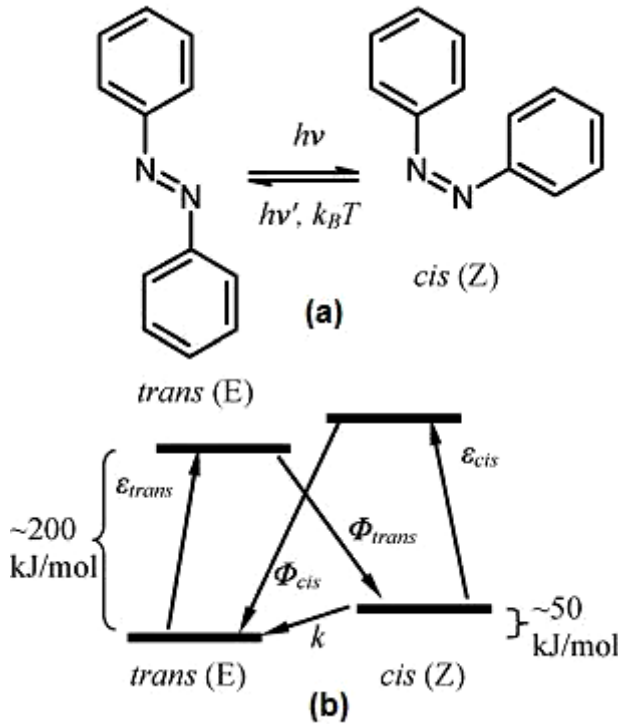
- i) Azobenzen tipi moleküller
- ii) Aminoazobenzen tipi moleküller,
- iii) Yalancı-stilbenler.



Şekil 2.7. Fonksiyonel gruplarına göre sınıflandırılan azobenzen molekülleri; (a) Azobenzen, (b) Aminoazobenzen ve (c) Yalancı stilben [83]

Bu azobenzen tipi moleküller birbirlerine benzerler, en temel ortak yönleri UV altında verdikleri tepkilerdir. Aminoazobenzen moleküllerinde elektron sağlayan grup olan $-NH_2$ grubu orto-, para-, veya meta- konumda bulunabilmektedirler ve en kuvvetli absorpsiyon özelliğini görünür-mavi

bölgede yaparlar. En son grup olan yalancı-stilbenler ise 4,4' pozisyonlarındaki elektron sağlayıcı ve elektron verici grupların sağladığı kuvvetli asimetrik elektron dağılımı ile karakterize edilirler. Yalancı-stilbenler görünür bölgede kuvvetli bir absorpsiyona sahiptir. Yalancı-stilbenler sahip oldukları asimetrik elektron dağılımından dolayı lineer olmayan optik özellikleri ve gösterdikleri foto-anahtar özellikleri ile birçok uygulama alanından kullanılmaktadırlar [84,85]. Şekil 2.8'de görüldüğü gibi, şüphesiz azobenzenlerin en ilginç özeliği, hızlı ve tam anlamıyla tersinir fotoizomerizasyon özelliği gösterebilmeleridir.



Şekil 2.8. Azobenzen molekülünün fotoizomerizasyonu sırasındaki, (a) konformasyonel değişimi, (b) Farklı konformasyonlar arasındaki enerji ve kuantum verimi farkı [86, 87]

Bir fotonun absorpsiyonu fenil halkalarının azot bağları etrafında serbestçe dönmesine sebep olmaktadır. Bu şekilde molekül *trans* halden *cis* hale geçmektedir. Fotoisomerizasyon en iyi bilinen fotoreaksiyon çeşididir. Moleküler boyutta, izomerizasyon konformasyonda ve boyutta ciddi değişikliklere sebep olmaktadır. *Trans* isomer termodinamik olarak

yaklaşık 50 kJ/mol daha kararlıdır [86, 87]. Uyarım basamağı için çıkış bariyer enerjisi 200 kJ/mol civarındadır [88]. Sonuç olarak, karanlıkta azobenzenler baskın olarak *trans*- konumda bulunurlar. *Trans* absorpsiyon bandında bir foton absorpsiyonu büyük miktarda *cis* hale dönüşüm ile sonuçlanır. *Cis*- absorpsiyon bandında bir foton tekrar *trans* hale geçmek için kullanılabilir. Uyarma olmaksızın *cis* haldeki azobenzenler ısı etkisiyle de daha kararlı oldukları *trans* hale geri döndürülebilmektedirler. Isı etkisiyle *trans* hale geri döndürme işleminde, dönüşüm süresi azobenzenlerin yapısındaki fonksiyonel grupların yapısına ve konumuna bağlıdır. Bu süre azobenzenlerde saat, aminoazobenzenlerde dakika veya yalancı-stilbenlerde saniye olarak değişmektedir. Bu termal izomerizasyon için enerji bariyeri 90 kJ/mol civarındadır [89, 90].

Bununla birlikte azobenzenlerin *cis*- halde kalma süreleri çok uzun değildir. Yapılan araştırmalar, daha kullanışlı malzemeler üretmek için molekülün her iki halde de yeterli sürede kalmalarını sağlamayı amaçlamaktadır. Örneğin, azo kromofor bağlı poliüretan ana zincirinde ömür 4 gündür (termal hız sabiti $k = 2.8 \times 10^{-6} \text{ s}^{-1}$, at 3°C) [91]. Hidrojen bağı yapan peptit segmentleri için ömür 40 güne ($k = 2.9 \times 10^{-7} \text{ s}^{-1}$) ulaşmıştır [92]. Bazı durumlarda *cis* hali bir yüzeye bağlanarak [93], halka benzeri moleküller sentezlenerek [94] veya *cis* halin kristalizasyonu sağlanarak *trans*- hale isomerizasyonu önlenerek *cis* hal korunmuş olur [95]. Bu çalışmalar, azoların isomerizasyonunun moleküler konfigürasyonda geniş bir değişim getirdiğini vurgulamaktadır. Bununla birlikte moleküler boyuttaki sınırlama ve kinetik işleyiş arasındaki ilişkide isomerizasyonun geometrik doğası önemlidir. Işınlama yapıldığında azo molekülleri fotokararlı hale ulaşacaklardır. Bu durumda *trans* ve *cis* durumlarının kararlı hal bileşimi *trans* hale geri dönen termal kararlılık sabiti ile fotoisomerizasyon arasındaki yarışa dayanmaktadır. Böylece her bir sisteme göre kararlı hal bileşimi tekdir ve her iki isomerizasyon işlemi için kuantum verimleri (Φ_{trans} and Φ_{cis}) ve termal kararlılık sabitine (k)

bağlıdır. Daha da ötesi, bileşim sıcaklık, dalga boyu, ışınlama şiddeti ve bulunduğu ortam (çözelti, polimer matriksi, tek tabaka vb.) bu sonucu etkilenir. Işınlama sonucu, bir azo bileşiğinin spekturumu (*cis-trans* moleküler değişimin oranı gibi) değişecektir. Bundan dolayı, bileşimin karalı hali ve isomerizasyon kinetikleri genellikle absorpsiyon spektroskopisi [96,97] ve NMR [98] ile başarılı şekilde izlenebilmektedir.

2.4.4. Moleküler hareketlilik ve fotoanahtar moleküller

Azobenzenlerin fotokimyasal isomerizasyonu moleküler boyutlarının geometrik bir değişimidir. Bu moleküler hareketlilik daha geniş ölçekte ve hatta düzenli hareketlilikte gerçekleşebilir. Uyarılmış tepkinin ölçüsü ve tipi sisteme bağlıdır. Bazı durumlarda moleküler hareketlilik makroskopik bir malzeme özelliğinin “anahtar” özelliği göstermesine izin verir. Birçok sistemde kullanılabilen azobenzen parçaları çok baskın ve çok değişkendir. Örneğin polimerik sistemlerde dopand olarak, supramoleküler sistemlerin düzenlenmesinde, sıvı kristallerinde, kristalin veya amorf polimerlerine kovalent bağlanarak kullanmalarında azo bileşikler kullanılabilirler.

Temelde, bir azobenzen kromoforun izomerizasyonu foto-uyarılmış bir hareketliliktir. İzomerizasyon azot bağında dönme veya tersine dönme olarak gözlenir. Bu hareket azot bağı etrafındaki fenil halkalarının serbest olarak hareket edebilmesinin bir ürünüdür. Halkalar azot bağı etrafında 90° dönebilmektedirler ($-C-N=N-C-$) ve sonuç *cis* konformasyon halidir [99, 100]. *Trans* halden *cis* hale dönüşte uç grupların arasındaki mesafe azalır (para- konumundakilerde), *trans* halde 0.99 nm den *cis* halde 0.55 nm ye değişmektedir [101-103]. Geometrideki bu değişim, moleküler dipoldeki bir değişimin sonucudur. Azobenzen molekülleri için dipol moment *trans* halde iken sıfırdan *cis* hale geçişte 3.1 D ye değişir [95]. Serbest hacim gereksinimi *cis* halde *trans* halden daha fazladır [104], yaklaşık olarak azo bağlarından tersinir yürüyen isomerizasyon için bu

hacmin 0.12 nm^3 , azo bağları etrafında dönüş için 0.28 nm^3 olduğu tahmin edilmektedir [99]. Azo moleküllerinin bu moleküler hareketliliği moleküler boyuttaki fotoanahtar makinelerde sürücü olarak kullanılabilir.

Son yıllarda, azo bileşikleri kullanılarak biyolojik sistemler için sentetik akıllı malzemelerin üretilmesi üzerinde çalışmalara başlanmıştır [105]. Bu konuda yapılan ilk çalışmalardan biri azobenzen moleküllerinin bir model membran içerisine gömülmesidir [106]. Bu sistemde, izomerizasyon sonucu lamel bozulur ve tekrar düzenlenir bu şekilde membrana bağlı proteinlerin enzimatik aktivitesi değişir. Bir azobenzen uç ve bir histidin ile bir siklodekstinin katalitik aktifliği ışık ile kontrol edilebilir. Çünkü azo uçlar *trans* haldeyken siklodekstin cepler içine bağlanabilir oysa *cis* haldeyken katalitik bölgeler serbest haldedir [107].

Polipeptidlerin foto-düzenlenmesi azobenzen moleküllerinin kullanıldığı yeni bir araştırma konusunu oluşturmaktadır [108]. Azo modifiye poli(L-alanin) [109], poli(L- glutamik asit) [110, 111] ve poli(L-lizin) [112] yapıları hazırlanmıştır. Bu sistemlere bağlı olarak, foto isomerizasyon fiziksel değişim durumu oluşturmaz [113] veya düzenlenmiş kiral helixden düzenlenmemiş kiral olmayan zincire uzanan önemli konformasyonel değişimlere neden olabilir [114-116]. Bu değişimler, α -heliks ve hatta tersinir α -heliks yapıdan β -yaprak yapısına dönüşme şeklinde gerçekleşebilir [117].

Nanobiyoteknoloji, yapay amino asitler ile doğal amino asitler kullanılarak son zamanlarda gelişmektedir. Bu şekilde yeni ve doğal olmayan protein dizileri tasarlanabilir. Kiral azobenzen amino asitler bir protein dizisi içerisinde sentezlenmiştir [118]. Yapay foto-aktif maddelerin sistemlere girişi ile biyolojik işlemlerin foto-kontrolünün olabildiğini sağlar. Özellikle organizmalardaki gen dizilimlerinde ışık-kontrolü ile seçici bağlanmalar oluşabilmektedir. Asanuma ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, tek iplik DNA dizisi içerisine yerleştirilen azobenzen birimleri

ile DNA hibridizasyonunun ışık ile kontrolü çözelti ortamında sağlanmıştır. Bu çalışma foto-kontrollü gen aktarımına izin verebilen önemli bir tasarımdır [119,120].

3. YÜZEY KARAKTERİZASYON YÖNTEMLERİ

Nanoteknoloji’de üretilen materyallerde, yüzey üzerine bağlanma noktalarının, yüzeyin kimyasal bileşiminin ve yüzeylerin kimyasal reaktifliği gibi kimyasal ve fiziksel yüzey özelliklerinin bilinmesi oldukça önemlidir. Fiziksel ve kimyasal değişimler maddelerin birbiri ile temasının bir sonucudur buna bağlı olarak bu temas yüzeylerinin ayrıntılı kimyasal ve fiziksel özelliklerinin bilinmesi oldukça önemi taşımaktadır [43].

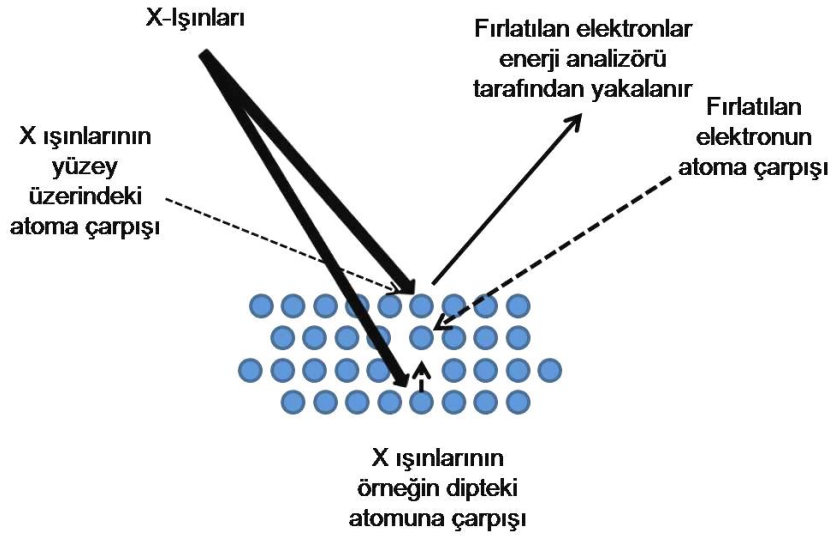
Yüzeylerin kimyasal karakterizasyonunda; Auger Elektron Spektroskopisi (AES), X-ışınlar Foto Elektron Spektroskopisini (XPS), ikincil İyonlar Kütle Spektroskopisi (SIMS) gibi çok gelişmiş spektroskopik teknikler kullanılmaktadır. AES ve SIMS teknikleri kullanılarak yüzeyin belli bir bölgesine ait kimyasal bileşimi belirlenebilirken, yüzey üzerindeki elementlerin bağlanma durumları ve reaktiflikleri hakkında bilgi elde edilemez. Dolaylı metotlar genellikle nanoteknolojik uygulamalarda bir yüzeyin kimyasal özelliklerinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

Nanoteknolojik malzemelere ait yüzey morfolojisi gibi fiziksel özelliklerinin tespiti ile malzemeleri katalitik aktiviteden biyolojik uyumluluğa kadar pek çok konudaki davranışlarının anlaşılabilmesini mümkün kılmaktadır. Yüzeylerin fiziksel özelliklerinin belirlenebilmesinde kullanılan en eski yöntemlerden biri Elektron Mikroskopisi’dir. Mikroskopi çalışmalarında daha geniş alanları inceleyebilmek için taramalı sistemler kullanılmaya başlanmıştır. Taramalı Elektron Mikroskopisi (SEM) ve Taramalı Auger Mikroskopisi (SAM) tekniklerinde malzeme içinden geçen elektronlarla maddenin etkileşmesi sonucu yüzey yapısı incelenebilmektedir. Yüzeyin karakterize edilmesi için tarama işleminde elektronları kullanmaktansa, bu amaçla çok ince uçların (sondaların) kullanılması oldukça yeni bir düşüncedir. Bu tip mikroskoplara merceksiz mikroskop da denilmektedir. Yüksek büyütme gücüne (atomik boyutlarda) ve ayrılcılığa sahip olmaları

sebebiyle Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) yüzey morfolojisinin belirlenmesinde kullanılmaktadır.

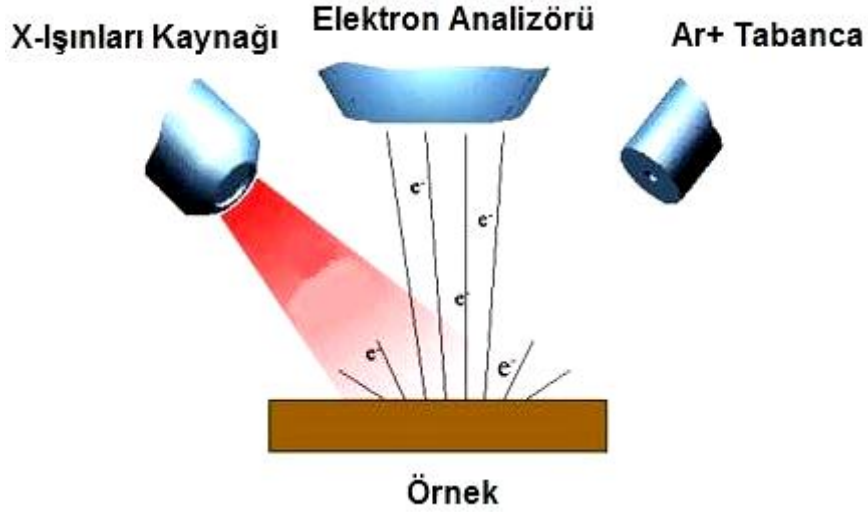
3.1. X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisi (XPS)

Atomların iç kabuk elektronları, orbitallerinde karakteristik bağlanma enerjileri sayesinde tutunmaktadırlar. Bu bağlanma enerjileri; orbital tipine, atom tipine (çekirdek yükü ve boyutu) ve komşu atomların doğasına bağlıdır. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile yapılan yüzey kimyası analizleri, örnek yüzeylerden fırlatılan elektronların bağlanma enerjilerinin ölçülmesi temeline dayanmaktadır. Yüzeylerden elektronların fırlatılmasında fotoiyonlaşma olayına dayanmaktadır. Bu işlem Şekil 2.9’da şematik olarak gösterilmektedir.



Şekil 3.1. XPS tekniğinin şematik gösterimi

Düşük enerjili X-ışınları ile yüzey bombardımanında fotonlar yaklaşık $1\mu\text{m}$ derinliğe kadar yüzey içerisine geçer ve bombardıman sonucu oluşan iyonlaşma ile Eş.3.1’de gösterildiği gibi yüzeyden bir elektron fırlatılır (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. X-ışınları Fotoelektron Spektroskopisinin (XPS) şematik gösterimi

Fırlatılan elektronun kinetik enerjisi, örneğe gönderilen X-ışınlarının enerjisine bağlıdır. Örnek maddesinin absorbladığı X-ışınlarının enerjisinin bir kısmı elektronun bağlanma enerjisini (E_b) yenmek için kullanılırken, geri kalanı fırlatılan elektronun kinetik enerjisi (E_k) olarak ortaya çıkar.

$$h\nu = E_b + E_k \quad (3.2)$$

Bağlanma enerjisi, her bir element için belli bir değere sahiptir. Ayrıca, bağlanma enerjisinin değeri elementin yükseltgenme basamağına ve elementin bulunduğu kimyasal çevreye bağlıdır. Böylece bağlanma enerjilerinin ölçümü ile maddede bulunan belli bir element hakkında oldukça ayrıntılı bilgi edinmek mümkündür. Atomun bulunduğu bileşikte elektron yoğunluğunu etkileyen faktörlerin neden olduğu farklılıklar, elektronun ölçülen kinetik enerjisini değiştirir.

$$E_b = h\nu - E_k \quad (3.3)$$

aynı elementin aynı tür elektronu için gözlenen değişiklikler, elektronun farklı çevrelerde farklı bağlanma enerjilerine sahip olmalarından kaynaklanır. Bağlanma enerjilerinde ölçülen bu farklılıklar “kimyasal kayma” olarak adlandırılır. Her bir elementin belli bir orbitalden fırlatılan elektronlar için ölçülen E_b değerleri literatürdeki kaynaklardan bulunabilir [121-123]. XPS yöntemi ile nitel analizde, ölçülen bağlanma enerjisi değerleri ve kimyasal kayma değerleri kullanılır. Bu yöntem ile H ve He dışındaki tüm elementlerin nitel analizi yapılabilir. XPS yöntemi ile birçok katalizörün, metalin, polimerin, yarıiletkenin ve elektrodun yüzeyleri rahatlıkla incelenebilir. Yine bu yöntemle, örnekteki belli bir elementin hangi yükseltgenme basamağında olduğu da ortaya çıkarılabilir ayrıca bu örneklerle ilgili nicel analizler yapılabilir [121-123].

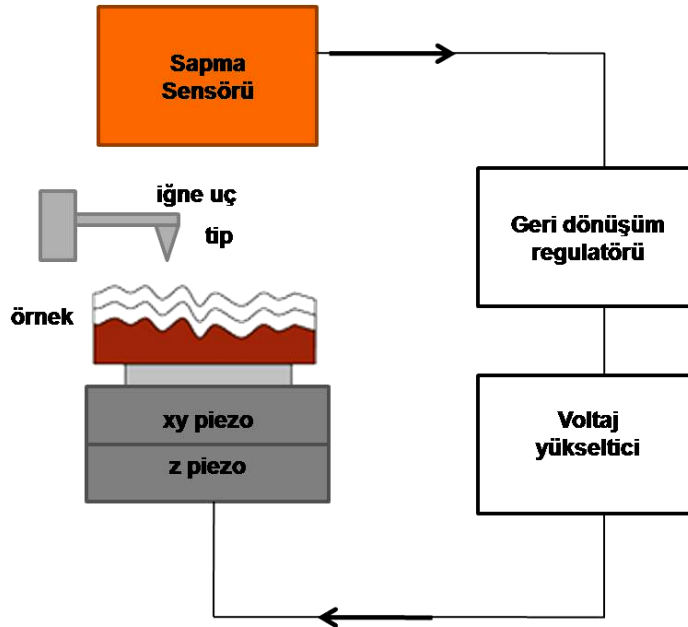
3.2. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM)

Atomik Kuvvet Mikroskobu, 1985’de Bining, Calvin Quate ve Cristopher Gerber tarafından icat edilmiştir. Optik ve elektron mikroskoplarına kıyasla AFM’ de örnek yüzeyin topografik görüntüsü çok hassas çözünürlükte elde edilebilir. AFM, numune yüzeyini angström mertebesinde 100 mikrona kadar ölçebilen bir metottur. Çok duyarlı bir iğnenin yüzeyi taramasıyla atomik seviyedeki kuvvetler de nanonewton hassasiyetinde ölçülebilir [124,125]. AFM, elektronik, telekominikasyon, biyoloji, kimya, otomotiv, uzay-havacılık ve enerji endüstrisi dallarında yüzey işleme ve malzeme problemlerinin çözülmesinde kullanılmaktadır. Hızla gelişen bir teknoloji için vazgeçilmez bir araçtır [124, 125].

AFM’nin çalışma prensibi Şekil 3.3’de gösterilmiştir. Birkaç mikrometre uzunluğundaki keskin bir uç iğne (cantilever) denilen bir yayın ucuna tutturulmuştur.

Burada uç ve numune arasındaki etkileşim iğnenin sapmasına sebep olmaktadır. Tarama sırasında uçta oluşan bu kuvvet, ucun aşağı ve

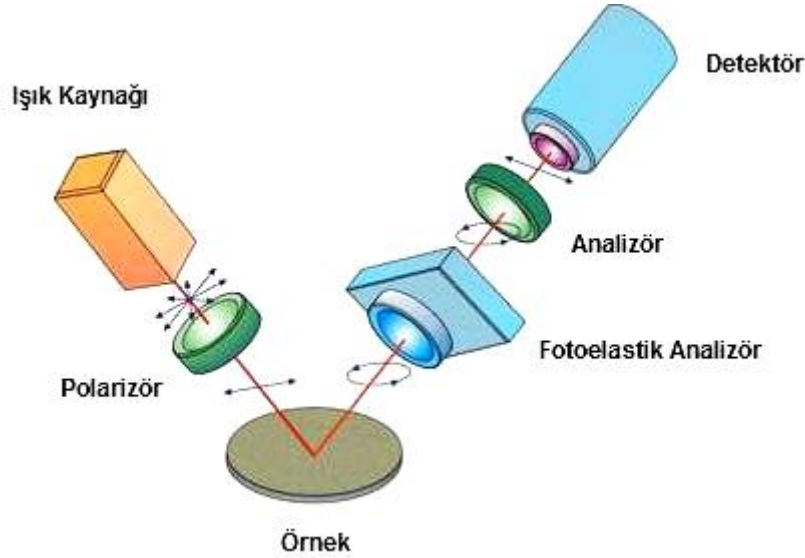
yukarı hareketi ile sabit tutularak iğnedeki sapmalar ölçülür ve topografik görüntü ortaya çıkar [124,125].



Şekil 3.3. Bir atomik kuvvet mikroskobunun genel şeması [124]

3.3. Elipsometre

Elipsometre, film parametreleri, film kalınlığı, bileşimi, optik özellikleri ve yüzey yapısının incelebildiği bir yöntemdir. Ayrıca yarı iletken karakterizasyonunda ve özellikle ara yüzeylerin büyütülmesi ile bu yüzeylerin kontrolünde yaygın biçimde kullanılmaya başlanmıştır. Elipsometre yöntemi bir elektromanyetik dalganın bir ara yüzeyden yansması durumunda oluşan kutuplanma halindeki değişiminin bir ölçümüdür (Şekil 3.4). Optik özelliklerin tayini genelde iki veya üç fazlı modellere dayalı olarak gerçekleştirilir. Temelde iki fazlı olsa bile yüzey kusurları, bozunmalar ve kirlenmelerden dolayı iki fazlı model geçerliliğini kaybetmektedir. İnce filmlerde hava-organik tabaka-alt tabaka olmak üzere üç fazlı model kullanılmaktadır [126, 127].



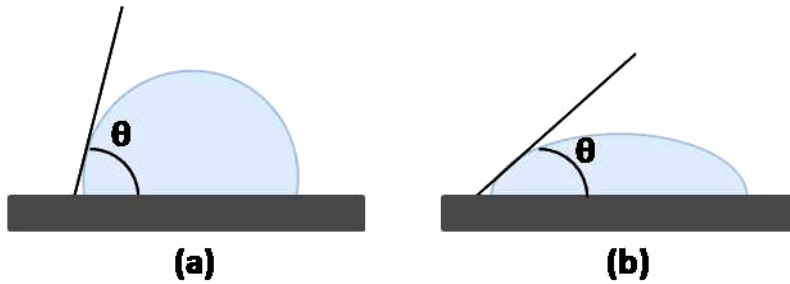
Şekil 3.4. Elipsometrinin genel şeması

Elipsometre yöntemi gelen ışığın malzeme içerisine etki ettiği bölge boyunca değişen dielektrik fonksiyonu ile tanımlanır. Bu nedenle dielektrik fonksiyonu genellikle Pseudo veya etkin dielektrik fonksiyonu olarak adlandırılır. Eğer malzeme yapısı çok karmaşık değilse bu etkin dielektrik fonksiyonu ya da kalınlığı tayin edilir. Yapının çok karmaşık olduğu, dolayısı ile alt tabaka ve film özelliklerinin birbirinden ayırt edilemediği durumlarda bile etkin dielektrik fonksiyonunda yüzey tabakalarının varlığının etkisi genellikle çok kolay gözlenebilir ve sonuçta bu tabakanın özellikleri belirlenebilir.

Elipsometrik yöntem yardımıyla birkaç atomik tabaka kalınlığındaki yarı iletken filmlerin bile gerçek dielektrik fonksiyonları, her bir tabakanın kalınlığı, her bir tabakadaki kristalinite derecesi ve yüzeyin mikro yapıdaki pürüzlü tabakasının kalınlığı hakkında bilgi elde edilebilmektedir [126-128].

3.4. Değme Açısı Ölçümleri

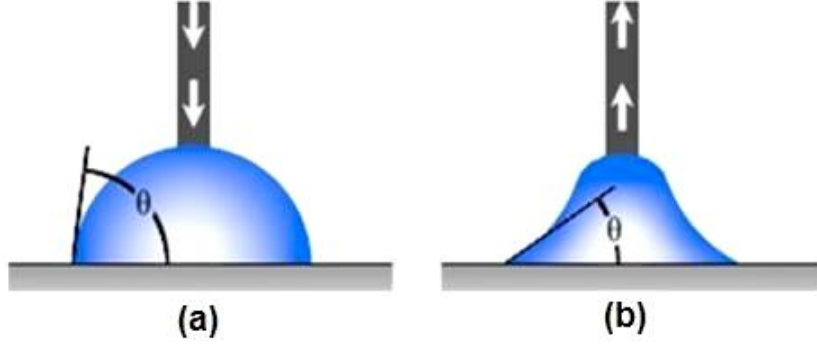
Yüzeylerdeki kimyasal modifikasyon gibi değişikliklerin karakterize edilebildiği en basit metotlardan biri değme açısı ölçümüdür. Değme açısı, bir sıvı ile bir katının ilk tabakası arasındaki kovalent olmayan kuvvetlerinin bir ölçüsüdür. Bu fazlar arasındaki etkileşimlerin güçlü olması durumunda sıvı damlası katı yüzeyi üzerinde yayılır ve onu ıslatır (Şekil 3.5). Ara yüzeylerde gerçekleşen fizikokimyasal işlemlerde serbest yüzey enerjilerinin çok büyük bir rolü vardır. Ara yüzeylerde gerçekleşen ve moleküller tarafından kontrol edilen bu işlemler hazırlanan yüzeylerin yüzey özellikleri ıslanabilme, yapışma, biyolojik uyumu ve baskı gibi birçok uygulama alanında önem taşır.



Şekil 3.5. Bir sıvı damlasının yüzey üzerinde (a) tutunması, (b) yayılmasının şematik gösterimi

Değme açısı ölçümlerinde Şekil 3.6'da gösterildiği gibi yüzey üzerindeki sıvı damlasının büyürken alınan ileri yönlü değme açısı (θ_{ileri}) ile sıvı yüzeyden geri çekilirken küçülen damladan alınan geri yönlü değme açısı (θ_{geri}) farkı histerizi olarak tanımlanır. Yüzeylerin formasyonu ve pürüzlülüğü hakkında bilgi veren histerizi Eş.3.4 kullanılarak hesaplanabilmektedir [129-132].

$$H = \theta_{\text{ileri}} - \theta_{\text{geri}} \quad (3.4)$$



Şekil 3.6. Yüzeylerin değme açısı ölçümlerinin şematik gösterimi (a) İleri yönlü değme açısı, θ_{ileri} ve (b) Geri yönlü değme açısı, θ_{geri}

Yüzey özelliklerinin oluşumunda yüzeylerin serbest enerjisinin rolü büyüktür. Değme açısı ölçümleri ile düşük enerjili yüzeylerin yüzey enerjileri dolaylı yollarla hesaplanabilmektedir.

Yüzey gerilim verilerini kullanarak ara yüzey geriliminin hesaplanması ilk kez Fowkes tarafından yapılmıştır. Fowkes fazlar arasında yalnızca aynı tür etkileşimler olduğu varsayarak katı ve sıvı arasındaki etkileşimleri açıklamıştır. Örneğin, polar olmayan yani apolar maddeler çevredeki ikinci fazın yalnızca apolar kısmı ile etkileşirler.

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2\sqrt{\gamma_1^D \gamma_2^D} \quad (3.5)$$

Etkileşimlerin apolar karakterini gösteren dispersiyon kuvvetleri D (ve ya LW Lifshitz- van der Waals) ile gösterilmiştir. Burada γ_1 sıvı fazı, γ_2 kazi fazı, γ_{12} ise katı-sıvı ara yüzey gerilimlerini belirtmektedir.

Dispersiyon kuvvetleri tüm atom ve moleküllerde bulunurken, polar kuvvetler yalnızca belirli moleküllerde bulunur. Polar kuvvetler, moleküldeki farklı atomların etrafında oluşan elektronegatiflik farkıyla oluşurlar. Bu modele göre, yüzey gerilimi apolar (γ^D) ve polar (γ^P) kısımların toplamından oluşmaktadır.

$$\gamma = \gamma^D + \gamma^P \quad (3.6)$$

Polar kısımları olan iki faz arasındaki ara yüzey gerilimi için Eş. 3.5'in genişletilmesiyle Eş. 3.7 elde edilmiştir.

$$\gamma_{12} = \gamma_1 + \gamma_2 - 2(\sqrt{\gamma_1^D \gamma_2^D} + \sqrt{\gamma_1^P \gamma_2^P}) \quad (3.7)$$

Oss ve Good' un yönteminde iki faz arasındaki yüzey gerilimi, yüzey gerilimi bileşenlerinin geometrik ortalaması baz alınarak hesaplanır. Polar kısmın hesaplanmasında ise Lewis' in asit-baz modelinden yararlanılır.

Polar kısmın asidik (γ^+) ve bazik (γ^-) kısımlara ayrılmasıyla aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$\gamma_{ks} = \gamma_k + \gamma_s - 2(\sqrt{\gamma_k^D \gamma_s^D} + \sqrt{\gamma_k^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_k^- \gamma_s^+}) \quad (3.8)$$

Bu yöntemlerle, yüzey gerilimleri, apolar ve polar bileşenleri bilinen sıvılarla, yüzey arasındaki ara yüzey gerilimlerinin hesaplanması mümkündür. Buna ek olarak katıların yüzey enerjileri de hesaplanabilir. Bunun içinde katı yüzeyi ile temas halinde olan sıvıların değme açılarının bilinmesi gerekmektedir. Young ve arkadaşları ara yüzey gerilimi ile üç fazın birbirine değdiği noktalar arasındaki ilişkiyi belirlemiştir.

$$\gamma_k = \gamma_{ks} + \gamma_s \cos \theta \quad (3.9)$$

Burada k ve s, katı ve sıvı fazları γ_k ve γ_s sembolleri iki fazın yüzey gerilim bileşenlerini ; γ_{ks} iki faz arasındaki ara yüzey gerilimini ve θ sıvının yüzeyle yaptığı değme açısını göstermek üzere aşağıdaki şekilde formüle edilmiştir [131, 132].

Katılar için yüzey enerjisi farklı metotlar kullanılarak hesaplanabilmektedir. Bu metot katılar için yüzey enerjilerinin hesaplanmasında yoğun olarak kullanılmaktadır.

3.4.1. Van Oss & Good'a göre asit-baz yöntemi

Oss ve Good 'da yüzey enerjisinin polar ve dispers kısımlarını ayırmıştır. Ancak, diğerlerinin tersine polar etkileşimleri Lewis'in asit-baz modeli yardımıyla açıklamışlardır. Bu modele göre; katının yüzey enerjisinin polar kısmı ve sıvı damlasının etrafı; Lewis asidi ve bazında olduğu gibi elektron alıcı ve verici kısımlara bölünürler. Farklı yüklerin çekimine bağlı olarak katı ve sıvının polar bileşenlerindeki kısmi kutuplar arasında etkileşmeler oluşur.

Fowkes'un kullandığı yüzey gerilimi eşitliği düzenlendiğinde:

$$\gamma_{sl} = \gamma_k + \gamma_s - 2\left(\sqrt{\gamma_k^D \gamma_s^D} + \sqrt{\gamma_k^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_k^- \gamma_s^+}\right) \quad (3.10)$$

elde edilir. Katının yüzey enerjisinin 3 bileşeninin değme açısı verileri kullanılarak hesaplanabilmesi için bu eşitlik Young eşitliği ile birleştirildiğinde:

$$\sigma_s = \gamma_{sl} + \sigma_l \cos \theta \quad (3.11)$$

$$(1 + \cos \theta) \gamma_s = 2\left(\sqrt{\gamma_k^D \gamma_s^D} + \sqrt{\gamma_k^+ \gamma_s^-} + \sqrt{\gamma_k^- \gamma_s^+}\right) \quad (3.12)$$

elde edilir. Bu eşitliğin çözülmesi için en az 3 sıvı ile değme açısı ölçümü yapılması gerekmektedir ve bunlardan en az ikisinin asit ve baz kısımlarının değerleri sıfırdan büyük olmalıdır. Dahası, en az bir sıvının bazik ve polar değerleri birbirine eşit olmalıdır. Bu amaçla da genellikle Lewis skalasına göre nötral noktada bulunan su kullanılır [129-132].

Van Oss ve arkadaşları katı ve sıvı bileşenlerin yüzey serbest enerjilerinin hesaplanmasında kullanılan metotta, önce bir apolar sıvı ile ölçülen değme açısının kullanılmasıyla katının γ_K^{LW} yüzey enerji bileşeni hesaplanır. Daha sonra diğer iki polar sıvı ile ölçülen değme açılarının kullanılmasıyla da katının diğer yüzey enerji bileşenleri hesaplanır. Apolar

sıvı için $\gamma_s^+ = \gamma_s^- = 0$ ve $\gamma_s = \gamma_s^{LW}$ olduğundan Eş. 3.13 aşağıdaki biçimde yazılır.

$$\gamma_s(1 + \cos\theta) = 2\sqrt{\gamma_K^{LW} \gamma_s^{LW}} \quad (3.13)$$

Buradan γ_K^{LW} belirlenir ve daha sonraki eşitliklerde kullanılır. Daha sonra Eş. 3.12'nin su ve diğer bir sıvı ile ölçülen değme açıları için iki defa yazılmasıyla γ_K^- ve γ_K^+ yüzey enerji bileşenleri belirlenir. γ_K^- ve γ_K^+ değerleri Eş. 3.14'de kullanılarak Lewis asit-baz bileşeni γ_K^{AB} hesaplanır.

$$\gamma_K^{AB} = 2\sqrt{\gamma_K^+ \gamma_K^-} \quad (3.14)$$

Katıların toplam yüzey enerjisi γ_K^{TOP}

$$\gamma_K^{TOP} = \gamma_K^{LW} + \gamma_K^{AB} \quad (3.15)$$

eşitliği ile belirlenir. Elde edilen γ_K^{LW} , γ_K^- , γ_K^+ , γ_K^{AB} ve γ_K^{TOP} değerleri ortalama olarak verilir [129-132].

3.5. Floresans Mikroskobu

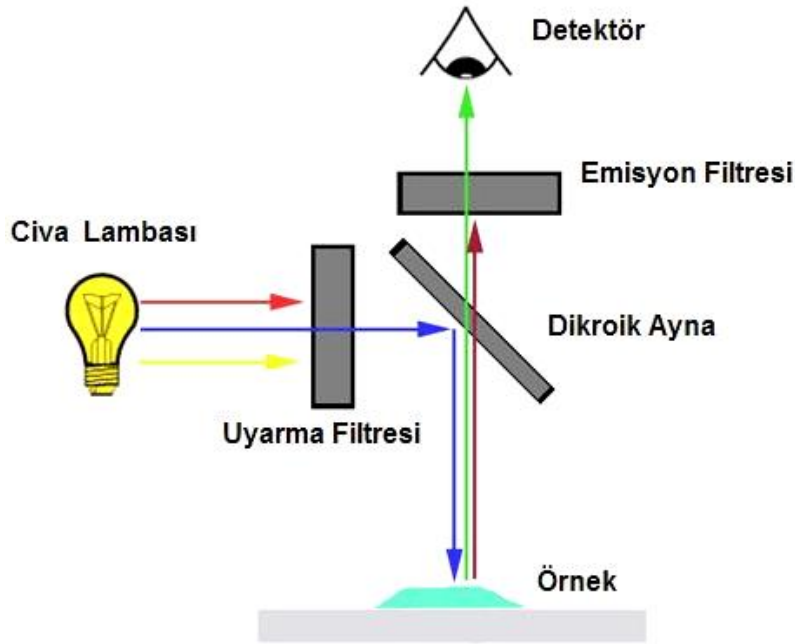
Floresans özelliği gösteren maddeler mikroskopide spesifik biyolojik problemlerin hazırlanması işlemlerinde etiketleyici olarak kullanılabilirler. Klorofil gibi bazı biyolojik maddeler doğal olarak floresans özelliğine sahiptirler. Fakat birçok biyolojik molekül veya yapı kendilerinden floresans özelliğe sahip değildirler. Bu nedenle, biyolojik moleküller floresans özelliği gösteren ve florokrom olarak adlandırılan moleküller ile modifiye edilerek çeşitli analizler için bu moleküllerin spesifik problemler hazırlanabilmektedir. Mikroskopik floresans ölçümleri biyokimya, ilaç ve çevre kirliliği analizleri gibi çok geniş uygulama alanlarında kullanılmaktadır [133,134].

1911 yılında Reichert tarafından Floresans Mikroskobu'nun geliştirilmesi ile floresan etiketli materyallerin ve bu yöntemle hazırlanan çeşitli biyoteknolojik malzemelerin incelenmesinde büyük ilerlemeler sağlanmıştır [133,134]. Florokrom maddeler belli dalga boyunda ışık ile uyarıldıklarında belli renklerde ışık yayarlar. Bu maddelerin yaydıkları belli renkteki ışık uygun filtreler kullanılarak Floresans Mikroskobu kullanılarak izlenebilmektedir. 3.7'de tipik bir Floresans Mikroskobunun şematik gösterimi verilmiştir. Şekil Floresans Mikroskobunda yayılan ışının şiddeti gelen ışının şiddetine bağlı olduğundan ışık kaynağının kuvveti önemlidir. En çok kullanılan ışık kaynakları; cıva ark lambası veya ksenon ark lambasıdır. Ksenon lamba değişik dalga boylarında çok fazla değişmeyen bir yayılım gösterirken, cıva lamba belirli dalga boylarında yüksek şiddette bandlar halinde yayılım yapmaktadır. Ksenon lamba genellikle farklı dalga boylarında çalışıldığında tercih edilir. Cıva lamba ile daha hassas analizlerin yapılması mümkündür. Bu nedenle özellikle biyoteknolojik malzemelere ait çalışmalarda cıva lambası tercih edilmektedir.

Işık kaynağında çıkan ışık öncelikle uyarılma filtresinden geçer. Mikroskopta filtre seçimi florokrom maddeye bağlı olarak özel yapılır. Uygun filtreden geçen ışık dikroik aynaya düşer. Dikroik ayna kısa dalga boylu ışığın yansıtılması, uzun dalga boylu ışığın ise geçişini sağlamak için kullanılır. Işık kaynağının önündeki filtre objeye ulaşacak dalga boyunu seçerken, objektiften sonraki filtre ise kısa dalga boyunun göze ulaşmasını önlemektedir [135]. Bu şekilde dedektöre düşen ışık sayesinde malzemeye ait sinyal izlenmiş olmaktadır.

Floresans Mikroskobu, DNA/protein çip çalışmalarında, moleküler düzeyde hücre ve doku içeriğinin belirlenmesinde, ışık mikroskopik boyama yöntemleriyle ayırt edilemeyen hücreler ve hücre içi/dışı elemanların gösterilmesinde ve bu maddelerin hücre/dokulardaki

yoğunluğunun belirlenmesi gibi biyoteknolojik çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır.



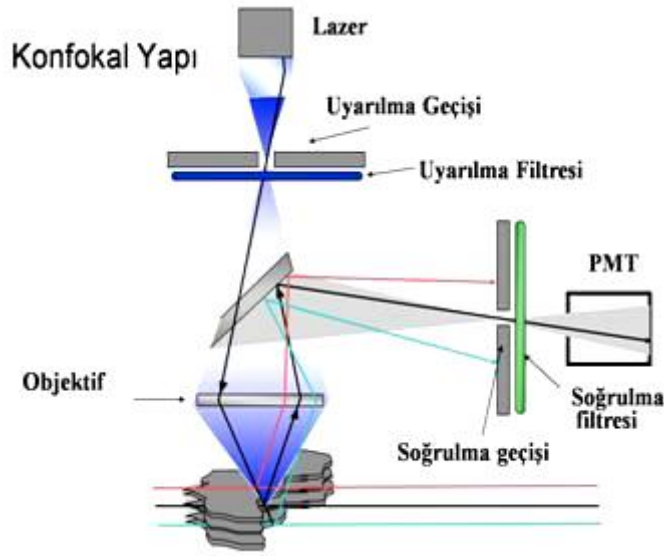
Şekil 3.7. Floresans Mikroskobu'nun şematik gösterimi

3.6. Konfokal Mikroskobu

Konfokal prensibi ilk olarak Marvin Minsky (1957) tarafından keşfedilmiştir [136]. Fakat ışık kaynaklarının yetersizliği, mikroskoptan elde edilen bilgilerin bilgisayarlarda çok fazla yer kaplaması nedeniyle çok yoğun olarak kullanılmamıştır. Fizikçi Brakenhoff (1979) tarafından mikroskobun biraz daha geliştirilmesi ile ilk kez üç boyutlu olarak nöroblastomdaki kromatin görüntülenmiştir [137].

Konfokal Mikroskobunun avantajı basit Floresans Mikroskobuna kıyasla daha yüksek çözünürlüklü ve derinlikli görüntülerin alınabilmesidir. Konfokal Mikroskobunun çalışma prensibi Şekil 3.8'de şematik olarak verilmiştir. Konfokal kelime anlamı olarak aynı odağa sahip demektir.

Konfokal prensipte, lazer ışını örnek üzerine düşürülür. Odak planındaki örnekten emisyon yayılır. Emisyon ışını dikronik aynadan yansır. Dikronik ayna Floresans Mikroskopunda olduğu gibi sadece floresans dalga boyunu geçirir. Dikronik aynadan geçen ışın soğrulma geçişinden geçer ve dedektör'e ulaşır.



Şekil 3.8. Konfokal Mikroskopunun şematik gösterimi

Konfokal Mikroskopunda “Fotoçoğaltıcı Tüp (Photo Multiplier, PMT)” ve “Foto Diyod (Avalanche Photo Diode, APD)” olmak üzere iki çeşit dedektör kullanılır. PMT dedektörleri, çok kısa zamanda çok düşük sinyalleri bile ölçülmesine olanak sağlarken, APD dedektörleri ise transistörlü bir yarıiletken cihazdır. Dedektöre ulaşan ışınlar sayılarak voltaj sinyali olarak kaydedilir. Görme alanı piksellere ayrılır ve her piksel sırasıyla lazer ile taranır. Bu özelliğinden dolayı Konfokal Mikroskobu ile daha net ve üç boyutlu görüntü alınabilmektedir [136, 137].

Konfokal Mikroskobu, canlı hücre görüntülemeye, GFP (Yeşil floresans protein) kullanarak hücre ve doku içi proteinleri görüntülemeye işaretlenebilen protein, gen gibi yapıları ve onların hareket ve pozisyonlarını görüntülemeye kullanılmaktadır. Bununla birlikte etiketli

DNA iplikçiklerinin hibridizasyon yüzdesinin saptamasına dayanan çip çalışmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır [137,138].

4. HESAPLAMALI TEORİK KİMYA

Teorik Kimya, kimyasal yapıları, bunların değişimlerini temel fizik kanunlarını kullanarak matematiksel olarak açıklamaya çalışır. Son yıllarda yapılan teorik hesaplamalar sadece kararlı molekülleri değil, kısa-ömürlü, kararsız ara ürünlerin yanında yüzeylerin atomik yapılarının belirlenmesi ile optik, elektronik ve titreşim özelliklerin aydınlatılmasında deneysel çalışmalar ile beraber kullanılmaya başlanmıştır [139] . Deneysel çalışmaları desteklemek ve/veya öncesinde tahminde bulunmak amacıyla yapılan teorik hesaplamalarda farklı yöntemler kullanılabilmektedir [140-142].

4.1. Moleküler Mekanik Yöntemler (MM)

Bu yöntem bir kimyasal sistemde atomlar arasındaki etkileşimleri klasik fizik kuralları ile tanımlamaktadır. MM yöntemlerde atomlar birer küre, bağlar ise birer yay gibi düşünülerek yapılan enerji hesaplaması sonucu atomların birbirlerine göre konumlarından kaynaklanan konformasyon enerjisi elde edilir. Hesaplanan enerjinin mutlak değeri önemli değildir. Ancak molekülün farklı konformasyonlarına karşılık gelen enerji farkları önemlidir. Moleküler mekanik yöntemler oldukça basit hesaplama teknikleri kullandıkları için, çok büyük moleküllere dahi hiçbir sınırlama olmaksızın uygulanabilirler. İşlem süreleri diğer yöntemlere göre çok kısadır. MM+, AMBER ve CHARM moleküler mekanik yöntem kullanan paket programlardan bazılarıdır.

4.2. Yarı-denel (Semi Emprical) Yöntemler

Yarı-denel yöntemlerde gerçek moleküler hamiltoniyen operatörü yerine daha basit bir hamiltoniyen yazılarak deneysel verilerden veya ab initio hesaplamalardan elde edilmiş bazı düzeltme parametreleri kullanılmaktadır. Hückel moleküler orbital teorisi (HMO) ve genişletilmiş

(extended) Hückel teorisi (EH) yarı-denel yöntemlere örnek olarak verilebilir. Bu yöntemlerde integraller hiçbir zaman kullanılmaz bunun yerine düzeltme parametreleri kullanılır. Bu yöntemde, MOPAC, AMPAC, GAUSSIAN ve HYPERCHEM gibi paket programlar kullanılmaktadır.

4.3. Ab Initio Yöntemler

Ab initio yöntemleri kuantum mekaniğine dayanmaktadır. Bu yöntemler ile molekül yapısı ve buna bağlı tüm özellikler hesaplanabilir. *Ab initio* Latince kökenli bir kelime olup “başlangıçtan itibaren” anlamına gelir. Bu yöntemler MM ve yarı-denel yöntemlerden farklı olarak deneysel parametre kullanmazlar. Buna bağlı olarak hesaplama süreleri moleküler mekanik yöntemlere göre daha fazladır. Bu yöntemler Schrödinger dalga denkleminin çözümüne dayanır. Tek elektronlu Hidrojen atomu için bu denklemi çözmek mümkün olsa da çok elektronlu sistemlerde çözüm çok zor olduğundan; Hartree-Fock Self Consistent Field (HF-SCF) ve Density Functional Theory (DFT) gibi farklı matematiksel yaklaşımlar kullanılır. Hartree-Fock (HF) modelinde enerji molekül dalga fonksiyonu ψ ye göre ifade edilir. HF modeli korelasyon yani etkileşim enerjisini dikkate almaz. Yoğunluk Fonksiyonel Teorisinde (DFT) enerji, elektron yoğunluğu ρ ’ ya göre ifade edilir.

4.3.1. Yoğunluk Fonksiyoneli Teorisi (DFT)

Yoğunluk fonksiyoneli teorisi (DFT) 1927 yılında Thomas ve Fermi [143-145] tarafından yapılan çalışmaları temel alan Hohenberg ve Kohn teoremleri [146] ve onun devamı olan Kohn–Sham teoremlerine dayanmaktadır [147]. Teorem çok elektronlu sistemlerin taban durum özelliklerini belirlemek için elektron yük yoğunluğu olan $\rho(\vec{r})$ ’yi temel değişken kabul eder.

Yoğunluk fonksiyonları teorisi, atom, molekül ve katıların elektronik yapılarını hesaplayabilen başarılı bir teoridir. Temel kuantum mekanik yasalarından yararlanarak malzeme özelliklerini nicel olarak anlamayı amaçlar. Geleneksel elektronik yapı metotları, atom çekirdeklerince oluşturulan elektrostatik potansiyel gibi bir dış potansiyel alanında hareket eden N tane elektronun Schrödinger denklemini yaklaşık olarak çözmeye çalışır. Fakat bu yaklaşımların çok ciddi sınırlamaları vardır. Örneğin N sayısı çok küçük olsa bile problem hala açık değildir. Bileşke dalga fonksiyonları karışır. Tanecik sayısı arttıkça hesaplama süresi artar. Dolayısı tanecik sayısını fazla olduğu sistemlerde denklemin çözümü iyice zorlaşır.

DFT'nin kullandığı yaklaşımda temel değişken olarak, çok-cisim dalga fonksiyonu yerine, tek cisim yoğunluğu kullanılır. $\rho(\vec{r})$ yoğunluğu sadece üç tane uzaysal koordinatın (dalga fonksiyonunun ya da N tane koordinatının değil) fonksiyonu olduğundan, DFT çok büyük sistemleri bile hesaplama kolaylığı getirir. Çekirdek ve sistemdeki tüm diğer elektronlarla etkileşim halinde olan bireysel elektronların etkileşmelerini ele alarak başlayan Hartree-Fock teorisine tersine, yoğunluk fonksiyoneli teorisinde bütün elektron sistemi göz önüne alınır. DFT ile Hartree-Fock metodunun ortak bir noktası da vardır.

4.3.2. Hartree-Fock Teorisi

Hartree-Fock yaklaşımı etkileşmeyen elektron orbitallerine karşı gelen dalga fonksiyonlarını temsil etmek için kullanılan bir yaklaşımdır [148]. Hartree-Fock metodu elektronlar arasındaki korelasyonu (ilişkiyi) göz önüne almaz. Ayrıca değiş-tokuş terimi yerel olmadığından Hartree-Fock denkleminin çözümü oldukça zordur ve hesaplanması da yoğunluk fonksiyoneli teorisine göre oldukça uzundur. DFT'de, toplam elektron yoğunluğu, her biri bir-elektron yoğunluğuna sahip olan tek-elektron

yoğunluklarına ayrıştırılabilir. Bu durumda tek elektron dalga fonksiyonları, Hartree-Fock teorisindekilere benzer.

4.3.3. Yerel Yoğunluk Yaklaşımı (LDA)

Yerel yoğunluk yaklaşımı (*Local Density Approximation, LDA*) değiş-tokuş korelasyon enerjisi (E_{xc}) sabit yoğunluklu elektron sistemindeki çok-elektron etkileşmelerine ait bilinen sonuçları kullanır. LDA, bir molekül veya katıdaki her bir noktanın belirli bir elektron yoğunluğuna sahip olduğu kabul edilmektedir. Bu her noktadaki elektronun, çevresindeki aynı yoğunluklu öteki elektronlarla etkileşmeye maruz kaldığı varsayılır. Gerçek elektronik sistemlerle tamamıyla uyumlu olmamasına rağmen, LDA pek çok sistem için oldukça doğru sonuçlar vermektedir [149].

Moleküler sistemler için DFT, Hartree-Fock yaklaşımındakine benzer moleküler orbital (MO) yaklaşımına götürür. Hartree-Fock veya LDA yaklaşımlarından hangisinin daha iyi sonuçlar verdiği çok da açık değildir. Aslında, Hartree-Fock yaklaşımının LDA'ya göre uygulanabilirliği, elektronlar arasındaki çoklu etkileşmelere bağlıdır. Bu etkileşmeler, atomlar arası mesafe fazla ise Hartree Fock yaklaşımı daha iyi sonuçlar vermektedir. Fakat bu çoklu etkileri daha kısa-erişimli (belki atomlar arası mesafeden daha küçük) ise LDA yaklaşımı çok daha uygun olmaktadır. Bu durumda, metaller, geçiş metallerinin bileşikler ve hatta inorganik bileşikler için LDA yönteminin, özellikle yapısal özelliklerin incelenmesine çok uygun olduğunu belirlenmiştir [148-150].

5. DENEYSEL KISIM

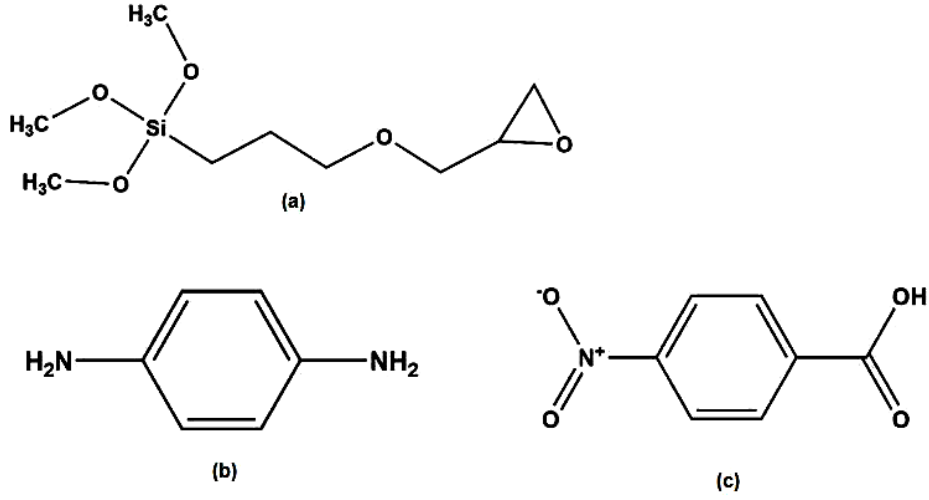
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

5.1.1. Si(100) yüzeylerin temizlenmesinde kullanılan maddeler

Katı substrat olarak silikon diskler kullanılmıştır. Kullanılan silikon diskler (100) yönlenmesinde düzenlenmiş, çapları 100 mm, dirençleri 10–30 Ω -cm ve kalınlıkları 500–550 μ m olan yüzeylere sahiptir. Bu yüzeyleri üst kısmı parlatılmış arka yüzü ise aşındırılmış durumdadır. Gerçekleştirilecek kendiliğinden düzenleme işlemleri için öncelikle kullanılacak Si(100) disk yüzeylerin temizlenmesi ve hidroksillenmiş yüzeylerin hazırlanması gerekmektedir. Bu işlemler için; Aldrich firmasından temin edilen, hidrojen peroksit [H_2O_2] (% 30 v/v), etil alkol [C_2H_5OH] (% 99 v/v), amonyum hidroksit [NH_4OH] (% 29,8 v/v) ve hidroklorik asit [HCl] (% 37,8 v/v) kullanılmıştır.

5.1.2. Si(100) yüzeyler üzerinde tekli ve çoklu tabakaların hazırlanmasında kullanılan maddeler

Epoksi sonlu yüzeylerin hazırlanmasında, (3-Glisidoksipropil)trimetoksisilan (GPTS), ışık-duyarlı bileşiğin sentezlenmesinde p-fenilendiamin ve 4-Nitrobenzoik asit kimyasal maddeleri kullanılmıştır. Bütün bu kimyasal maddeler Aldrich firmasından temin edilmiştir. Bu maddelerin kimyasal yapıları Şekil 5.1’de verilmiştir.

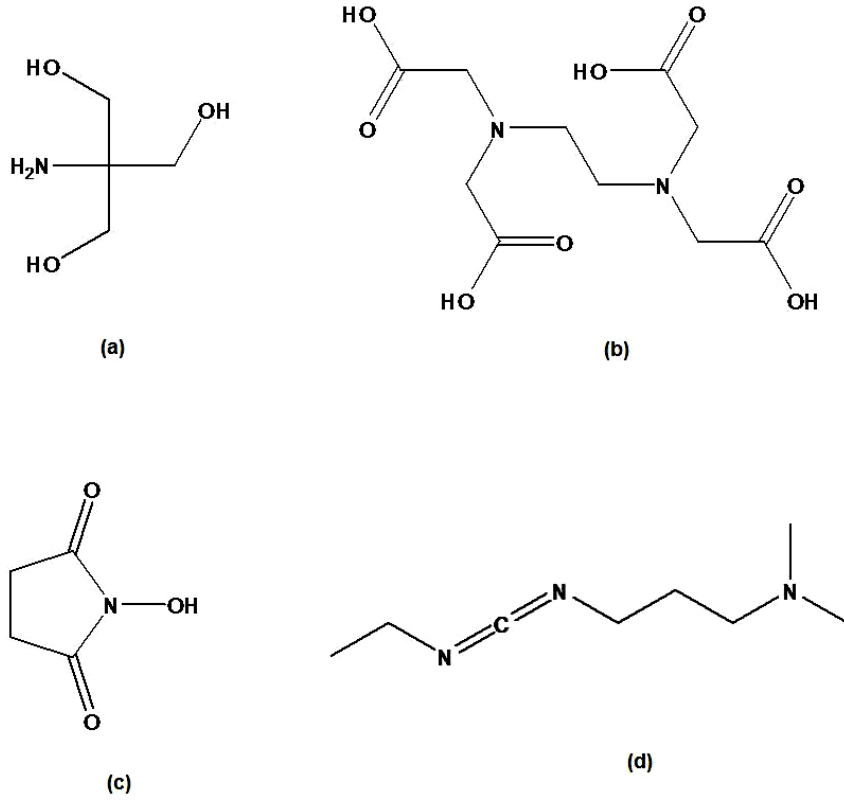


Şekil 5.1. Kullanılan kimyasal maddelerin moleküler yapıları, (a) 3-Glisidoksitrimetoksisilan, (b) p-fenilendiamin, (c) 4-Nitrobenzoik asit

5.1.3. Işık kontrollü DNA çip için kullanılan DNA dizileri ve gerekli kimyasal maddeler

Hazırlanan ışık-duyarlı yüzeyleri üzerine β -talasemi hastalığına ait olan **CY3-5'-CTCTCTGCCTATTAGTCTATTTTCC-NH₂** dizisindeki mutasyonlu gen bölgesinden oluşan floresans etiketli hedef-oligonükleotid problemleri immobilize edilmiştir. Çalışmalarda kullanılan tüm DNA dizileri *Metis Biyoteknoloji Şirketi'nden* temin edilmiştir. β -talasemi hastalığı için hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için kontrol çalışmaları **CY5-5'-GGAAAATAGAGTAATAGGCAGAGAG** eşlenik hedef-DNA dizisi ve **CY5-5'-GGAAAATAGAGGAATAGGCAGAGAG** eşlenik olmayan DNA dizisi ile yapılmıştır. Yapılan DNA çalışmalarında tampon çözelti olarak pH 7.4 tris-EDTA tamponu kullanılmıştır. Tampon çözeltinin hazırlanmasında Aldrich firmasından temin edilen ve Şekil 5.2'de kimyasal yapıları verilen tris(hidroksimetil) aminometan ile etilendiamintetraasetik asit bileşiklerini kullanılmıştır. Hazırlanan tampon çözeltinin pH değeri ve iyonik şiddeti MgCl₂ (Aldrich) ve NaOH (Aldrich) çözeltileri kullanılarak ayarlanmıştır.

Asit-sonlu ışık kontrollü yüzeyler üzerine NH_2 uç gruplu prob-DNA'nın bağlanmasında, yüzeyler öncelikle Aldrich firmasından temin edilen *N*-Hidroksisüksinimit ve (1-etil-3-(3-dimetilaminohidroksipropil) karbodimit) bileşikleri kullanılarak aktifleştirilmiştir. Bileşiklerin kimyasal yapıları Şekil 5.2'de verilmiştir.



Şekil 5.2. Kimyasal maddelerin moleküler yapıları; (a) tris(hidroksimetil) aminometan (tris), (b) etilendiamintetraasetik asit (EDTA), (c) *N*-Hidroksisüksinimit (NHS), (d) (1-etil-3-(3-dimetilaminohidroksipropil) karbodimit) (EDAC)

5.2. Yüzeylerin Temizlenmesi

Si(100) diskler ultrasonik banyoda 50°C 'da triplet saf su ile 15 dakika, daha sonra ultrasonik banyoda 50°C 'da etil alkol ile 15 dakika organik kirliliğin uzaklaştırılması için yıkanmıştır. Yıkanan yüzeyler hidroflorik asit çözeltisinde 20 saniye bekletilmiş ve hemen bu işlemten sonra 1:1:5 (v/v) ($\text{NH}_4\text{OH}:\text{H}_2\text{O}_2:\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi içerisinde 65°C 'da 30 dakika bekletilmiştir.

Daha sonra, yüzeyler ultrasonik banyoda saf su ile tekrar yıkanmıştır. Bu işlemden sonra, yüzeyler 1:1:5 (v/v) (HCl:H₂O₂:H₂O) çözeltisi içerisinde 6 °C'da 30 dakika bekletilmiş ve yüzeyler saf su ile yıkanarak azot gazı ile kurutulmuştur.

5.3.Temizlenmiş Yüzeylere Organik Moleküllerin Bağlanması

5.3.1. Epoksi-sonlu yüzeylerin hazırlanması

Hidroksillenerek aktif hale getirilmiş Si(100) yüzeyler üzerine toluen içerisinde hazırlanan 3-Glisidoksipropiltrimetoksisilan (GPTS) molekülleri kovalent olarak bağlanmıştır. Epoksi-sonlu yüzeylerin hazırlanmasından kendiliğinden düzenlenme yöntemi kullanılmıştır. Bu yüzeylerin hazırlanmasına ait optimizasyon çalışması için iki önemli yürütücü parametre incelenmiştir.

Bekletme süresi etkisi

Hazırlanan derişimdeki GPTS çözeltisi içerisinde aktif hale getirilmiş Si(100) yüzeyler için bekletme süresi etkisi incelenmiştir. Bu amaçla temizlenmiş ve hidroksillenmiş yüzeyler toluen içerisinde hazırlanmış %1(v/v) GPTS çözeltisi içerisinde 5,10,18 ve 24 saatlik sürelerde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda, yüzeye kovalent olarak bağlanmadan kalan moleküllerin uzaklaştırılması için yüzeyler öncelikle toluen daha sonra dikolorometan ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

GPTS derişimi etkisi

Optimum bekletme süresi belirlenmiş yüzeyler üzerine GPTS derişimi etkisi çalışılmıştır. Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler toluen içerisinde hazırlanmış %0.5, %1.0, %1.5 , %2.0 (v/v) GPTS çözeltileri içerisinde oda sıcaklığında 18 saat süre ile daldırılmışlardır. Bu süre sonunda,

yüzeye kovalent olarak bağlanmadan kalan moleküllerin uzaklaştırılması için yüzeyler öncelikle toluen daha sonra dikolorometan ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

5.3.2. Işık duyarlı 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) sentezi

Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında azobenzen türevi bir bileşik olan 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) molekülü sentezlenmiştir. Işık duyarlı APABA bileşiği “*Schündehütte*” metodu kullanılarak sentezlenmiştir [151]. Schündehütte metoduna göre, 200 mL % 3'lük NaOH çözeltisinde 16.7 g (100 mmol) 4-Nitrobenzoik asit ve 300 mL % 3'lük NaOH içerisinde hazırlanan 20 g (185 mmol) p-fenilendiamin çözeltisinin geri soğutucu altında 95°C sıcaklıkta 12 saatlik reaksiyonu sonucunda ışık-duyarlı APABA bileşiği elde edilmiştir. Karışım reaksiyon sonunda oda sıcaklığına soğutulduğunda çöken % 69 saflıktaki ürün toplanmış, su ile yıkandıktan sonra kurutulmuştur.

Elde edilen azobenzen molekülünün kimyasal özelliklerinin incelenbilmesi ve kimyasal yapısının aydınlatılması için öncelikle ATR-FTIR spektrumu ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumu alınmıştır. Sodyum tuzu olarak sentezlenen azobenzen molekülü için ¹H-NMR ile yapıdaki amino ve fenil pikleri incelenmiştir. Ayrıca APABA bileşiğinin moleküler kütlesi Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ölçümleri ile belirlenmiştir.

Azobenzen molekülünün *trans* konumdan *cis* konuma geçişini sağlamak amacıyla, molekül değişik sürelerde UV ışık ile uyarılmıştır. Konformasyon değişikliği, ışık kaynağı ile uyarma sonrasında spektrofotometrik olarak incelenmiştir.

5.3.3. Işık-duyarlı yüzeylerin hazırlanması

Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında epoksi-sonlu yüzeyler üzerine ışık-duyarlı APABA molekülleri kovalent olarak bağlanmıştır. Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanması için yapılan optimizasyon çalışmalarında iki önemli yürütücü parametre incelenmiştir.

Bekletme süresi etkisi

Epoksi-sonlu yüzeyler DMSO içerisinde hazırlanan 20 mM APABA çözeltisinde, 1, 3, 8, 12 ve 24 saatlik sürelerde oda sıcaklığında bekletilmiştir. Bu süre sonunda, yüzeye kovalent olarak bağlanmadan kalan moleküllerin uzaklaştırılması için yüzeyler öncelikle DMSO daha sonra dikolorometan ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

APABA derişimi etkisi

Optimum bekletme süresi belirlenmiş yüzeyler üzerine APABA için derişim etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla epoksi-sonlu yüzeyler DMSO içerisinde hazırlanmış 5, 10, 20, 30 ve 40 mM APABA çözeltileri içerisinde oda sıcaklığında 24 saat süre ile daldırılmışlardır. Bu süre sonunda, yüzeye kovalent olarak bağlanmadan kalan moleküllerin uzaklaştırılması için yüzeyler öncelikle DMSO daha sonra dikolorometan ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Ortam sıcaklığı etkisi

Optimum bekletme süresi ve APABA derişimi belirlenmiş sistemler için hazırlama sıcaklığı etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla epoksi-sonlu yüzeyler optimum APABA derişimindeki çözeltilerde 24 saat boyunca 22°C ve 50°C ortam sıcaklıklarında bekletilmiştir.

Optimum hazırlama şartları araştırılan ışık-duyarlı yüzeylerin kalınlıkları elipsometre ile ölçülmüş ve yüzeylerin pürüzlülüğü ve hidrofilik/hidrofobik

karakteri su değme açısı ölçümleri ile belirlenerek yüzeyler için optimum hazırlama koşulları belirlenmiştir.

Aynı zamanda, ışık-duyarlı yüzeylerin ışık ile kontrol edilebilmesine bağlı olarak gerçekleşen *trans-cis* dönüşümü ile malzemelerin yüzey özelliklerinin değişimi değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir.

5.4. Işık Kontrollü DNA Çip

5.4.1. Prob-DNA dizilerinin ışık kontrollü yüzeylere bağlanması

Işık kontrollü yüzeyler üzerine β -talasemi hastalığına ait nokta mutasyonlu NH_2 uç gruplu floresans etiketli prob-DNA dizileri (**CY3-5'-CTCTCTGCCTATTAGTCTATTTTCC-NH₂**) immobilize edilmiştir. Öncelikle ışık-duyarlı DNA çip için optimum çalışma koşulları yapılan derişim ve inkübasyon süresi çalışmaları ile belirlenmiştir.

Prob-DNA derişimi etkisi

Amino uç gruplu prob-DNA iplikçiklerinin asit sonlu yüzeylere kovalent olarak bağlanabilmesi amacıyla öncelikle asit sonlu yüzeyler reaksiyona aktif hale getirilebilmek amacıyla 3 saat boyunca 25°C' da 10 mM EDAC/10 mM NHS (tris-EDTA tampon, pH 7.4) çözeltisi içerisinde bekletilmiştir. Daha sonra ışık kontrollü DNA hazırlanmasında optimum prob-DNA derişiminin belirlenmesi amacı ile pH 7,4 tris-EDTA tamponunda hazırlanan 0.9, 1.8, 2.7 ve 3.6 μM derişimlerdeki prob-DNA çözeltilerinden 100 μL hacminde damlatılmış ve immobilizasyonun sağlanması için 25°C sabit sıcaklıkta karanlıkta 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzeyler bağlanmadan kalan prob-DNA'ların uzaklaştırılması amacıyla 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 5 dakika boyunca daha sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak ultra saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Prob-DNA için bekletme süresi etkisi

En uygun prob-DNA derişimi belirlenmiş yüzeyler bu çözelti içerisinde; 5, 8, 15 ve 24 saat sürelerde karanlıkta 25°C sabit sıcaklıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzeyler 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sulfat (SDS) çözeltisi ile 5 dakika boyunca sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak ultra saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Işık kontrollü DNA çip hazırlanmasına ait optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen DNA çip için yüzeylerdeki prob-DNA yoğunluğu ve yüzeylerinin desenleri Floresans mikroskobu kullanılarak belirlenmiştir.

5.4.2. Işık kontrollü DNA çip için hibridizasyon çalışması

Işık kontrollü DNA çip β -talasemi hastalığının tespiti için kullanılacaktır. Bu amaçla, ışık kontrollü yüzeyler üzerine immobilize edilen β -talasemi hastalığına ait nokta mutasyonlu prob-DNA dizilerinin hibridizasyon çalışması yapılmıştır. Hibridizasyon kontrolü eşlenik oligonükleotid dizisinden oluşan (CY5-5'-GGAAAATAGAGT**T**AATAGGCAGAGAG) floresans etiketli hedef-DNA dizisi kullanılarak yapılmıştır. En etkin hibridizasyonun elde edilmesi amacıyla hazırlanan çip için optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Hedef-DNA derişimi etkisi

Işık kontrollü DNA çip için optimum hibridizasyon eşlenik-oligonükleotid (hedef-DNA) derişimi çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, hazırlanan ışık kontrollü DNA çip yüzeyleri üzerine pH 7,4 tris-EDTA tamponunda hazırlanan 2.7, 3.6, 8.1 ve 10.8 μ M derişimlerindeki hedef-DNA çözeltilerinden 100 μ L hacminde damlatılmış ve hibridizasyon sağlanması için 37°C sabit sıcaklıkta karanlıkta 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sulfat (SDS)

çözeltisi 5 dakika boyunca daha sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak ultra saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Hibridizasyon süresi etkisi

Optimum hibridizasyon süresinin belirlenmesi amacıyla optimum derişimi belirlenmiş hedef-DNA çözeltileri içerisinde yüzeyler 3, 8, 15 ve 24 saat sürelerde karanlıkta 37°C sabit sıcaklıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda eşleşmeden kalan hedef-DNA iplikçiklerinin uzaklaştırılması için yüzeyler 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 5 dakika boyunca daha sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak ultra saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

5.4.3. Işık kontrollü Prob-DNA bağlı yüzeyler için kontrol hibridizasyon çalışması

β -talasemi hastalığının tespiti için kullanılacak olan ışık kontrollü DNA çip ikinci kontrol çalışması olan eşlenik olmayan DNA zincirinin hibridizasyonu için (CY5-5'-GGAAAATAGAGGAATAGGCAGAGAG) prob dizisi kullanılarak hibridizasyon çalışması yapılmıştır. Bu amaçla, hazırlanan ışık kontrollü DNA çip üzerine pH 7,4 tris-EDTA tamponunda hazırlanan 10,7 μ M derişimlerindeki eşlenik olmayan-oligonükleotid çözeltilerinden 100 μ L hacminde damlatılmış ve hibridizasyon sağlanması için 37°C sabit sıcaklıkta karanlıkta 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzeyler 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 5 dakika boyunca daha sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Işık kontrollü DNA çipin hibridizasyon kontrolü Floresans mikroskobu kullanılarak yüzeydeki floresans şiddetindeki değişimin izlenmesi ile belirlenmiştir. Ayrıca Konfokal mikroskobu kullanılarak APABA

moleküllerinin *trans* konumunda olduğu çipin **açık (on)** pozisyonu ve APABA moleküllerinin *cis* durumunda olduğu çipin **kapalı (off)** pozisyonu için piksel sayımına bağlı hibridizasyon yüzdeleri hesaplanmıştır.

5.4.4. Işık kontrollü DNA çip için gerçek DNA numunesi ile kontrol çalışması

Işık kontrollü DNA çip için gerçek kan numunesinden izole edilen PCR ürünü, normal (sağlıklı), taşıyıcı ve hastalıklı DNA dizileri *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik ABD*'nden temin edilmiştir. Gerçek kan numuneleri ile hibridizasyona dayalı kontrol çalışmaları için 100 µL hacmindeki DNA numuneleri (PCR tamponu içindeki) CY3-prob-DNA bağlı ışık kontrollü yüzeyler üzerine damlatılmış ve hibridizasyon sağlanması için 37°C sabit sıcaklıkta karanlıkta 24 saat süreyle bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzeyler 50°C sıcaklıktaki seyreltik sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile 5 dakika boyunca daha sonra tris-EDTA tamponuyla ve en son olarak saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutulmuştur.

Işık kontrollü DNA çipin hibridizasyon kontrolü Floresans mikroskobu kullanılarak yüzeydeki floresans şiddetindeki azalmanın izlenmesi ile belirlenmiştir.

5.5. Yüzeylerin Kimyasal ve Biyokimyasal Karakterizasyonu

5.5.1. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Temizlenmiş Si(100), GPTS ve APABA bağlanmış Si(100) yüzeylerin kimyasal analizi ODTÜ Merkez Laboratuvarı tarafından Mg kaynak kullanılarak 10^{-9} torr ultra yüksek vakumda yapılmıştır.

5.5.2. Fourier transform infrared (FT-IR) spektroskopisi

Hazırlanan yüzeylerin yapısal karakterizasyonu, Nicolet Nexus 6700 FT-IR spektrofotometresi kullanılarak incelenmiştir. Deneyler esnasında daha önceden belirtilmiş koşullarda hazırlanan yüzeylerin ilave işlem yapılmadan doğrudan FT-IR spektrumları alınmıştır. Örnekler 4 cm^{-1} ayıricılıkta 64 kez tarama yaptırılarak $400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$ arasında spektrumları elde edilmiştir.

5.5.3. Elipsometre

Si(100) yüzeyine bağlanan organik moleküllerin kalınlık artışı Nanofilm (Almanya) marka görüntülü Elipsometre ile belirlenmiştir. Ölçümler, 72° değme açısında 532 nm dalga boyunda laser kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

5.5.4. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Hidroksillenmiş SiOH, GPTS ve APABA ile hazırlanan yüzeylerin 2 ve 3-boyutlu yüzey morfolojileri Veeco Nanoscope IIIa AFM sistemi kullanılarak belirlenmiştir. Ölçümler non-kontak modda ve frekans aralığı $995\text{-}1001\text{ kHz}$ olan AFM iğnesi kullanılarak vakum altında gerçekleştirilmiştir.

5.5.5. UV spot lambası cihazı

Azobenzen molekülünün fotoizomerizasyon davranışının incelenebilmesi için UV spot lambası cihazı kullanılmıştır. Bu işlem için Şekil 5.3'de gösterilen sistem kullanılmıştır. DYMAX marka (BlueWave 50) UV spot lambası cihazı şiddet ayarı yapılabilen 100 W 'lık bir civa lambası ile farklı dalga boylarında ışınlatma kullanılacak iki farklı UV filtreden (366 nm ve 450 nm) oluşmaktadır.



Şekil 5.3. UV spot lambası cihazı

5.5.6. Değme açısı ölçümleri

Değme açısı ölçümleri flaş kamera aksesuarlı Krüss DSA-100 marka otomatik değme açısı ölçüm cihazı ile yapılmıştır. Çalışmada SiOH, GPTS, APABA-GPTS ve DNA-APABA-GPTS bağlanmış silikon yüzeyler üzerine 5 μ L hacminde ultra saf su damlatılmış ve hızlı bir şekilde fotoğrafları çekilerek cihazın program yardımı ile su değme açıları belirlenmiştir. Her bir yüzeyde üç ayrı damla kullanılmış ve bunların ortalaması alınarak hesaplamalar yapılmıştır.

Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin sıvı-yüzey etkileşiminin üzerine sıvıların özelliklerinin incelenmesi amacıyla, yüzeylerin farklı sıvılar kullanılarak hem görünür bölgede (450 nm) hem de UV ışık (366 nm) ile ışınlandıkları durumları için ileri (θ_{ileri}) ve geri değme açısı (θ_{geri}) ölçümleri alınmış ve bu değerlerden faydalanarak yüzey enerjileri hesaplanmıştır.

5.5.7. Floresans mikroskobu

Işık kontrollü DNA çip hazırlanırken kullanılan Cy3 ve Cy5 floresans etiketlerine ait floresans şiddetleri ve yüzeylerin desenleri Olympus BX51 marka floresans mikroskobu ile incelenmiştir. Sistemde ışık kaynağı olarak cıva lamba kullanılmıştır. Ölçümler 20 büyütme ile kırmızı filtre kullanılarak karanlıkta alınmıştır.

5.5.8. Konfokal mikroskobu

Cy3 ve Cy5 floresans etiketleri kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için piksel sayımına bağlı hibridizasyon yüzdeleri Leica TCS SPE marka konfokal mikroskobu kullanılarak hesaplanmıştır. Ölçümler 63X büyütme ile yağlı olarak, Cy3 ve Cy5 filtreleri kullanılarak karanlıkta alınmıştır.

5.6. Teorik Yüzey Dizaynı

Yüzeyler üzerine kimyasal grupların bağlanmasının teorik olarak incelenmesi amacı ile Hohenberg, Kohn ve Sham'ın yoğunluk fonksiyonu teorisinin (DFT) kullanılması ile hazırlanmış pseudo potansiyellere ve düzlemsel dalga fonksiyonlarına dayanan bir *ab initio* DFT programı olan Viyana *ab initio* simulasyon paket programı (VASP) kullanılmıştır.

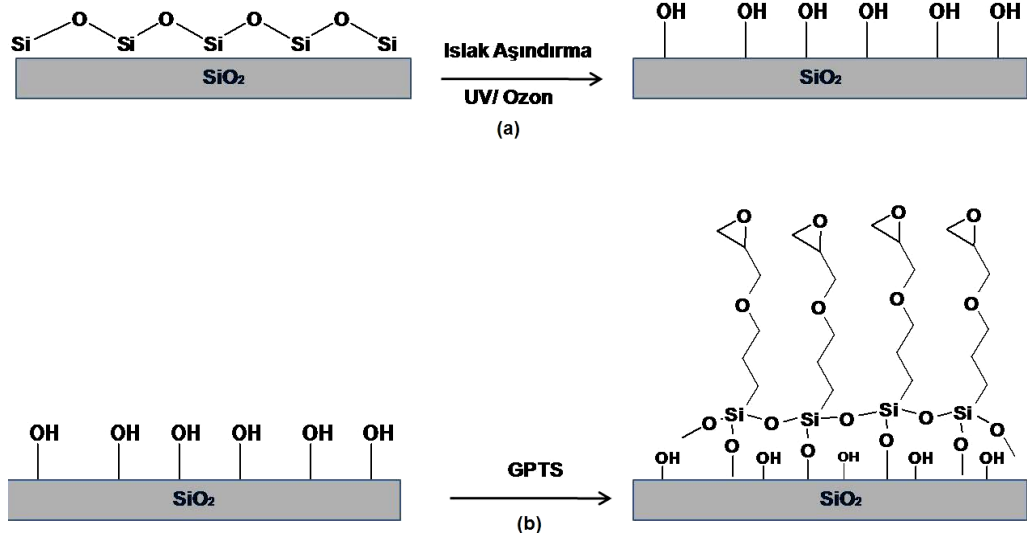
6. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

6.1. Epoksi-sonlu Yüzeylerin Hazırlanması

Organosilan tipi moleküller, ıslak aşındırma ile yüzeyinde -OH grupları oluşturulan SiO₂ yüzeyler üzerine kovalent olarak bağlanabilmektedirler. (3-glysidoksipropil)trimetoksisilan (GPTS) benzeri organosilan moleküllerinin Si/SiO₂ yüzeylerine bağlanmasında hem katı/gaz ara yüzeyi için hem de katı/ sıvı ara yüzeyi için alkoksi silan gruplarının hidrolizi gerekmektedir [152]. Bu ortamda su moleküllerin varlığı moleküllerin homojen ve sıkı istiflenmiş olarak alkoksi gruplarını kaybederek yüzeye bağlanmalarını sağlamaktadır. Bu nedenle silikon yüzeyler öncesinde temizlenerek hidroksillenip aktif hale getirilmesi oldukça önemlidir. Organosilan moleküllerinin Si(100) yüzeyleri üzerine bağlanmasında ortamdaki suyun miktarı çok önemlidir. Ortamdaki su miktarı azaltılarak GPTS moleküllerinin hidroksillenmiş silikon yüzeyler üzerine tek tabaka şeklinde bağlanması sağlanabilir [153].

GPTS molekülü yapısında bulunan epoksi halkası nedeniyle kolaylıkla –NH₂, -COOH ve –SH gibi fonksiyonel gruplara bağlanabilmektedir [154-156]. Bu özelliklerinden dolayı; çok tabakalı sistemlerin hazırlanmasında ara bağlayıcı molekül olarak kullanılabildiği gibi, enzim immobilizasyonunda, DNA ve protein çiplerin hazırlanmasında ve doku mühendisliği gibi biyoteknolojik alanlarda da sıklıkla kullanılmaktadırlar [157-159].

Bu çalışmanın amacı, ışık kontrollü yeni bir DNA çip hazırlanmasıdır. Bu amaç doğrultusunda, çok tabakalı bir sistem hazırlanmıştır.



Şekil 6.1. Yüzeylerin hazırlanmasının şematik gösterimi;
 (a) Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler, (b) Epoksi-sonlu Si(100) yüzeyler

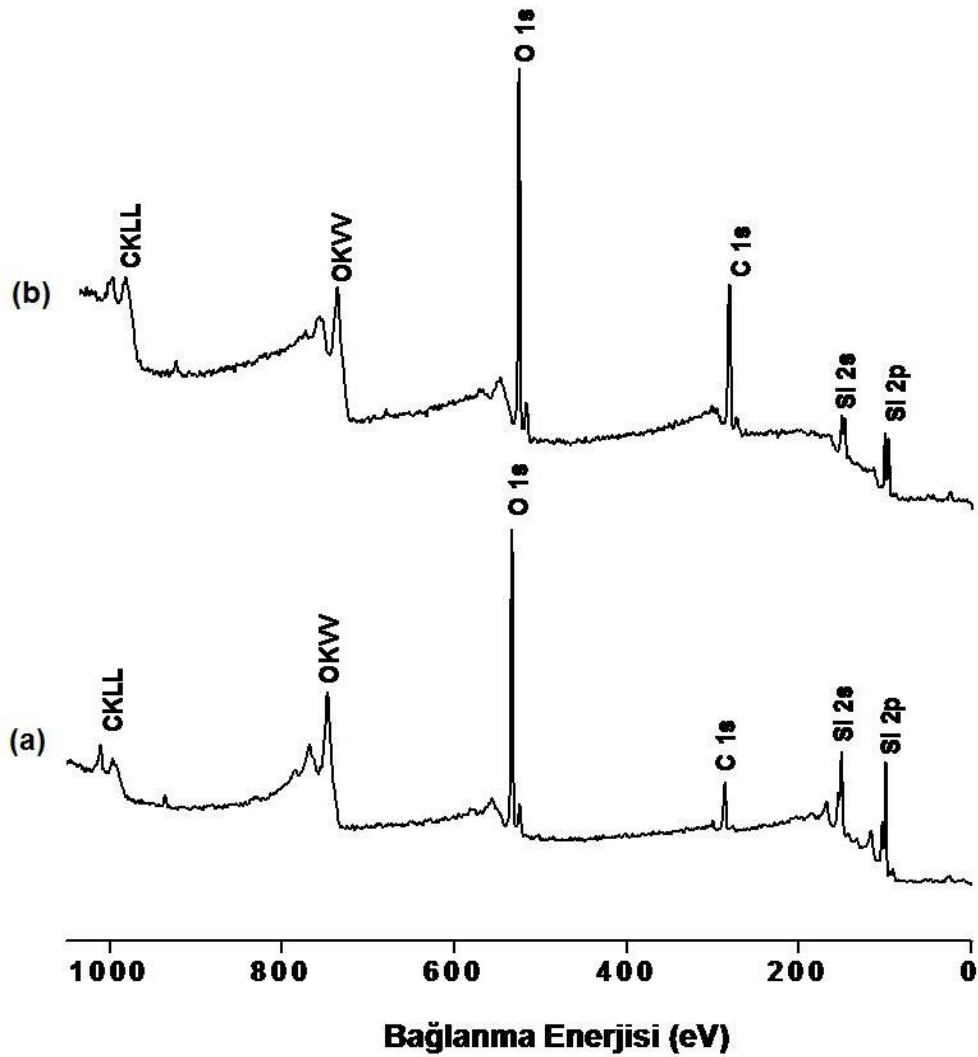
Bu sistemin ilk tabakasında, GPTS molekülleri kullanılarak ışık-duyarlı moleküllerin kolayca bağlanabileceği epoksi-sonlu yüzeyler hazırlanmıştır. Şekil 6.1’de gösterildiği gibi SiO₂ yüzeyler öncelikle organosilan türevi bir bileşik olan GPTS moleküllerinin bağlanması amacıyla, ıslak aşındırma ve UV/Ozon temizleme işlemi kullanılarak temizlenmiş ve hidroksillenerek aktif hale getirilmiştir. Aktif hale getirilen Si(100) yüzeyler üzerine, GPTS molekülleri metoksi gruplarını kaybederek kovalent olarak bağlanmış ve sonuçta aktif epoksi-sonlu yüzeyler hazırlanmıştır.

6.2. GPTS ile Hazırlanmış Epoksi-sonlu Yüzeylerin Karakterizasyonu

6.2.1. Yüzeyin kimyasal bileşimi

Hazırlanan epoksi-sonlu yüzeylerin kimyasal bileşiminin ve karakterizasyonunun yapılması amacı ile X-ışınları fotoelektron spektroskopisi kullanılmıştır. Epoksi-sonlu yüzeyler ile temiz yüzeyler arasındaki kimyasal bileşim farkının anlaşılması amacıyla, temiz silikon yüzeyler (Şekil 6.2 a) ve epoksi-sonlu hazırlanmış yüzeyler (Şekil 6.2 b) için O1s, C1s ve Si (2p ve 2s) elementlerine ait piklerinin varlığı düşük ayırmalı XPS spektrumları ile verilmiştir. Temiz Si(100) yüzeylere (Şekil 6.2 A) ait düşük ayırmalı XPS spektrumunda, 535 eV 'da O 1s, 285 eV 'da C1s ve 106-180 eV aralığında ise sırasıyla Si 2p ile Si 2s piklerinin varlığı gözlenmektedir. O1s piki silikon yüzeylerinin ıslak aşındırılması sonucu oluşturulan oksit tabakadan gelmektedir. Çok düşük miktarda gözlenen C1s piki ise XPS işlemlerinden önce atmosferden adsorplanan ya da ıslak aşındırma işlemlerinden kaynaklanan organik kirliliklerden dolayı olabilir. Literatürde temiz silikon yüzeylerin ıslak aşındırılması ile organik kirliliklerin oluşabileceği çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir [160-161].

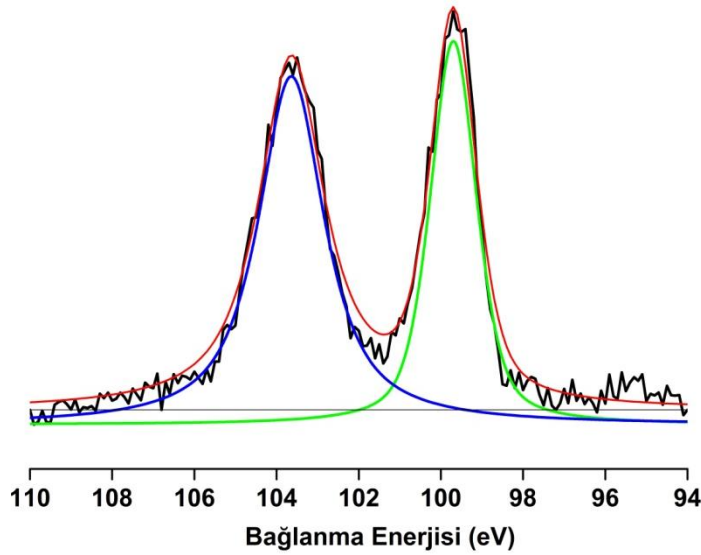
Epoksi-sonlu yüzeylere ait düşük ayırmalı XPS spektrumu (Şekil 6.2 b) incelendiğinde, GPTS moleküllerinin hidroksillenmiş temiz Si(100) yüzeylerine bağlanması sonucu yüzeydeki O1s ve C1s piklerinin şiddetinin arttığı gözlenmektedir.



Şekil 6.2. Hazırlanan yüzeylerin şematik gösterimi; (a) Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler, (b) Epoksi-sonlu Si(100) yüzeyler

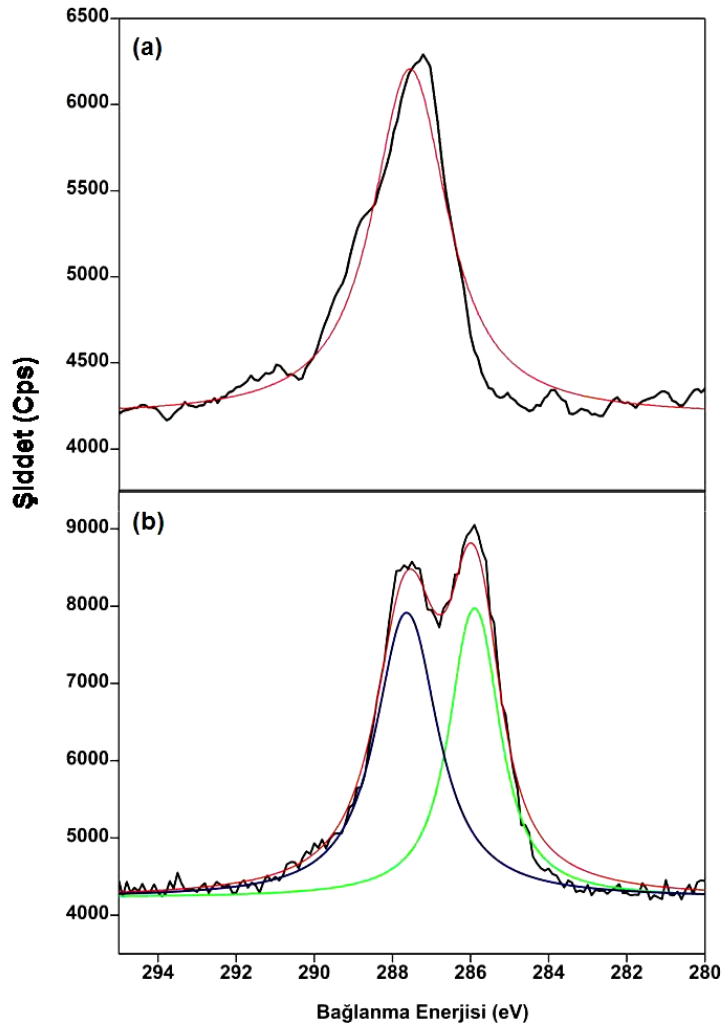
GPTS bağlı yüzeyler için Si 2p pikine ait yüksek ayırmalı XPS spektrumu Şekil 6.3'de verilmektedir. İlgili spektrum incelendiğinde; 99,7 eV'da elementel Si piki ve 103 eV'da ise Si^{+4} piki gözlenmektedir. Temiz Si (100) yüzeylerde 106 eV'da gözlenen karakteristik Si^{+4} piki, GPTS bağlı yüzeylerde 103,8 eV'a kaymış olarak gözlenmektedir. GPTS bağlı yüzeylerde Si^{+4} pikinin gözlenmesi yüzeylerin temizlenmesi işleminde oluşturulan oksit tabakasına bağlı olduğu düşünülmektedir [162, 163]. Literatürde yapılan çalışmalarda GPTS bağlı yüzeylerde gözlenen Si^{+4}

pikinin hem yüzeyden hem de GPTS molekülündeki Si-O bağına bağlı olarak yaklaşık 103 eV'da gözlemlendiği belirtilmiştir [159].



Şekil 6.3. Epoksi-sonlu yüzeylere ait Si 2p için yüksek ayırmalı XPS spektrumu

Temizlenmiş yüzeyler üzerine GPTS moleküllerinin bağlanmasında beklenen durum yüzeyde farklı elektronik çevreye sahip karbonların varlığıdır. Epoksi-sonlu yüzeylerdeki farklı elektronik çevreye sahip C1s atomlarının varlıkları, Şekil 6.4'de sırasıyla; (a) temiz Si(100) yüzeyleri için, (b) GPTS bağlı Si(100) yüzeyleri için yüksek ayırmalı XPS spektrumları ile gösterilmektedir.



Şekil 6.4. Yüksek ayırmalı XPS spektrumları; (a) Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyleri için C 1s piki ve (b) GPTS bağlanmış Si(100) yüzeyleri için farklı elektronik çevreye sahip karbon atomlarına ait C 1s piki

Şekil 6.4'de verilen yüksek ayırmalı XPS spektrumları incelendiğinde, temiz Si(100) yüzeylerinde (Şekil 6.4 A) organik kirliliklerden kaynaklandığı düşünülen C1s piki 287 eV'da tek bir pik olarak gözlenmektedir. GPTS bağlı epoksi-sonlu yüzeylere ait yüksek ayırmalı XPS spektrumu (Şekil 6.4 B) incelendiğinde ise farklı elektronik çevreye sahip karbon atomlarının varlığına bağlı olarak C1s pikinin ikiye yarıldığı gözlenmektedir. Bu spektrumdaki, 285 eV 'daki pik alifatik karbon

atomlarını (C-C) gösterirken, 288 eV'daki pik ise GPTS molekülüne ait karakteristik eter (C-O) karbonlarını göstermektedir [164-166].

6.2.2. Epoksi-sonlu yüzeyler için optimum hazırlama şartları

Organosilan türevi bir bileşik olan GPTS moleküllerinin hidroksillenmiş Si(100) yüzeylerine tek tabaka olarak düzgün bir şekilde kovalent bağlanması işleminde iki önemli yürütücü parametre bulunmaktadır.

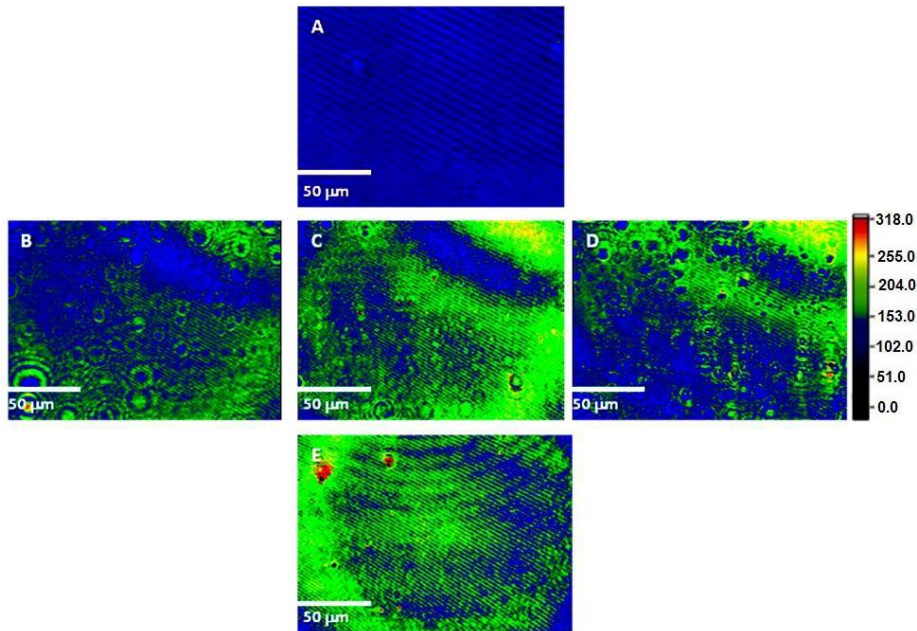
Bekletme süresi etkisi

Literatürde organosilan türevi bileşikler için genellikle çalışılan çözelti derişimi %1 (v/v) olarak belirlenmiştir [167]. Bu noktadan hareketle epoksi-sonlu yüzeyler için bekletme süresi etkisi toluen içerisinde hazırlanmış %1 (v/v) GPTS çözeltileri kullanılarak 5,10,18 ve 24 saatlik bekletme süreleri için çalışılmıştır. Bu süreler sonunda yüzeylerde oluşan değişimler ve yeni oluşumlar görüntülü elipsometrik kalınlıkların ve su değme açılarının ölçülmesi ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.

Bir yüzeyden polarize bir ışığın yansımaya bağlı olarak ışığın polarizasyonundaki değişimin ölçülmesine dayanan bir teknik olan elipsometrik ölçümlerde bilindiği gibi kırılma indisi oldukça önemli bir parametredir [168]. Bu nedenle hidroksillenmiş yüzey ve GPTS bağlı tabakaların analizinde silikon substrat/üst tabaka/hava içeren üç fazlı bir model kullanılmıştır. Tasarlanan yüzeylerin geçirgen olduğu kabul edilmiştir. Literatürde yapılan çalışmalarda karbon zincirleri içeren organik tabakaların genellikle bu davranışta olduğu belirtilmektedir [169]. Ayrıca, çok ince organik filmler için (<10 nm), kalınlık ile kırılma indisi çok yakından ilişkilidir. Bu nedenle, tasarlanmış yüzeyler üzerindeki tabakaların kalınlığı kırılma indisine bağlı olarak belirlenebilir [168].

Şekil 6.5'de gösterilen elipsometrik görüntüler incelendiğinde, aktif hale getirilmiş Si(100) yüzeyleri %1 (v/v)'lik GPTS çözeltisi içerisindeki artan bekletme zamanına bağlı olarak yüzeye bağlanan GPTS miktarında bir

artış görülmektedir. Fakat 24 saatlik bekletmeye ait elipsometrik görüntüde yüksek noktaları temsil eden kırmızı tepeciklerin oluştuğu yani GPTS moleküllerinin yüzeyde tek tabaka olarak bağlanmanın dışında çoklu tabakalı bir oluşum içine girdiği görülmektedir. Bu fiziksel adsorpsiyonlar kendiliğinden düzenlen tek tabaka oluşumlarında istenmeyen bir durumdur. Bu çalışmanın amacı, çok tabakalı bir sistem kullanarak ışık kontrollü yeni bir DNA çip hazırlamaktır. Bu amaç doğrultusunda sistemin ilk tabakasını oluşturan GPTS tabakasının oldukça homojen, sıkı istiflenmiş tek tabakadan oluşması istenmektedir. Bu sebepten GPTS moleküllerinin yüzeyler üzerine düzenlenmesinde bekletme süresi etkisi önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Bekletme süresi etkisi için alınan elipsometrik görüntülere göre 18 saatin üstündeki bekletme sürelerinde yüzeydeki topaklaşmaların arttığı ve buna bağlı olarak istenmeyen fiziksel adsorpsiyonların yüzeyin tek tabakalı oluşumunu bozduğu söylenebilir.



Şekil 6.5. Elipsometrik 2D- görüntüleri; (A) Si-OH, (B) GPTS (5h)/Si, (C) GPTS(10h)/Si, (D) GPTS (18h)/Si ve (E) GPTS (24h)/Si

Farklı bekletme sürelerinde hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler için ölçülen elipsometrik kalınlıklar ve su değme açıları Çizelge 6.1 ve Şekil 6.6'da grafiksel olarak verilmiştir.

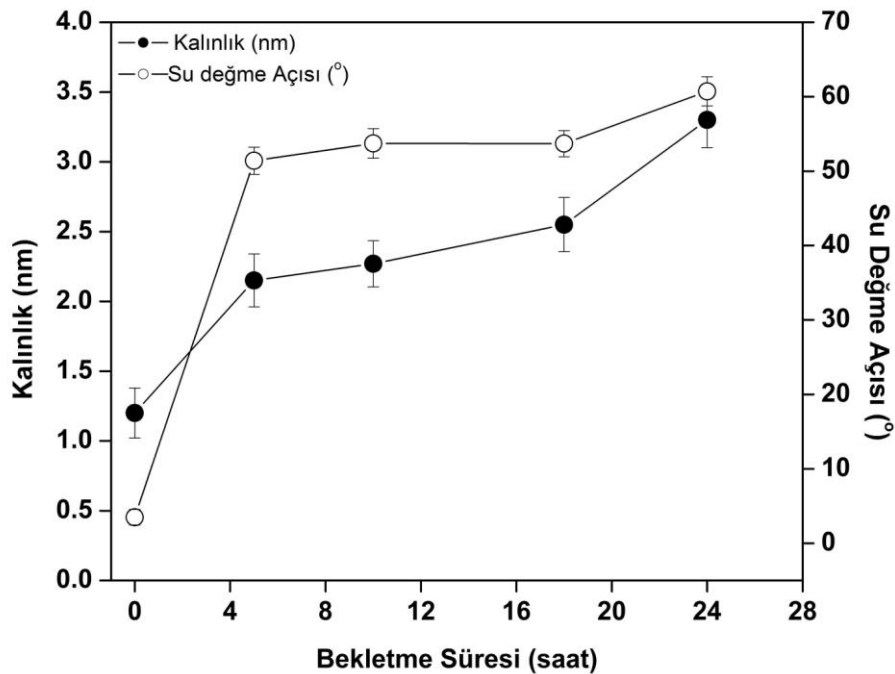
Çizelge 6.1. Hidroksillenmiş ve farklı bekletme sürelerinde GPTS bağlanmış Si(100) yüzeyleri için elipsometrik kalınlık ve su değme açısı ölçümleri

	Elipsometrik kalınlık (nm)	Su değme açısı (°)
Si-OH	1.20 ± 0.18	3.0 ± 0.18
GPTS(5 saat)/Si	2.15 ± 0.02	51.39 ± 0.21
GPTS(10 saat)/Si	2.27 ± 0.52	53.72 ± 0.10
GPTS(18 saat)/Si	2.55 ± 0.87	53.70 ± 0.70
GPTS(24 saat)/Si	3.30 ± 1.02	60.71 ± 1.80

Elipsometrik kalınlık ve değme açısı ölçüm değerleri her bir yüzeyin üç farklı yerinden alınan ölçümlerinin ortalama değerleridir. GPTS molekülü için yapılan teorik hesaplamalar sonucunda, molekülün Si(100) yüzeyine bağlandığında yüzeyden itibaren moleküler boyu yaklaşık olarak 1.2 nm olduğu belirlenmiştir. Şekil 6.1'de verilen grafik incelendiğinde farklı zamanlarda bekletme süresi çalışılan epoksi-sonlu yüzeyler için elipsometrik kalınlıklar bekletme süresinin artışıyla 2.15 nm'den 3.30 nm'ye değişen değerler göstermektedir. Bunun yanında hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler için ise elipsometrik kalınlık değeri 1.2 nm olarak ölçülmüştür. Hidroksillenmiş yüzey üzerindeki üst tabaka doğal oksitten ve havadan kaynaklanan kirlenmelerden dolayı olabilir. Bu nedenle epoksi-sonlu yüzeyler için elde edilen bu kalınlık değerleri etkin kalınlık olarak değil bağıl kalınlık değerleri olarak düşünülmelidir. Sackman ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, hazırladıkları epoksisilan film için kalınlık değerini molekülün beklenen moleküler boyundan daha fazla olarak 1.7 nm olarak hesaplamışlardır [170]. Tsuruk ve ark.(1999) ise

optimum hazırlama şartlarında SiO_2 yüzeyindeki GPTS filmi için kalınlığı 0.85 nm olarak belirlemişlerdir [153].

Farklı bekletme süresi etkisi incelenen epoksi-sonlu yüzeyler için elipsometrik görüntüleri ve kalınlıkları incelendiğinde, 18 saatlik bekletme süresinin üstündeki sürelerde yüzeylerin bağıl kalınlığının 2.55 nm'den 3.30 nm'ye hızlı bir şekilde arttığı gözlenmiştir. Ayrıca bu yüzeylere ait elipsometrik görüntülerde ise 18 saatin sonunda yüksek noktaların sayısının arttığı yani istenmeyen fiziksel topaklaşmaların oluşmaya başladığı söylenebilir. Bu sonuçlara bağlı olarak 18 saatlik bekletme süresi sonunda GPTS molekülü için 1.35 nm'lik bir kalınlık değeri belirlenmiştir. Bu değer GPTS molekülünün teorik olarak hesaplanan boyuna oldukça yakın bir değer olduğundan 18 saatlik bekletme süresi sonunda GPTS moleküllerinin hidroksillenmiş $\text{Si}(100)$ yüzeyleri üzerine tek tabaka halinde kaplandığı söylenebilir.



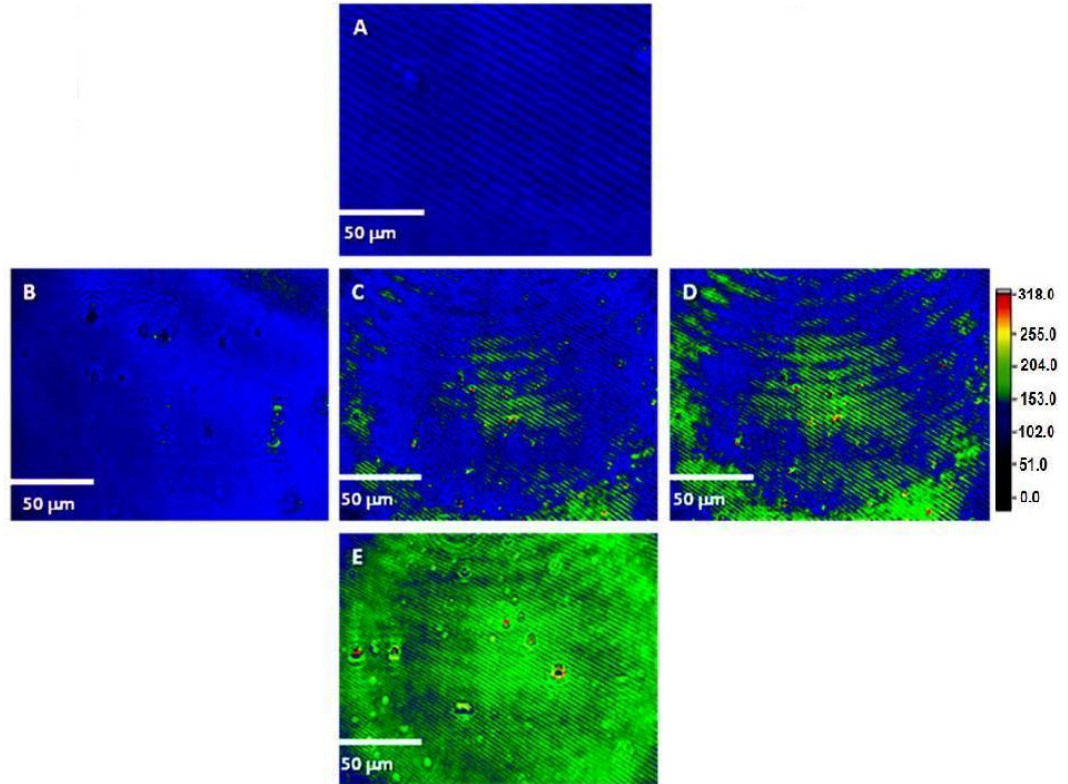
Şekil 6.6. Epoksi-sonlu yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine bekletme süresi etkisi

Yüzeyler üzerinde oluşturulan kendiliğinden düzenlenen tekli ve çoklu tabakaların formasyonunu bilmek açısından yüzeylerin hidrofobik-hidrofilik özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir. Yüzeylerin hidrofobik-hidrofobik karakterlerinin yanında pürüzlülük değerleri bilindiği gibi değme açısı ölçümleri ile kontrol edilebilmektedir. Bu nedenle hazırlanan farklı bekletme süresi etkisi çalışılan epoksi-sonlu yüzeyler için yüzey pürüzlülüğü ve ıslanabilirlik özellikleri değme açısı ölçümleri kullanılarak belirlenmeye çalışılmıştır. Elipsometrik kalınlık ölçümlerinin yanında alınan su değme açılarına bağlı olarak optimum bekletme süresinin bulunulmasına çalışılmıştır. Bu çalışmada, su değme açısı ölçümleri her bir yüzeyin üç farklı bölgesinden alınmış ve Çizelge 6.1'de ortalama değerler olarak verilmiştir. Çizelge ve farklı bekletme süreleri ile film kalınlığının ve su değme açılarının değişiminin gösterildiği Şekil 6.6 incelendiğinde, farklı bekletme sürelerinde hazırlanmış epoksi-sonlu yüzeyler için su değme açısı değerlerinin artan bekletme sürelerine bağlı olarak 51.39°'den 60.72°'ye değişti görülmektedir. Literatürde benzer şekilde hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler için su değme açısı yaklaşık 55° olduğu belirlenmiştir [171, 172]. Fang ve arkadaşları cam yüzeyler üzerine 0.6 % (v/v) derişimde hazırladıkları GPTS çözeltisi içerisine 12 saat boyunca daldırışlar ve işlemin sonunda hazırladıkları epoksi-sonlu yüzeyler için su değme açısını 55.3° olarak ölçmüşlerdir [173]. Elde edilen elipsometrik kalınlık ve su değme açısı değerlerine bağlı olarak hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler için en uygun bekletme süresinin 18 saat olduğu sonucu elde edilmiştir.

GPTS derişimi etkisi

Epoksi-sonlu organosilanların hidroksillenmiş Si(100) yüzeyleri üzerinde tek tabaka halinde düzgün bir düzenlenmeye sahip olmasında etkili bir diğer faktör GPTS derişimi etkisidir. Derişim etkisi tek tabaka oluşumunda bekletme süresi kadar olmasa da etkili bir faktördür. Bu nedenle hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler üzerine GPTS derişimi etkisi; % 0.5, %

1.0, % 1.5 ve % 2.0 (v/v) derişimlerdeki çözeltileri kullanarak incelenmiştir. Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyleri farklı derişimlerdeki GPTS çözeltilerine daha önceden belirlenmiş olan 18 saatlik bekletme süresi boyunca daldırılmış ve bu süresin sonunda epoksi-sonlu yüzeyler hazırlanmıştır. Farklı derişimlerdeki GPTS çözeltileri kullanarak hazırlanan yüzeyler için, GPTS moleküllerinin yüzeyler üzerindeki düzenlenme farklılıkları ve optimum derişim etkisinin belirlenebilmesi amacı ile görüntülü elipsometrik kalınlık ve su değme açısı ölçümleri alınmıştır. Şekil 6.7’de hazırlanan yüzeylerin elipsometrik 2-D görüntüleri verilmiştir.



Şekil 6.7. Elipsometrik 2D görüntüleri; (A) Si-OH, (B) % 0.5 (v/v) GPTS/Si, (C) %1.0 (v/v) GPTS/Si, (D) %1.5 (v/v) GPTS/Si, (E) GPTS % 2.0 (v/v) GPTS/Si

Hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler üzerine GPTS derişimi etkisinin araştırılması için alınan elipsometrik 2-D görüntüler incelendiğinde derişim

arttıkça yüzeyler üzerinde kırmızı alanların yani ada şeklindeki yüksekliklerin arttığı bir başka deyişle yığınlaşmaların arttığı gözlenmektedir. Bu sonuçla birlikte optimum derişime karar vermek için elipsometrik kalınlıklar ve su değme açıları alınmıştır. Alınan ölçümler Çizelde 6.2’de toplu olarak verilmektedir.

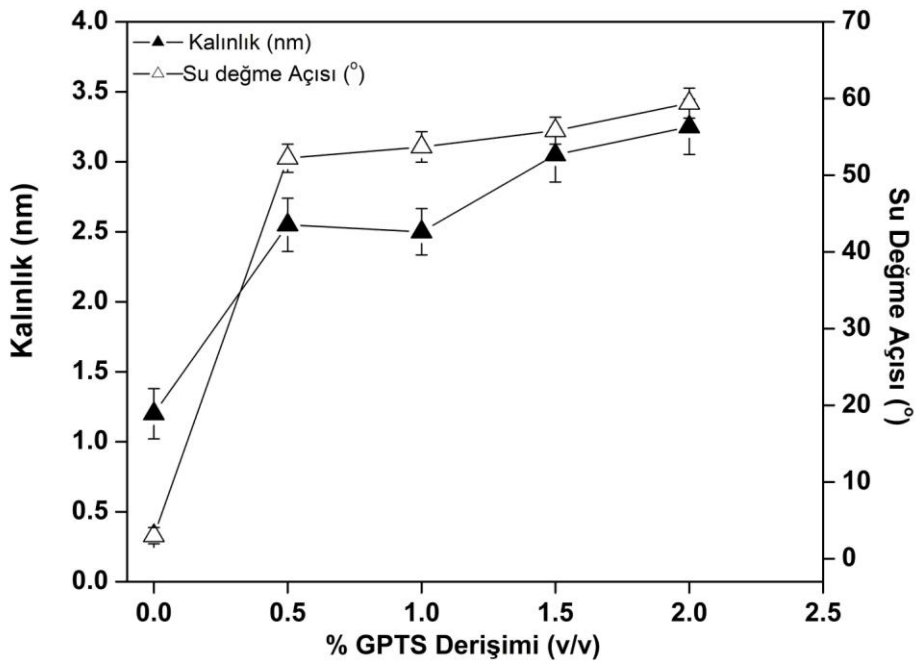
Çizelge 6.2. Hidroksillenmiş ve farklı derişimlerde hazırlanan GPTS çözeltilerde bekletilmiş Si(100) yüzeyleri için elipsometrik kalınlık ve su değme açısı ölçümleri

	Elipsometrik kalınlık (nm)	Su değme açısı (°)
Si-OH	1.20 ± 0.18	3.0 ± 0.18
% 0.5 (v/v) GPTS/Si	2.55 ± 0.06	52.22 ± 0.18
% 1.0 (v/v) GPTS/Si	2.49 ± 0.22	53.56 ± 0.90
% 1.5 (v/v) GPTS/Si	3.14 ± 0.56	55.82 ± 0.36
% 2.0 (v/v) GPTS/Si	3.39 ± 1.29	59.45 ± 0.98

Şekil 6.7’de verilen farklı GPTS derişimlerindeki çözeltiler içinde bekletilmiş Si(100) yüzeylerine ait elipsometrik görüntüleri incelendiğinde, temiz Si(100) yüzeylerine göre farklı derişimlerde GPTS moleküllerinin düzenlenmesi ile hazırlanan yüzeylerin oldukça farklı olduğu gözlenmektedir. Beklendiği gibi GPTS derişimi arttıkça yüzeyde yığınlaşmalar yüksek noktaları temsil eden kırmızı noktacıkların artmasıyla gözlenmektedir.

Hazırlanan epoksi-sonlu yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine GPTS derişiminin etkisinin grafiksel değişimi Şekil 6.8’de verilmiştir. Grafik incelendiğinde, % 0.5 (v/v) derişiminde GPTS çözeltisi kullanılarak hazırlanan yüzeylerin kalınlığının 2.55 nm iken % 1.0 (v/v) derişiminde GPTS kullanılarak hazırlanan yüzeylerin kalınlığının 2.49 nm olduğu gözlenmektedir. Artan GPTS derişime bağlı olarak beklenmeyen bir şekilde yüzeylerin kalınlığında bir azalma gözlenmiştir. Buna bağlı

olarak yüzeylere ait su değme açıları ise 52.22°'den 53.56°'ye artış göstermiştir. Literatürdeki benzer çalışmalar incelendiğinde, % 0.5 (v/v) ve daha düşük derişimlerde GPTS çözeltileri kullanılarak hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler için aynı eğilimin gözleendiği belirlenmiştir [174]. Düşük derişimlerin dışında %1 (v/v) ve üzerindeki derişimlerde artan derişim miktarı ile birlikte yüzeylerdeki film kalınlıklarının arttığı gözlenmektedir.



Şekil 6.8. Epoksi-sonlu yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine GPTS derişimi etkisi (Bekletme Süresi: 18 saat)

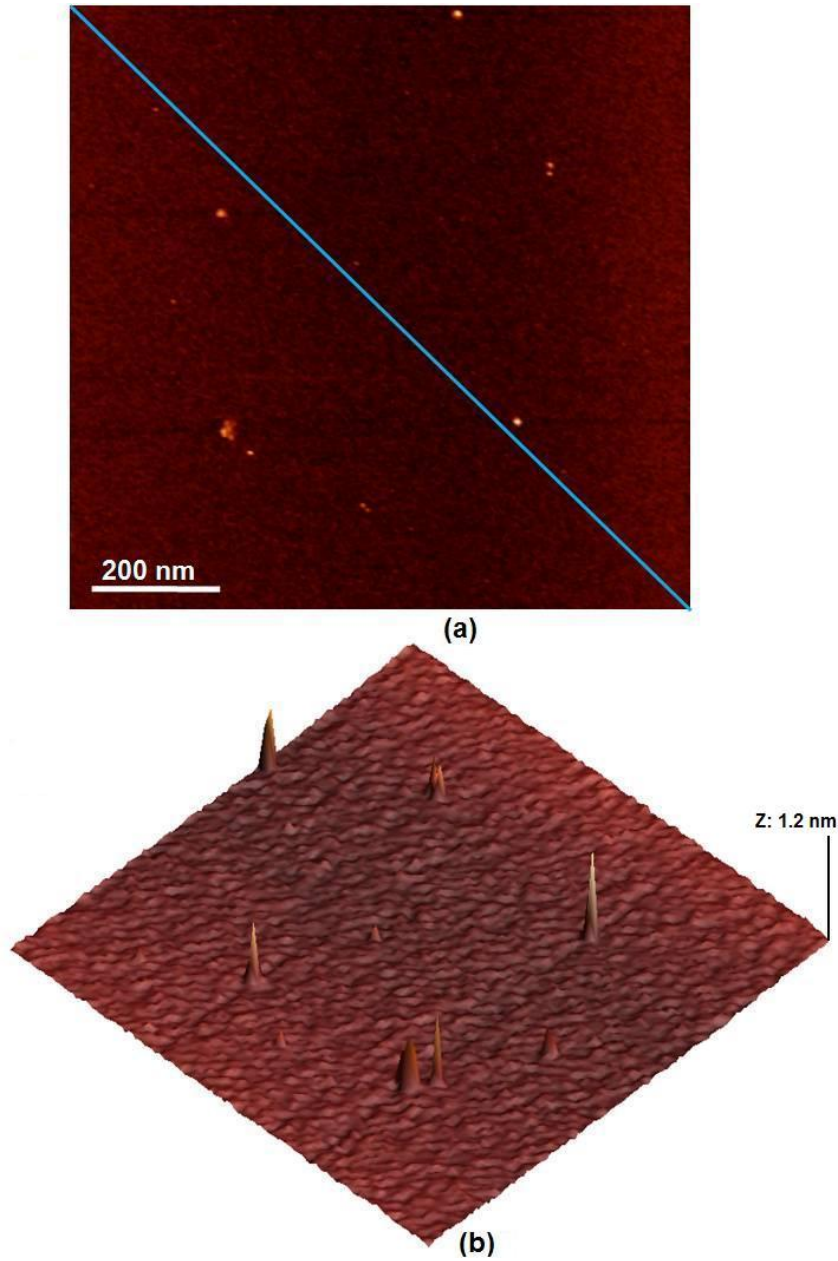
Hazırlanan epoksi-sonlu yüzeylere ait su değme açılarının GPTS derişimine bağlı değışimi incelendiğinde ise, su değme açılarının artan GPTS derişimi ile %1(v/v) GPTS derişiminden sonra neredeyse sabitlendiği ve bir miktar artış gösterdiği görölmektedir. Bu durum yüzeyde artan GPTS derişimine bağlı olarak çok fazla yığınlaşma olmaması şeklinde yorumlanabilir. Elde edilen kalınlık ve su değme açısı ölçümlerine göre farklı derişimlerde hazırlanan GPTS çözeltileri için en uygun düzenlenmenin %1(v/v) GPTS derişimi için olduğu gözlenmektedir. Bu durumda optimum GPTS derişimi %1(v/v) olarak belirlenmiştir. Tsuruk

ve arkadaşları 16 saat bekletme süresinde farklı derişimler kullanarak hazırladıkları GPTS filmleri için en uygun ve düzgün düzenlenmenin %1 (v/v) GPTS derişiminde hazırladıkları filmlerde olduğunu gözlemlemişlerdir [174]. Sonuç olarak, epoksi-sonlu yüzeyler için optimum bekletme süresi 18 saat ve optimum GPTS derişimi %1(v/v) olarak belirlenmiştir.

Yüzey Morfolojisi

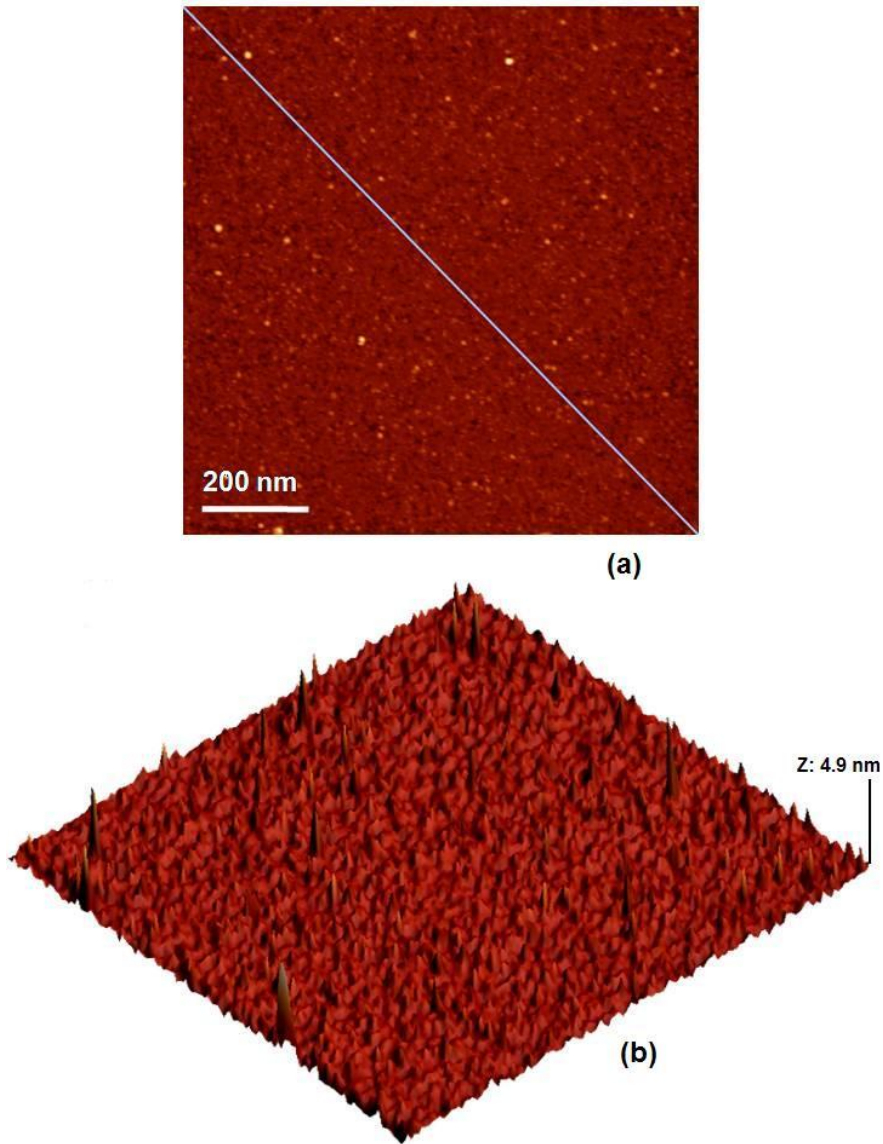
Hazırlanan yüzeylerin morfolojileri Atomik kuvvet Mikroskobu (AFM) kullanılarak belirlenmiştir. AFM, kendiliğinden düzenlenen tekli ve çoklu tabakaların nanoskobik yüzey morfolojilerinin belirlenmesinde kullanılan önemli bir tekniktir. Bu teknikte kuvvete karşı duyarlı bir denge çubuğu tüm numune yüzeyini tarar. Denge çubuğu ile numune arasında bir kuvvet oluşur. Uçta oluşan kuvvet, ucun aşağı ve yukarı hareketi ile sabit tutulur ve bu şekilde yüzey hakkında topografik bilgi elde edilmiş olur [175].

Şekil 6.9'da hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler için, 5 μm x 5 μm boyutlarında alınmış iki boyutlu (A) ve üç boyutlu (B) AFM görüntüleri verilmiştir. Hidroksillenmiş silikon yüzeyler için yüzey pürüzlülüğü (RMS) değeri 0.28 nm olarak bulunmuştur. RMS değeri yüzeyler üzerindeki çukur ve tepeciklere göre hesaplanan ortalama bir değerdir [175]. Yüzeylerin ıslak aşındırma işleminde HF, H₂SO₄ gibi etkinliği yüksek kimyasal maddeler kullanılmıştır. Islak aşındırma işlemi sırasında yüzeylerde kısmen çukurcuklar oluşmuş olabilir. Ayrıca AFM görüntüleri incelendiğinde, yüzeyde çeşitli büyüklükte tepeciklerin olduğu gözlenmektedir. Bu tür yüzey morfolojisi ile ilgisi olmayan tepecikler yüzeylerde atmosferden kaynaklanan organik kirlenmelerden dolayı oluşmuş olabilir [176, 162].



Şekil 6.9. Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler için (a) iki boyutlu, (b) üç boyutlu yüzey morfolojileri (5 μm x 5 μm)

Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyler üzerine optimum hazırlama koşulları belirlenmiş GPTS moleküllerin bağlanması sonucu yüzeylerde oluşan formasyon değişimi Şekil 6.10'da verilen 5 μm x 5 μm boyutlarındaki AFM görüntüleri ile gösterilmiştir. Epoksi-sonlu yüzeylere ait yüzey morfolojileri incelendiğinde, hidroksillenmiş yüzeye göre epoksi-sonlu yüzeylerin düzenlenmesinin oldukça fazla değiştiği gözlenmektedir.



Şekil 6.10. Epoksi-sonlu Si(100) yüzeyler için (a) iki boyutlu, (b) üç boyutlu yüzey morfolojileri (5 μm x 5 μm)

Hidroksillenmiş Si(100) yüzeyleri oldukça düzgün ve pürüzsüz iken bu yüzeyler üzerine GPTS moleküllerinin bağlanması ile yüzeylerdeki pürüzlülüğün oldukça arttığı verilen AFM görüntülerinde açıkça gözlenmektedir. Epoksi-sonlu yüzeylerin RMS değeri 0.42 nm olarak ayrıca yüzeydeki ortalama yükseklik 1.21 nm olarak belirlenmiştir. Tsuruk ve arkadaşları GPTS ile kapladıkları Si(100) yüzeyler için RMS değerini 0.22 nm olarak belirlemişlerdir [153]. Bir başka çalışmada ise, Li ve arkadaşları, indium-kalay oksit (İTO) yüzeyleri üzerine GPTS

moleküllerinin düzenlenmesi sonucu aldıkları AFM ölçümlerinde RMS değerini 0.85 nm olarak belirlemişlerdir [177]. Buna sonuçlara göre Si(100) yüzeyler üzerine GPTS moleküllerinin tek tabakalı ve sıkı istiflenmiş bir şekilde düzenlendikleri söylenebilir.

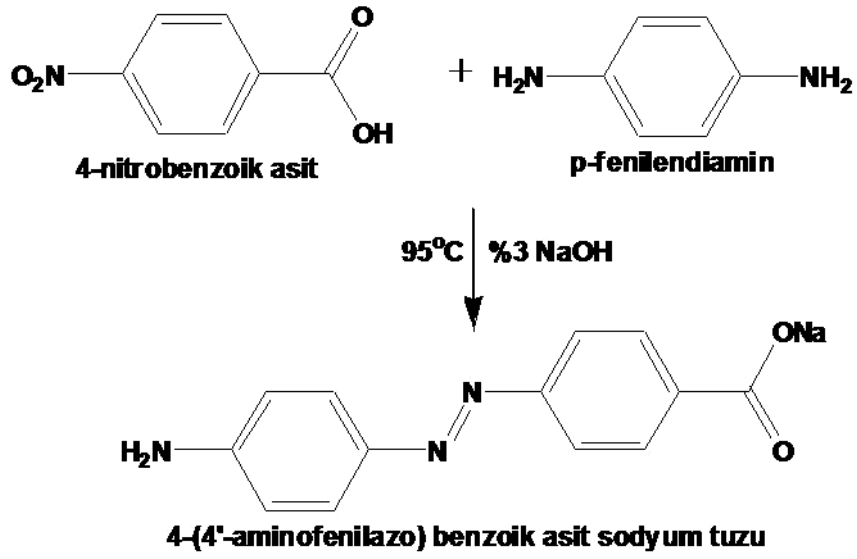
6.3. Işık kontrollü Yüzeylerin Hazırlanması

Işık kontrollü DNA çip, ışık-duyarlı bileşik 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) molekülü kullanılarak hazırlanmıştır. APABA azobenzen türevi bir bileşiktir. Hazırlanan DNA çip içerisindeki görevi hibridizasyonun ışık ile kontrolünde yardımcı akıllı molekül olarak kullanılmaktadır.

6.3.1. Işık-duyarlı 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA)

bileşiğinin sentezi ve karakterizasyonu

Azobenzen türevi bir bileşik olan ışık-duyarlı 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) bileşiği yapısında, $-NH_2$ ve $-COOH$ olmak üzere iki farklı özellikteki aktif fonksiyonel gruplara sahiptir. Bu nedenle diğer azobenzen moleküllerinden farklı ve özel bir yöntem olan *Schündehtte* metodu kullanılarak (Şekil 6.11) sentezlenmiştir [151]. APABA molekülü, 16.7 g (0.1 mol) 4-Nitrobenzoik asit ve 20.0 g (0.18 mol) p-fenilendiamin 500 mL %3'lük NaOH çözeltisi içerisinde geri soğutucu altında 95°C sıcaklıkta 12 saatlik reaksiyonu sonucunda elde edilmiştir. Bu reaksiyon sonucunda oda sıcaklığına soğutulan karışım, 16.5 g (% 68 verimde) kırmızı-turuncu renkli APABA bileşiği elde edilmiştir.

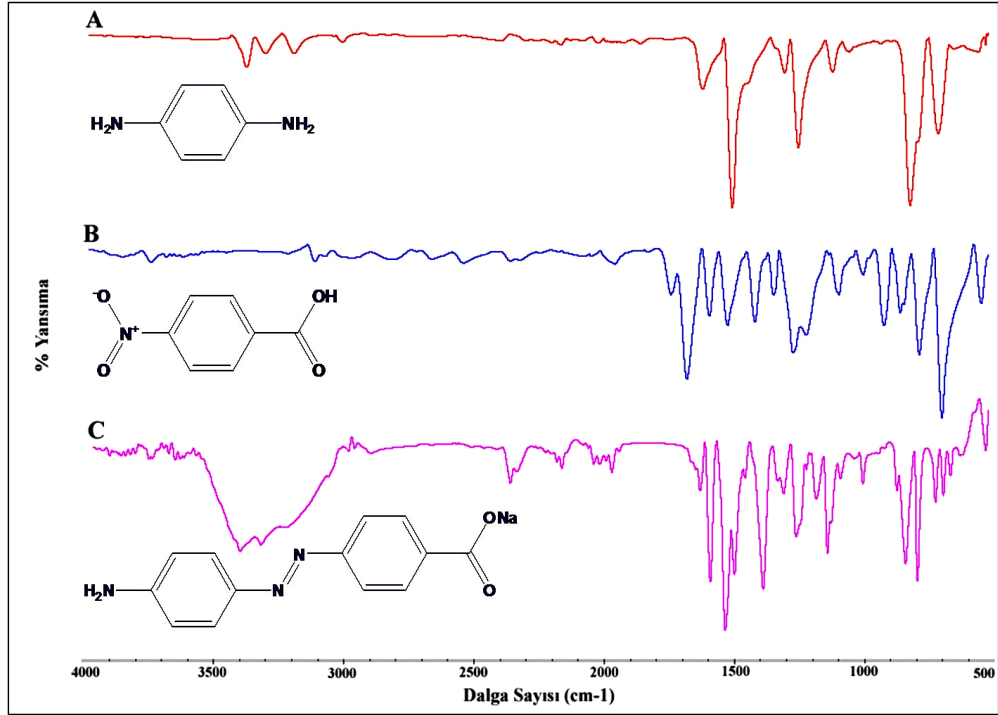


Şekil 6.11. Işık-duyarlı 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit bileşiğinin sentezinin şematik gösterimi

Yapı ve fonksiyonel grup analizi

Sentezlenen 4-(4'-aminofenilazo) benzoik asit molekülünün yapı ve fonksiyonel grup analizi ATR-FTIR, $^1\text{H-NMR}$ ve LC-MS teknikleri ile gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen ışık-duyarlı APABA molekülünün ve çıkış maddelerinin ATR-FTIR spektrumları toplu olarak Şekil 6.12'te görülmektedir. APABA bileşiğinin karakteristik bantlarını daha iyi yorumlayabilmek amacı ile çıkış bileşikleri olan p-fenilendiamin ve 4-nitrobenzoik asit için de spektrumlar alınmış ve yapılarındaki karakteristik bantlar APABA bileşiğine ait bantlarla karşılaştırılmıştır. Çizelge 6.3'da spektrumda görülen ve molekülün beklendiği şekilde oluştuğunu gösteren özellikli bantlar verilmiştir [178].



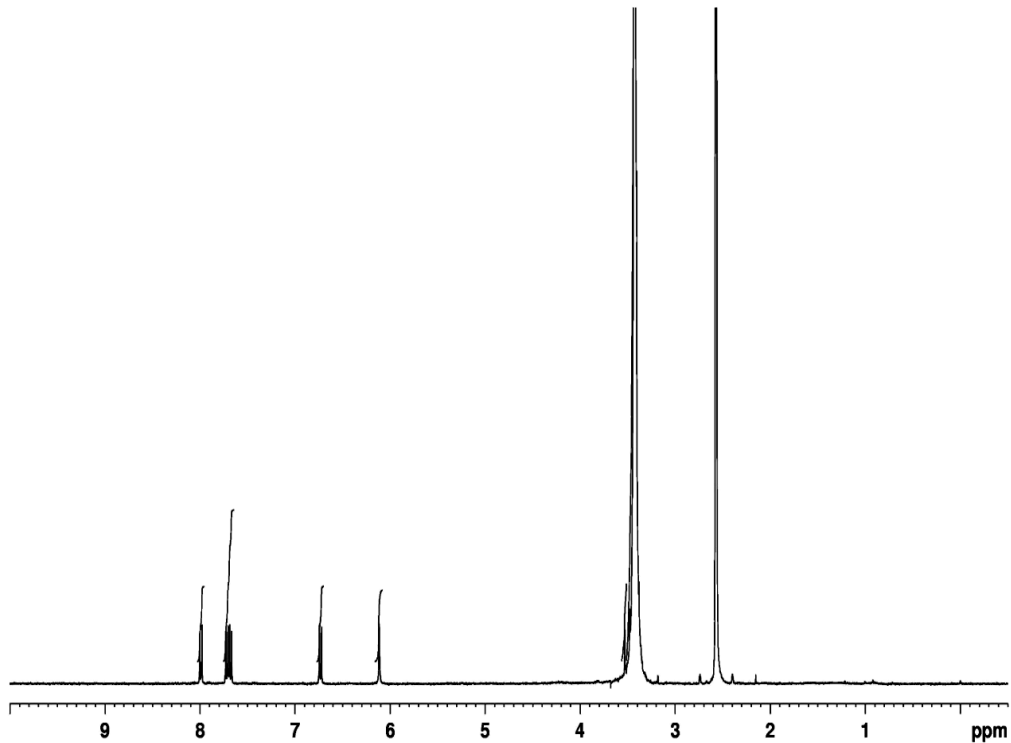
Şekil 6.12. ATR-FTIR Spektrumu (a) p-Fenilendiamin, (b) 4-Nitrobenzoik asit, (c) 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu (APABA)

Çizelge 6.3. 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu molekülündeki fonksiyonel gruplara ait titreşim frekansları

Dalga Sayısı (cm ⁻¹)	Fonksiyonel Grup
3400-3000	-OH gerilme ve -NH ₂
1420	-N=N- gerilme) aromatik halkaya bağlı)
1602	-COO gerilmesi
1635	C=O gerilmesi
750	Düzlem içi halka deformasyonu (azobenzen)
850	-CH düzlem dışı deformasyon (p-disübstitüe benzen)
640-750	Düzlem dışı halka deformasyonu (azobenzen)
1580,1500	Aromatik halka (azobenzen)

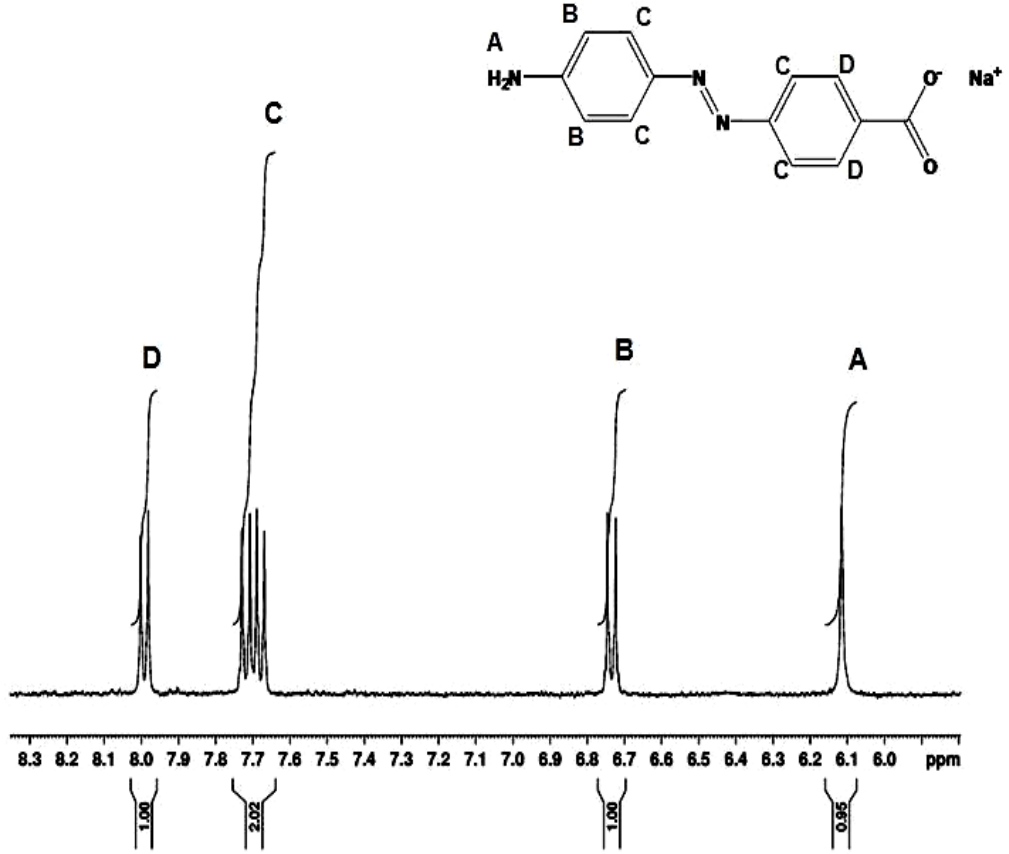
Şekil 6.12’de çıkış bileşikleri ve ışık-duyarlı APABA bileşiğine ait ATR-FTIR spektrumu toplu bir şekilde verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde APABA bileşiğinin çıkış bileşiklerine göre oldukça farklı olduğu gözlenmektedir. Işık-duyarlı APABA bileşiğine ait spektrum (C) incelendiğinde; 1630 cm^{-1} ’de asit tuzu halinde buluna karbonil grubuna ait C=O gerilme bandı, 1450 cm^{-1} ’de azo bileşiklerine ait spesifik bir band olan zayıf şiddetteki --N=N-- gerilme bandı ve $3000\text{--}3400\text{ cm}^{-1}$ ’de ise --NH_2 grubuna ait ikiye yarılmış --NH gerilmeleri açık bir şekilde görülmektedir. Spektrum ve çizelgedeki fonksiyonel gruplara ait titreşim frekanslarından ışık-duyarlı APABA molekülünün sentezinin başarılı bir şekilde gerçekleştiği söylenebilir.

Sentezlenen APABA bileşiğine ait d-DMSO içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumu Şekil 6.13 ’de verilmiştir.



Şekil 6.13. (4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu (APABA) bileşiğine ait d-DMSO içerisinde alınan ^1H -NMR spektrumu

APABA bileşiğinin d-DMSO içerisindeki ^1H -NMR spektrumu incelendiğinde, çözücü olarak kullanılan d-DMSO ve içerdiği suya ait olan pikler 2.5 ve 3.3 ppm'de sırasıyla gözlenmektedir. Spektrum toplu olarak incelendiğinde, 8-12 ppm dolaylarında çıkması gereken asidik protonu bu aralıkta gözlenmemiştir. Bu durum bileşiğin sodyum tuzu olarak bulunduğunu açıklamaktadır [179]. APABA bileşiğinin yapısındaki protonlar 6-8 ppm arasında bulunduğundan ^1H -NMR spektrumunda bu bölge yapının daha ayrıntılı açıklanabilmesi için genişletilerek incelenmiş ve ilgili spektrum Şekil 6.14'de verilmiştir.



Şekil 6.14. (4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu (APABA) bileşiğine ait d-DMSO içerisinde alınan 6-8 ppm bölgesi için genişletiliş ^1H -NMR spektrumu

Çizelge 6.4. 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit sodyum tuzu molekülünün ^1H -NMR kimyasal kayma değerleri

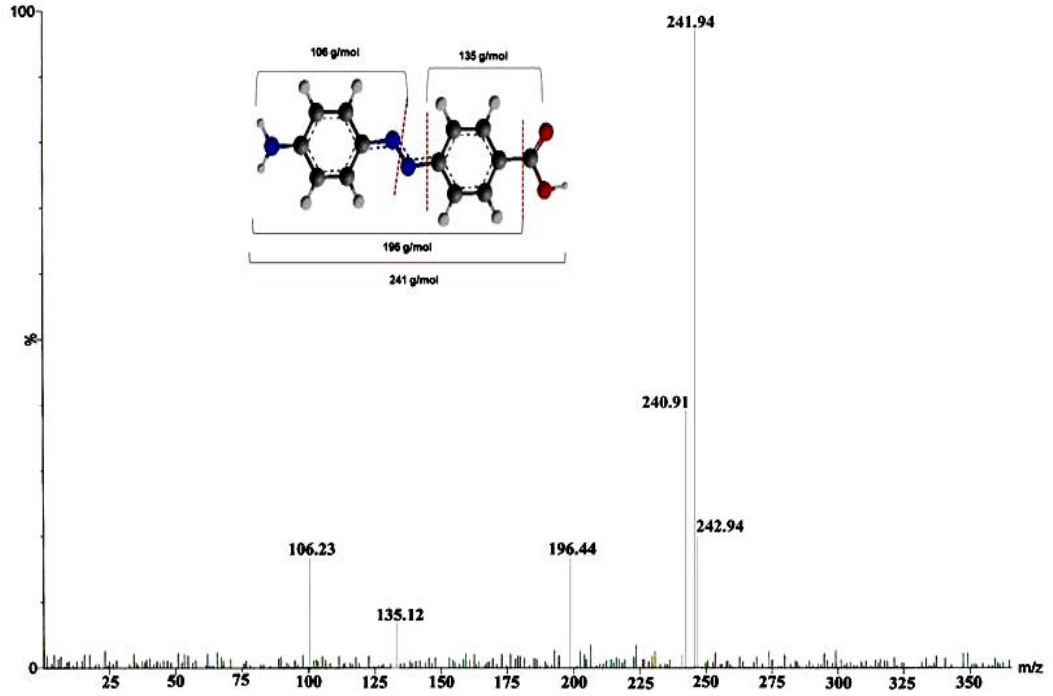
Kimyasal Kayma (δ ppm)	C atomu
7.98 (d)	D
7.68-7.74 (d)	C
7.68-7.74 (d)	C
6.73 (d)	B
6.12(s)	A

Sodyum tuzu olarak buluna APABA bileşiğinin yapısında toplam 10 tane proton bulunmaktadır. Spektrumda rahatlıkla gözlenebilen bu protonlar eş protonlar olarak ayrılmış ve ilgili protonların kayma değerleri Çizelge 6.4'de toplu olarak verilmiştir.

Fenil halkalarına ait aril protonlar beklendiği gibi 7.7 ppm civarında iki tane ikili pik olarak çıkmıştır. Halkadaki $-\text{NH}_2$ grubuna yakın olan protonlar azot atomunun elektron verici özelliğinden dolayı daha düşük kimyasal kaymaya sahiptir ve 6.7-6.8 ppm civarında ikili pik olarak çıkmıştır. Diğer halkadaki asit ucuna yakın olan halka protonları ise karbonil grubunun elektron çekici özelliği nedeniyle daha fazla kimyasal kaymaya sahiptir ve 7.98-8.0 aralığında ikili pik olarak çıkmaktadır. $-\text{NH}_2$ grubu eş protonları yarılmadan beklenildiği gibi halkaya bağlı olduğu için yaklaşık 6.12 ppm aralığında çıkmıştır. Sonuç olarak, ışık-duyarlı APABA molekülünün, oldukça saf bir şekilde sentezlendiği spektrumdan açık şekilde görülmektedir.

APABA bileşiği için alınan kütle spektrumu Şekil 6.15'de verilmektedir. Bileşik sentezden hemen sonra sodyum tuzu halinde çökmektedir. Kütle spektrumu alınmadan önce bileşik tuzu halinden asidik forma

dönüştürülmüş ve DMSO içerisinde çözülerek LC-MS spektrumu alınmıştır.



Şekil 6.15. (4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) bileşiğine ait sıvı kromatografisi kütle spektrumu (LC-MS)

APABA bileşiğinin teorik molekül kütlesi 241 g/mol olarak hesaplanmıştır. Kütle spektrumu incelendiğinde 240.91 m/z'de gözlenen pik bileşiğin molekül kütlesine aittir. Bileşiğin olası parçalanmaları şematik olarak spektrumdan elde edilen verilere dayanarak aydınlatılmaya çalışılmıştır. Işık-duyarlı APABA bileşik için moleküler iyon piki $(M+1)^+(m/z)$ 241.94 m/z ve önemli parçalanma pikleri 106.23 m/z; 135.12 m/z ve 196.44 m/z olarak spektrumda görülmektedir.

APABA molekülünün fotoizomerizasyon davranışı

APABA azobenzen türevi olan organik bir bileşiktir. Bütün organik bileşikler elektronik olarak uyarılabilir. Çok sayıdaki araştırmalar bir bileşiğin renkli olması için konjuge çift bağ içermesi gerektiğini

göstermiştir. Ayrıca konjuge çift bağın yanı sıra N, S gibi heteroatom içeren organik bileşiklerde çiftleşmemiş elektronların da uyarılması sonucu $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine ek olarak $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri gözlenmektedir. Bunun yanında bileşikteki elektron delokalizasyonu yapının düzlemselliğine paralel bir şekilde artmaktadır. Dolayısıyla elektronların uyarılması sonucu orbitaller arasındaki geçişi ($\pi \rightarrow \pi^*$, $n \rightarrow \pi^*$ gibi) kolaylaşır ve bu durum bu tür bileşiklerin UV Spektrofotometresi kullanılarak *trans-cis* fotoisomerizasyonunun araştırılmasına olanak sağlamaktadır [178-180].

APABA ışığa duyarlı bir bileşiktir ve *trans* durumda iken sterik engel *cis* duruma göre daha azdır. Bu durumda bileşiğin *cis* durumda uyarılması *trans* duruma göre daha zor olacağından uyarılma dalga boyu düşük dalga boyuna kayar ve daha düşük şiddette soğurma yapar. Bu sonuç APABA bileşiğinin 366 nm UV altında *cis*, 450 nm ışık altında *trans* durumda olmasını açıklamaktadır [181]. APABA molekülü, yaklaşık 366 nm UV ile uyarıldığında *trans* durumdan *cis* duruma geçiş yapmaktadır. Fotoizomerizasyon tersinir olduğu için, *cis* duruma getirilmiş olan bu molekül 450 nm ışık ile (görünür) uyarıldığında ise tekrar *trans* konuma dönmektedir. *Trans* konumda daha kararlı olan APABA bileşiği 450 nm ışık ile uyarmanın yanı sıra karanlıkta belli bir süre bekletilmesi de aynı sonucu vererek molekülün *trans* konuma geçmesini sağlamaktadır. Işık-duyarlı APABA bileşiğinin DMSO içerisinde 20 μ M'lık çözeltisi hazırlanmış ve çözelti ortamında yapılan ışınlamalar ile fotoisomerizasyon özellikleri incelenmiştir.

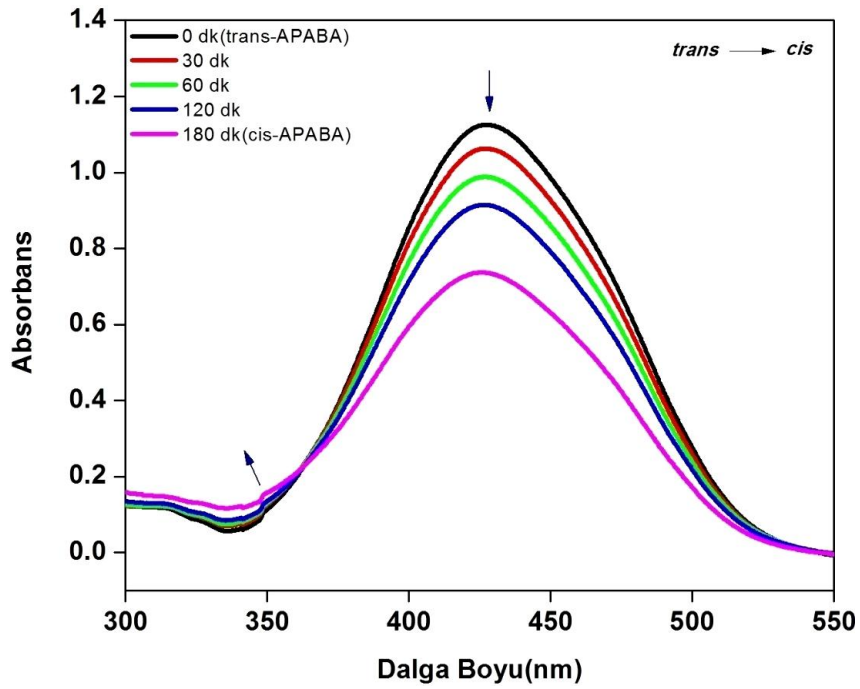
Trans $\rightarrow$ cis isomerizasyonu

APABA bileşiğine ait *trans-cis* isomerizasyonunu incelenebilmesi amacı ile DMSO içerisinde hazırlanan 20 μ M'lık APABA çözeltisi 450 nm ışık altın 1 saat süreyle ışınlanmış ve çözelti içerisinde bulunabilecek *cis*-APABA moleküllerinin hepsinin *trans* konuma geçmesi sağlanmıştır.

Çünkü azobenzen türevi moleküller görünür bölgede çözelti ortamında % 89 oranında *trans* haldedir [181]. Daha sonra hazırlanan APABA çözeltisi 366 nm UV altında çeşitli zaman aralıklarında ışınlanmış ve değişimin izlenmesi için 435 nm'de uyarılarak UV spektrumları alınmıştır (Şekil 6.16).

APABA bileşiği yapısında birbirlerine göre *para*- konumda bulunan farklı özelliklerde fonksiyonel uç gruplara sahiptir. Bu durum adsorpsiyon özelliklerini tipik *trans* azobenzen türevi bileşiklere kıyasla önemli bir şekilde değiştirmektedir. Şekil 6.16'da verilen *trans* APABA (0 dak) UV spektrumu incelendiğinde, tipik *trans* azobenzen bileşiklerinden farklı olarak 360 nm civarında gözlenmesi gereken $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi kırmızıya kayarak 420 nm'de gözlenmektedir. Bununla birlikte spektrumdan izlenebileceği gibi $n \rightarrow \pi^*$ geçişi ise her iki isomerizasyon durumu için $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi ile çakışarak 420 nm civarında gözlenmektedir. Literatürde yapılan benzer çalışmalarda bu tip farklı özelliklerde fonksiyonel gruplara sahip azobenzen türü bileşiklerde $n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin üst üste çakışabildiği belirlenmiştir [182,183].

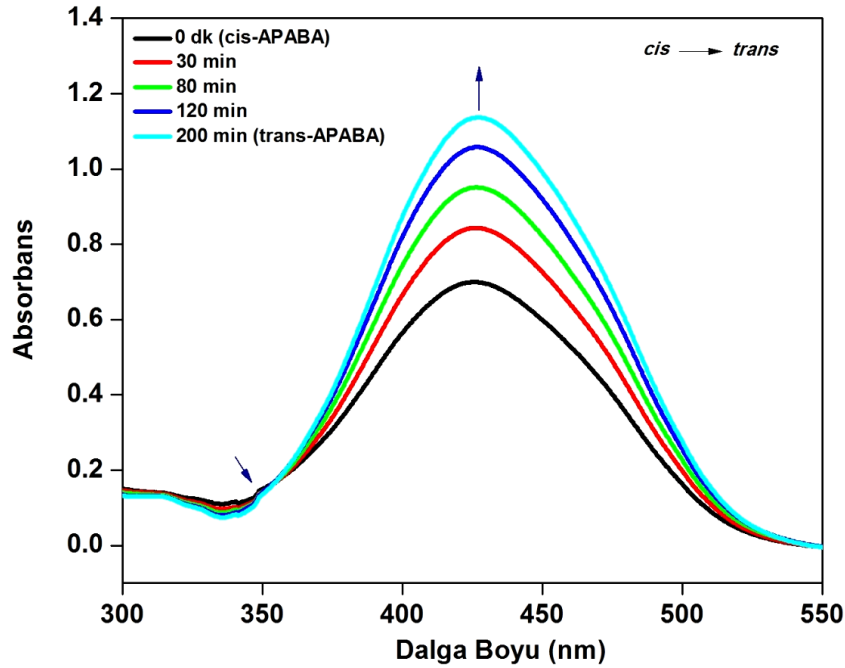
APABA bileşiğinin *trans* konumdan *cis* konuma geçişinin 366 nm UV ışık altında ışınlama zamanına bağlı değişiminin incelenmesi sırasında örnekler 30 dak ile 180 dak arasında ışınlanmıştır (Şekil 6.16). Her bir ışınlama sonucu UV spektrumları alınmıştır. Spektrumlar üst üste çakıştırıldığında ışınlama zamanına bağlı olarak 420 nm'de $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş bandının azaldığı gözlenmiştir. Bu moleküllerin *trans*- konumdan *cis*-duruma geçmesi sonucu oluşan sterik engele bağlı olarak daha düşük dalga boyundaki uyarılmanın artışı şeklinde yorumlanabilmektedir. 180 dak'lık ışınlamadan sonra spektrum bozulmuştur. Sonuç olarak, kullanılan ışık kaynağının gücüne bağlı olarak *trans-cis* dönüşümü için optimum ışınlama süresi 180 dak. olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.16. APABA bileşiğinin DMSO içerisinde hazırlanan 20 μ M'lık çözeltisinin 366 nm UV ışık altına ışınlanması sonucu zamanla değişen *trans*→*cis* isomerizasyonuna ait UV Spektrumu

Cis → trans isomerizasyonu

Fotoizomerizasyon geri dönüşümlü bir olaydır. Bu amaçla, *trans* konumdan *cis* konuma döndürülmüş APABA moleküllerinin tekrar *trans* hale döndürülmesi amacıyla 450 nm ışık altında zamanla ışınlanmış ve eski hallerine geri dönüş süresi incelenmiştir (Şekil 6.17).



Şekil 6.17. APABA bileşiğinin DMSO içerisinde hazırlanan 20 μ M'lık çözeltisinin 450 nm ışık altına ışınlanması sonucu zamanla değişen *cis*→*trans* isomerizasyonuna ait UV Spektrumu

Şekil 6.17 incelendiğinde, 450 nm ışık altında zamanla ışınlanan örneklerin 420 nm'de $\pi \rightarrow \pi^*$ geçiş bandının şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Aynı zamanda ısısal olarak da *trans* halde daha kararlı olan APABA molekülleri 200 dak. içerisinde geri eski hallerine yani *cis* durumdan *trans* duruma geri dönmüşlerdir. *Cis-trans* dönüşümü ilgili spektrumlar incelendiğinde, *cis-trans* izomerizasyonunun daha uzun sürede gerçekleştiği gözlenmektedir.

UV spektroskopisi sonuçlarında izlenebileceği gibi isomerizasyonlar uzun sürelerde gerçekleşmektedir. Işık kaynağında bulunan 100 watt civa lambasının gücü APABA molekülünü tam olarak uyarmada yeteri kadar etkin olamamış ve bu sebeple fotoizomerizasyonu dakika mertebesinde gözlememize neden olmuş olabilir. Daha güçlü ışık kaynakları kullanıldığında bu geçişler birkaç saniye gibi çok kısa zamanlar içinde tamamlanmaktadır [179]. Bunun yanında, kullanılan lamba, 360 nm'deki ışımayı geçirmekle birlikte, bu dalgaboyuna yakın dalgaboyundaki

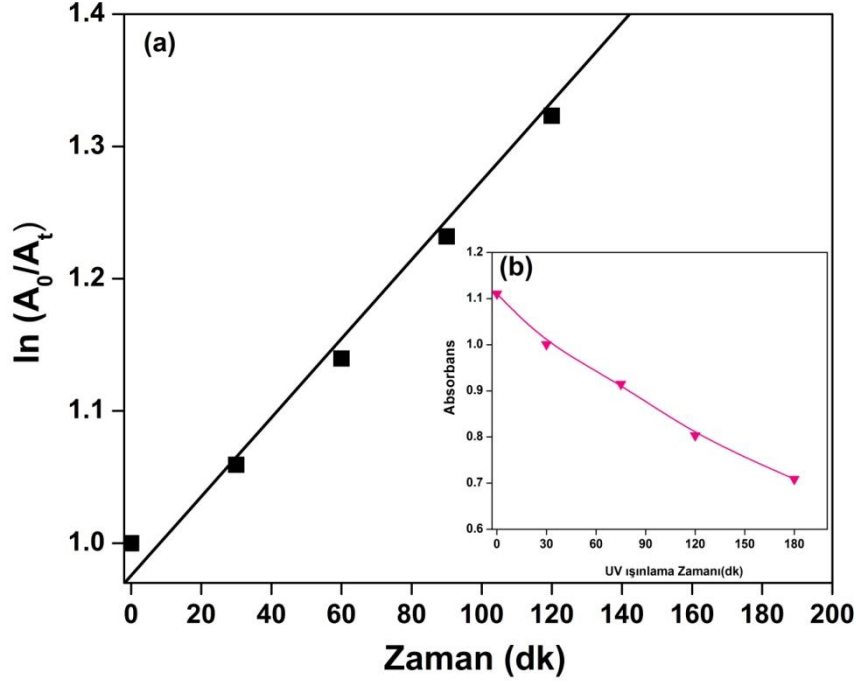
ışımalarla da izin verdiği için, fotoizomerizasyonu zorlaştırmıştır. Burada kullanılması gereken, UV ışığının geçişine izin veren bir filtredir. Fotoizomerizasyonun düşük hızda gerçekleşmesinin nedenlerinden biri de bu olabilir. Junge ve ark. (1997), azobenzenin merkezde bulunduğu dendrimer sentezlemişler ve kloroform içerisinde 60 s'de fotoizomerizasyonun tamamlandığını gözlemişlerdir. Bunun yanında moleküle ait *trans* piki 360 nm'de ortaya çıkarken, 450 nm'de görünen *cis* izomerin, oda sıcaklığında 3 saat sonunda *trans* izomere dönüştüğü gözlenmiştir [184]. Bir diğer çalışmada ise çok yüksek basınçta bir Hg lambası kullanıldığında fotoizomerizasyon saniyeler içerisinde tamamlanmıştır [185]. Horie ve ark. (2004), 420 nm'de pik veren *trans* izomeri oda sıcaklığında 1 saat süre ile uyarma sonucunda *cis* izomere dönüştürmüşlerdir [186]. Bobrovsky ve ark. (2001) yaptığı bir diğer çalışmada ise, azobenzen içeren kopolimerlerin fotoizomerizasyonu, yüksek basınçlı Hg lambası ile incelenmiş ve 30 dak içerisinde tamamlandığı gözlenmiştir [187]. Bu sonuçlar ve yapılan literatür çalışmalarından da görülebileceği gibi kullanılan ışık kaynağına göre, izomerizasyon zamanının belirgin bir şekilde değiştiği gözlenmektedir.

Azobenzen molekülündeki *trans-cis* ve *cis-trans* izomerizasyon reaksiyonları, zamana bağımlı ve belli bir hıza sahip, birinci dereceden reaksiyonlardır [188-190]. APABA bileşiği için *trans-cis* dönüşümüne ait UV spektrumundaki ışınlama zamanına bağlı absorbans değerleri kullanılarak izomerizasyon kinetiği Eşitlik 6.1 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$\ln\left(\frac{A_0}{A_t}\right) = kt \quad (6.1)$$

Eş. 6.1'de verilen A_0 değeri $t=0$ anındaki ışınlanmadan önceki *trans*-APABA bileşiğinin absorbans değeri, anında A_t değeri ışınlama sırasında herhangi bir t anındaki absorbans değeridir. *Trans-cis* izomerizasyonu için

elde edilen kinetik verilerden Şekil 6.18 (a)'de verilen izomerizasyon kinetiği grafiği elde edilmiştir.



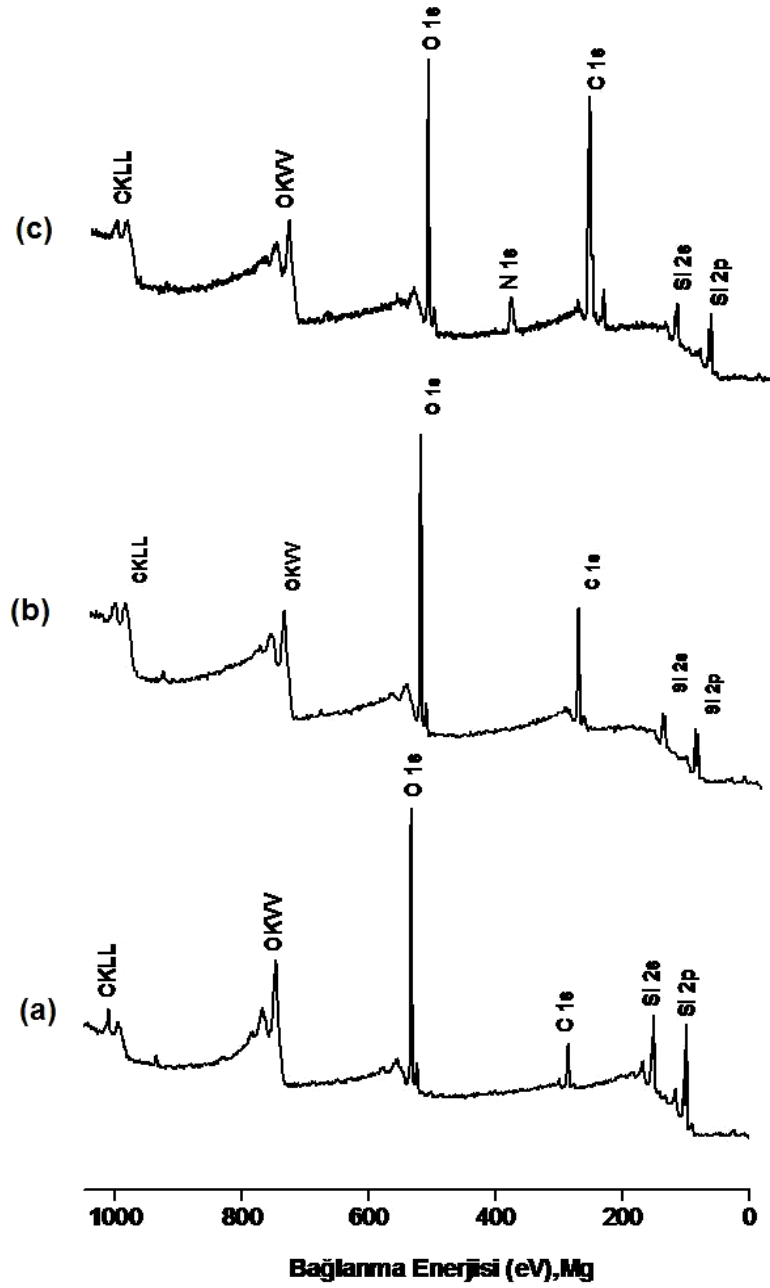
Şekil 6.18. Fotoizomerizasyon kinetiği; (a) APABA bileşiğinin *trans-cis* izomerizasyonunun birinci derece reaksiyon kinetiği eğrisi, (b) APABA bileşiğinin absorbans değerlerinin UV ışınlama zamanla değişimi

Işık-duyarlı APABA bileşiği için UV ışınlama zamanına göre $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişindeki absorbans değerleri değişimi Şekil 6.18(b)'de verilmektedir. Bu değerler kullanılarak elde hesaplanan izomerizasyon kinetiği verileri ise Şekil 6.18(a)'d gösterilmektedir. Görüldüğü gibi APABA bileşiğinin *trans-cis* isomerizasyonu birinci dereceden bir tepkime kinetiği göstermektedir. Grafikten elde edilen ve izomerizasyona ait hız sabitini veren doğrunun eğimi $2.44 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır. Bobrovsky ve arkadaşları azobenzen içeren polimer için yaptıkları çalışma sonucunda, *trans-cis* izomerizasyonunda reaksiyon hız sabitini $2.99 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ ($1.79 \times 10^{-1} \text{ dak}^{-1}$) olarak hesaplamıştır [187].

6.3.2. Işık kontrollü yüzeylerin kimyasal bileşimi

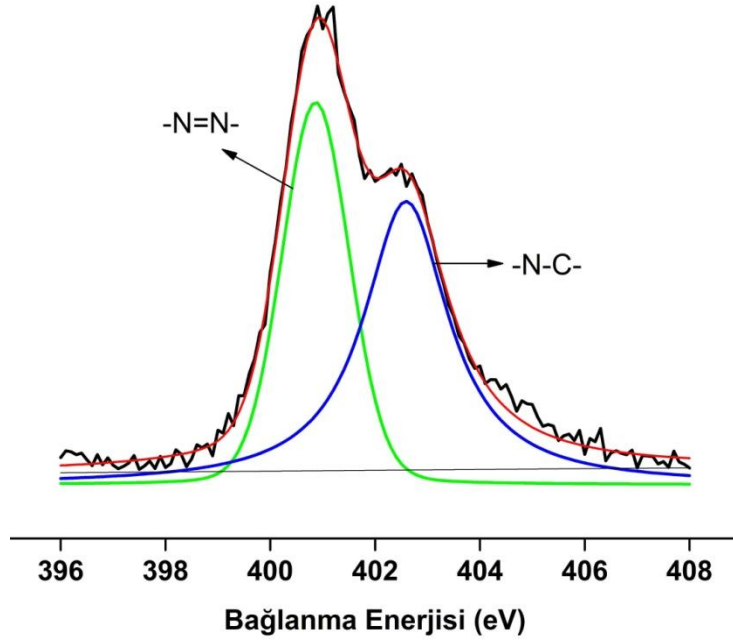
Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanması için, APABA molekülü $-NH_2$ fonksiyonel grubu yardımıyla epoksi-sonlu yüzeylere kovalent olarak bağlanmıştır. Öncelikle hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin kimyasal karakterizasyonu X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ölçümleri alınarak aydınlatılmıştır. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için düşük ayırmalı XPS spektrumu Şekil 6.19'da verilmiştir. Düşük ayırmalı bu XPS spektrumu incelendiğinde, Şekil 6.19 (A) temizlenerek aktifleştirilmiş SiOH yüzeylerine ait iken Şekil 6.19 (B) bu temizlenmiş silikon yüzeyler üzerine GPTS moleküllerinin bağlanmasıyla oluşturulan epoksi-sonlu yüzeylere aittir. Şekil 6.19 (C) ise epoksi-sonlu yüzeylerin üzerine APABA moleküllerinin bağlanması ile oluşturulan ışık kontrollü yüzeylerin düşük ayırmalı XPS spektrumudur. Daha önceki bölümlerde temiz silikon ve GPTS bağlı yüzeylerin XPS spektrumu yorumları verilmiştir. Işık kontrollü yüzeylere ait XPS spektrumu incelendiğinde, hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin yapılarında bulunan Si 2p, Si 2s, C 1s, N 1s ve O 1s elementlerine ait bağlanma enerjilerinin sırayla 103 eV, 285 eV, 401 eV ve 535 eV değerlerinde olmak üzere literatür değerleriyle uyumlu oldukları görülmektedir [191].

Işık duyarlı APABA moleküllerinin bağlanmasıyla oluşturulan ışık kontrollü yüzeylere ait XPS spektrumu incelendiğinde (Şekil 6.19 C), APABA molekülünün bağlanması ile yüzeydeki C 1s pikinin artışı net bir şekilde görülmektedir. Ayrıca spektrumda gözlenen N1s piki yüzeye APABA moleküllerinin bağlandığının en açık kanıtıdır. Işık kontrollü yüzeylerde N 1s piki sadece APABA molekülünden kaynaklandığı için şiddeti düşük olarak gözlenmektedir [191].



Şekil 6.19. Işık kontrollü sonlu silikon yüzeylerin düşük ayırmalı XPS spektrumu, (a)Si-OH, (b)GPTS-Si, (c) APABA-GPTS-Si

Işık-duyarlı APABA molekülünün yapısında farklı elektronik çevresi olan iki ayrı N atomu ve dört farklı elektronik çevreye sahip C atomu bulunmaktadır. Şekil 6.20'de farklı elektronik çevreye sahip N 1s atomuna ait yüksek ayırmalı fit edilmiş XPS spektrumları verilmiştir.

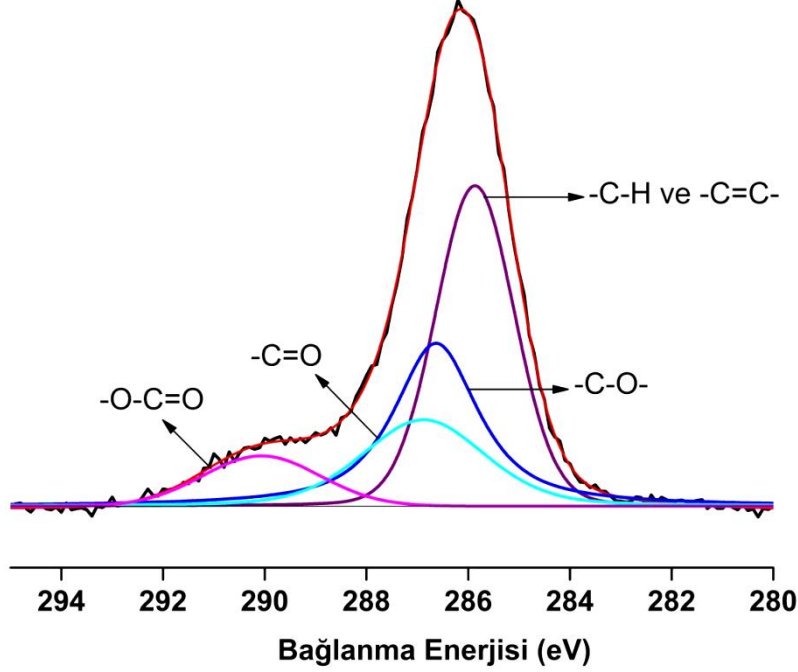


Şekil 6.20. Işık kontrollü yüzeylerin N 1s pikine ait yüksek ayırmalı XPS spektrumu

Şekil 6.20 incelendiğinde; iki farklı elektronik çevreye ait N atomları için; N1s pikinin fit edilmesi sonucu 400.8 eV değerinde % 57 bağıl oranında -N=N- piki, 402.5 eV değerinde ise % 43 bağıl oranında -N-C- piki gözlenmektedir. Bu sonuçlar APABA-modifiye yüzeylerdeki teorik N atomu oranı ile uyumlu olduğu söylenebilmektedir. Zhang ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada N 1s atomuna ait, N=N pikinin bağlanma enerjisini 399.3 eV olarak bağıl oranını ise % 67 olarak bulurken, N-C pikinin ise 402.1 eV'da % 33 bağıl oranda olduğunu belirtmişlerdir [191].

APABA moleküllerinin epoksi-sonlu yüzeyler üzerine bağlanması ile hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için Şekil 6.19 (C)'de verilen düşük ayırmalı XPS spektrumu incelendiğinde, yüzeylerdeki C 1s atomunun ortamdaki artışı gözlenebilmektedir. Bu artış APABA moleküllerinin GPTS bağlı yüzeyler üzerine bağlanması sonucu yüzeydeki farklı elektronik çevreye sahip karbon atomlarının artışı ile yorumlanabilir. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerde dört farklı elektronik çevreye sahip C 1s atomu

bulunmaktadır. Bu farklı elektronik çevreye sahip C 1s atomlarının varlığı Şekil 6.21’de verilen yüksek yoğunluklu XPS spektrumunda gösterilmektedir.



Şekil 6.21. Işık kontrollü yüzeyler için C 1s piklerinin yüksek ayırmalı XPS spektrumu

Işık kontrollü yüzeyler için C 1s atomlarına ait yüksek yoğunluklu XPS spektrumu incelendiğinde (Şekil 6.21); 285.8 eV’da % 43 bağıl oranında aromatik ve alifatik $-C-C-$ ve $-C=C-$; 287.0 eV’da % 29 bağıl oranında $C-O-$; 286.4 eV’da % 19 bağıl oranında $-C=O-$ ve 289.8 eV’da % 9 bağıl oranında $-O-C=O-$ olmak üzere elektronik çevresi farklı dört farklı karbon atomlarına ait pik gözlenmiştir. Koberstein ve arkadaşları benzer yapıda bir molekül kullanarak ışık-duyarlı bir yüzey hazırlamışlar ve yüzeyin kimyasal karakterizasyonu için aldıkları XPS spektrumunda, 288.7 eV’da $-O-C=O$; 286,8 eV’da $-C=O-$; 285.7 eV’da; $-C-O-$ ve 284.6 eV’da ise aromatik ve alifatik karbonlar olmak üzere dört ayrı C 1s atomunun varlığını tespit etmiştir [192].

Bu yüzeylere ait kimyasal analiz sonuçlara göre, epoksi sonlu yüzeyler üzerine ışık-duyarlı APABA moleküllerinin bağlanmasıyla ışık kontrollü yüzeylerin başarıyla hazırlandığı söylenebilir.

6.3.3. Işık kontrollü yüzeyler için optimum hazırlama şartlarının belirlenmesi

Hazırlanan epoksi-sonlu yüzeylerin üzerine ışık-duyarlı APABA molekülünün kovalent olarak bağlanması basamağı için üç önemli parametre incelenmiştir;

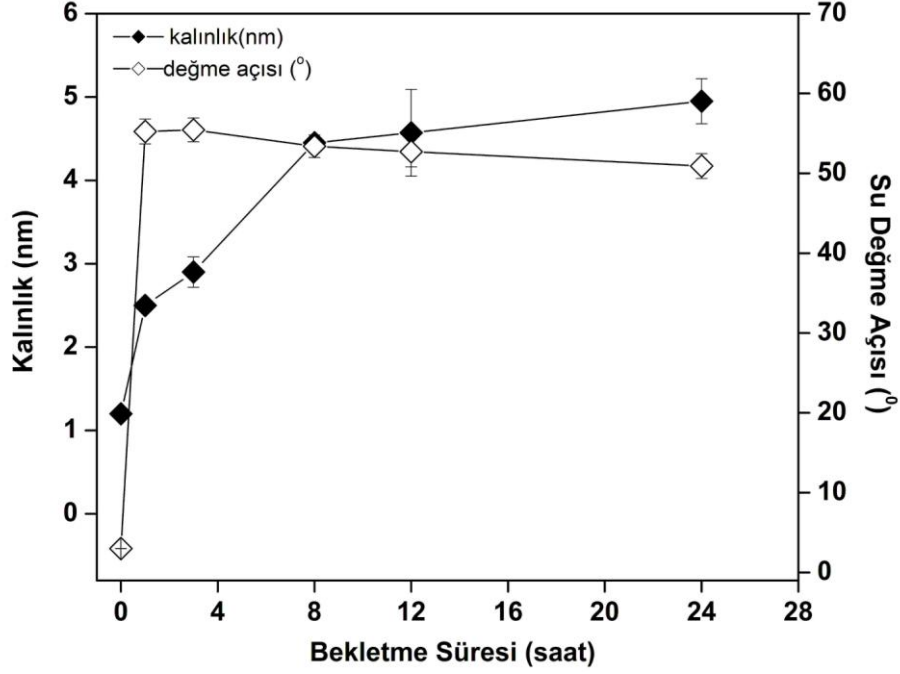
- (i) Belirli derişimdeki APABA çözeltisi içerisinde bekleme süresi etkisi,
- (ii) Optimum bekletme süresi belirlenmiş yüzeyler üzerine APABA çözeltisi için derişim etkisi,
- (iii) Optimum derişimi ve bekletme süresi belirlenmiş malzeme için sıcaklık etkisidir.

Bekletme süresi etkisi

Işık-duyarlı azobenzen türevi moleküller için literatürde yapılan çalışmalar göz önüne alınarak hazırlanan sistem için optimum hazırlama şartları belirlenmeye çalışılmıştır [193,194]. Bu amaçla hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler DMSO içerisinde hazırlanan 20 mM APABA çözeltisine 1, 3, 8, 12, ve 24 saatlik bekletme sürelerinde daldırılarak yüzeyde oluşan değişimler elipsometrik kalınlıkları ve su değme açıları ölçülerek belirlenmeye çalışılmıştır.

Şekil 6.22’de APABA çözeltisi içerisinde bekletilen yüzeylerdeki kalınlık ve su değme açısı değişimleri grafiksel olarak verilmektedir. İlgili grafik incelendiğinde 1 saat bekletme sonucu yüzeylerde çok fazla bir düzenlenme değişimi gözlenmezken 24 saat sonunda yüzeylerin

elipsometrik kalınlığı GPTS bağlı yüzeyle göre 2.4 nm'den 4.9 nm'e artış göstermiştir.



Şekil 6.22. Işık kontrollü elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine bekletme etkisi (APABA Derişimi: 20 mM APABA)

Yapılan teorik çalışmalar sonucunda APABA molekülünün teorik boyu yaklaşık 2.5 nm civarında olduğu düşünüldüğünde yüzeyle APABA moleküllerinin kovalent olarak bağlandığı söylenebilmektedir. Bununla birlikte su değme açısı ölçümleri 55.24° den 50.92°'ye değişmekte yani yüzeyin hidrofilik karakteri artmaktadır. Bu hidrofilik karakterin artışı APABA moleküllerinin epoksi sonlu yüzeylerin üzerine bağlanması ile yüzeydeki epoksi halkalarının yerini APABA molekülündeki karboksilik asit gruplarının alması olarak yorumlanabilir. Kobestein ve arkadaşları altın yüzeyi üzerine fotolitografik yöntemle hazırladıkları asit sonlu yüzeyleri için su değme açısını 28° olarak belirlemişlerdir [192]. Bu alışma kapsamında ise görünür bölgede APABA moleküllerinin *trans* halde bulunması ile hazırlanan asit uç gruplu yüzeyler için en düşük değme açısı 50.92° olarak belirlenmiştir. Bunun nedeni, kullandığımız

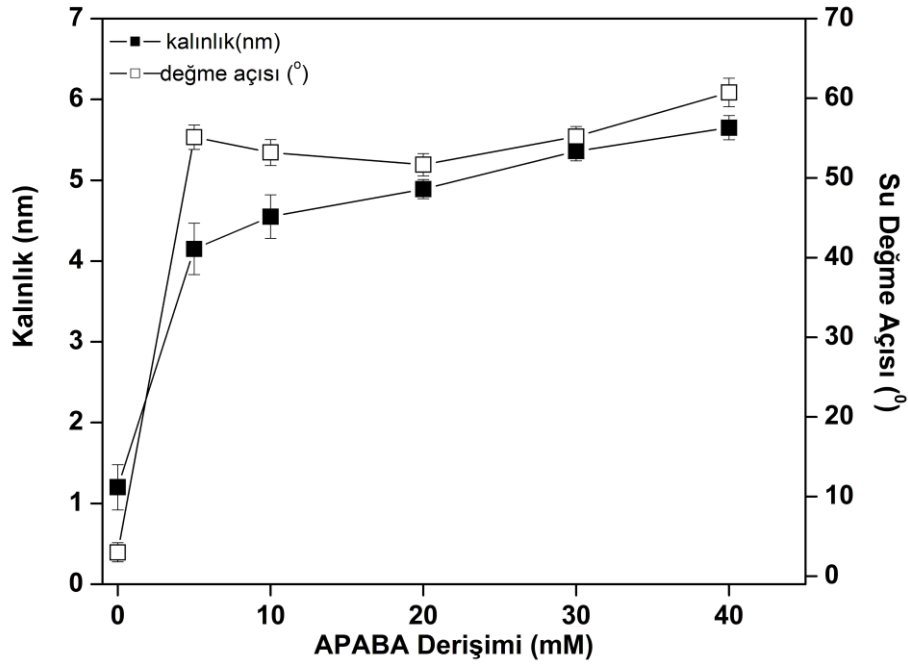
kendiliğinden düzenlenme yönteme bağlı olarak epoksi-sonlu yüzeyler üzerine APABA moleküllerinin az bağlanması ve yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak su değme açısı değerinin beklenenden daha fazla çıkması olarak yorumlanabilir. APABA moleküllerinin epoksi-sonlu yüzeyler üzerine az bağlanması bu çalışma için istenen bir durumdur. Çünkü APABA moleküllerinin *trans-cis* izomerizasyonu ile ışık kontrollü bir DNA çip hazırlanması amaçlanmaktadır. Bu nedenle sık istiflenmiş APABA bağlanması sorun oluşturabileceği düşünülmektedir. Bu sonuçlara göre, ışık kontrollü yüzeyler için yapılan bekletme süresi etkisi çalışması sonucu yüzeylerin kalınlık ve özellikle su değme açısı ölçümlerindeki değişimler sonucuna 24 saatlik bekletme süresinin optimum değer olduğuna karar verilmiştir.

APABA derişimi etkisi

Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında bir diğer önemli faktör ise APABA derişimi etkisidir. Yüzeylerde düzgün bir düzenlenmenin oluşması DNA sensör olarak kullanılmak istenen yüzeyler için oldukça önemlidir. Bu amaçla DMSO içerisinde 5, 10, 20, 30 ve 40 mM APABA çözeltileri hazırlanmış ve 24 saat bu çözeltiler içerisinde daldırılmıştır. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylere APABA derişimi etkisi yüzeylerin elipsometrik kalınlıklarının ve su değme açılarının değişimi ile aydınlatılmış ve en optimum hazırlama şartları belirlenmiştir. Şekil 6.23’de hazırlanan yüzeylerin elipsometrik kalınlıklarının ve su değme açılarının değişimleri grafiksel olarak verilmiştir.

İlgili grafik incelendiğinde, APABA derişiminin 5 mM’den 40 mM’e değişimiyle yüzeylerin elipsometrik kalınlıkları 4.15 nm’den 5.5 nm’ye değişirken su değme açıları ise 54.19°’den 63.56°’ye değişmektedir. Görüldüğü gibi 20 mM APABA derişiminden yüksek derişimlerde yüzeylerin kalınlıkları ve su değme açıları dikkate değer biçimde yükselmektedir. 30 ve 40 mM APABA çözeltileri kullanılarak hazırlanan

yüzeylerdeki hızlı kalınlık artışının nedeni istenmeyen bağlanmaların ve/veya yüzeyde moleküllerin kümeleşmeleri bir sonucu şeklinde yorumlanabilir. Bu istenmeyen fiziksel bağlanmalardan dolayı yüzeyde oluşan pürüzlülük su değme açılarının hızlı bir şekilde artmasına sebep olmuş olabilir.



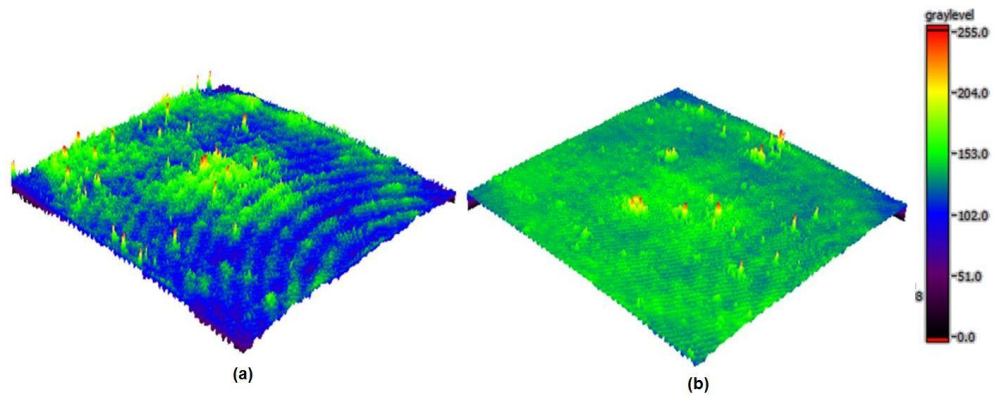
Şekil 6.23. Işık kontrollü yüzeylerin elipsometrik kalınlık ve su değme açısı üzerine APABA derişimi etkisi. (Bekletme Süresi: 24 saat)

APABA derişimi 5 mM'dan 20 mM'a değışirken yüzeylerin kalınlıkları yavaş bir şekilde artarken yüzeylerdeki su değme açılarında bir düşüş gözlenmektedir. 20 mM APABA kullanılarak hazırlanan yüzeyler için bağıl kalınlık 4.89 nm iken su değme açısı 51.67° olarak belirlenmiştir. Daha önce de belirtildiği gibi APABA bağıl yüzeylerin teorik boyu yaklaşık 2.5 nm'dir. Işık kontrollü yüzeylere ait elipsometrik kalınlık ölçümleri 1.2 nm kalınlığındaki hidroksillenmiş silikon yüzeyine göre bağıl olarak 4.89 nm olarak ölçülmüştür. Bu durumda 20 mM APABA kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeyin kalınlığının en uygun kalınlık olduğu belirlenmiştir. Oda sıcaklığı olarak kabul edilen 22°C'da yapılan derişim ve bekletme

sürelerine bağlı optimizasyon çalışmaları sonucunda, optimum APABA derişimi 20 mM ve optimum bekletme süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

Ortam sıcaklığı etkisi

Optimum bekletme süresi ve APABA derişimi belirlenmiş ışık kontrollü yüzeyler için hazırlama sıcaklığı etkisi çalışılmıştır. Bilindiği gibi APABA molekülü $-NH_2$ ve $-COOH$ olmak üzere 2 farklı aktif fonksiyonel gruba sahiptir. Epoksi-sonlu yüzeyler üzerine APABA molekülünün bağlanmasında daha aktif olan grubun $-NH_2$ uç grubu olduğu proje kapsamında grubumuz tarafından yapılan teorik çalışmalar ile belirlenmiştir. Bu reaksiyonun 20 mM APABA derişiminde 24 saat bekletme süresinde $22^\circ C$ hazırlama sıcaklığında rahatlıkla gerçekleştiği belirlenmiştir. Reaksiyon sırasındaki ortam sıcaklığı etkisi ile bağlanma miktarının nasıl değiştiğinin belirlenmesi amacıyla ortam sıcaklığı etkisi çalışılmıştır. Bu kapsamda deneyler $22^\circ C$ ve $50^\circ C$ ortam sıcaklığı sağlanarak yapılmış ve yüzeylerdeki düzenlenme değişimi kalınlık değişimine bağlı 3D-elipsometrik görüntüleri ve su değme açısı ölçümleri ile aydınlatılmıştır.



Şekil 6.24. (a) $22^\circ C$, (b) $50^\circ C$ sıcaklıklarda hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin elipsometrik 3-D görüntüleri

Şekil 6.24 incelendiğinde, ışık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında 22°C’da yapılan bağlanmalarda 50°C’deki bağlanmalara karşı yüzeydeki molekül dağılımının daha fazla olduğu ve belli noktalarda yığılaşmalar olmadan bağlandıkları gözlenmiştir. Bu noktadan hareketle yüzeyler üzerindeki düzenlenmeyi daha iyi anlayabilmek için elipsometrik kalınlıkları ve su değme açısı ölçümleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

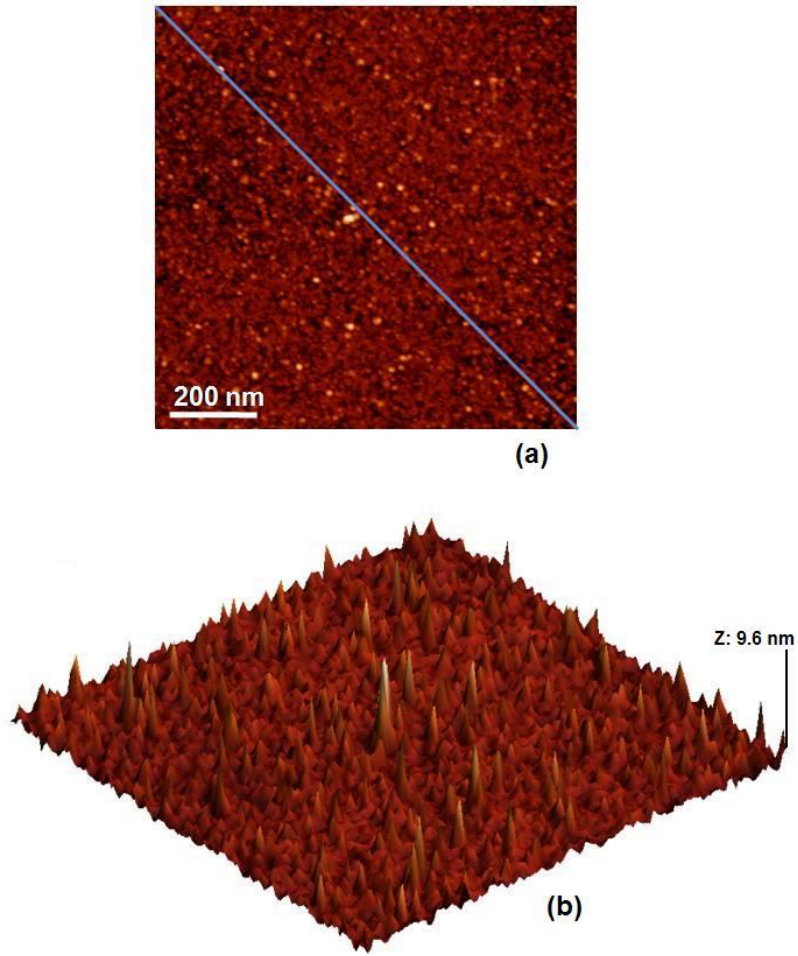
Çizelge 6.5. Farklı sıcaklıklarda hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin elipsometrik kalınlıkları ve su değme açıları

Işık kontrollü Yüzeyler	Elipsometrik Kalınlık (nm)	Su değme Açısı (°)
22 °C / 24 h	4.78 ± 0.021	50.9 ± 0.122
50 °C / 24 h	5.97 ± 0.020	74.6 ± 1.231

Çizelge 6.5 incelendiğinde, çalışılan her iki sıcaklıkta çok fazla kalınlık farkı görülmemesine rağmen su değme açılarında oldukça büyük bir fark görülmektedir. Bu fark 50°C’da APABA moleküllerinin kendi aralarında fiziksel etkileşimler ile yüzeyler üzerinde yığın şeklinde bağlanmasının bir sonucu olabilir. Bu adacıkların oluşumunu elipsometrik 3-D görüntülerinden de rahatlıkla görülebilmektedir. Sonuç olarak ışık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında, epoksi-sonlu yüzeylerin DMSO içerisinde hazırlanan 20 mM’lık APABA çözeltisinin içerisinde 22°C’da 24 saat bekletilmesi optimum şartlar olarak belirlenmiştir.

Işık kontrollü yüzeylerin morfolojisi

Işık kontrollü malzemelerin yüzey morfolojilerinin incelenebilmesi amacıyla Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) görüntüleri alınmıştır. Hazırlanan bu ışık kontrollü yüzeylere ait 5 µm x5 µm boyutlarında 2-boyutlu ve 3-boyutlu AFM görüntüleri Şekil 6.25’de verilmiştir.



Şekil 6.25. APABA bağlı Si(100) yüzeyleri için (a) 2- boyutlu AFM görüntüleri, (b) 3-boyutlu AFM görüntüleri (5 μm x5 μm)

Epoksi-sonlu yüzeylerin üzerine ışık-duyarlı APABA moleküllerinin bağlanması sonucu yüzey morfolojisindeki değişim Şekil 6.25'de 2-boyutlu ve 3-boyutlu AFM görüntüleri ile gösterilmektedir. APABA moleküllerinin bağlanması sonucu yüzey pürüzlülük değeri (RMS) 0.840 nm ve yüzeylerdeki ortalama yükseklik 2.8 nm olarak belirlenmiştir. 2-boyutlu AFM görüntüsü incelendiğinde yüzeyde yükseltelerin arttığı açık renkli noktacıkların artışı ile gözlenmektedir. Açık renkli düzenlenmeler yüzeydeki daha yüksek olan noktaları temsil etmektedir. Yüzeyde gözlenen bu değişiklik APABA moleküllerinin epoksi-sonlu yüzeylere bağlanmasının bir sonucu olarak açıklanabilir. 3-boyutlu AFM görüntüsü

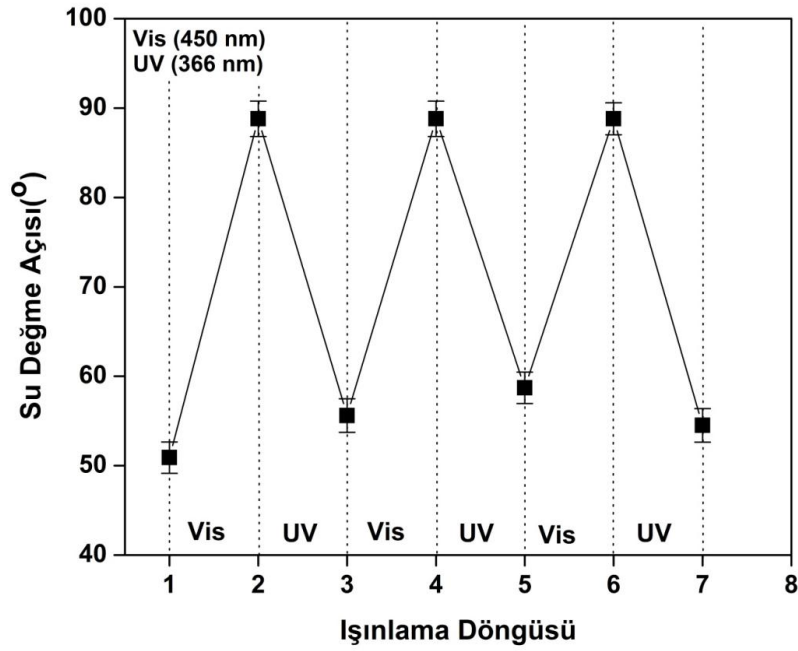
incelendiğinde ise yüzeyde APABA moleküllerinin bağlanmasıyla oluşan morfoloji değişimi belirgin bir biçimde gözlenebilmektedir.

6.4. Işık kontrollü Yüzeylerin Fotoizomerizasyon Özellikleri

6.4.1. Foto-tekrarlanabilirlik çalışması

Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin fotoisomerizasyon özellikleri değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Öncelikle hazırlanan yüzeylerin *trans-cis* fotoizomerizasyonunda yüzey üzerindeki düzenlenmenin değişimi su değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Işık kontrollü yüzeyler üzerindeki APABA molekülleri görünür bölgede daha kararlı oldukları *trans* halde bulunmaktadır. *Trans*-APABA moleküllerinin yüzeydeki düzenlenmesinde daha önce teorik ve deneysel çalışmalarla da desteklendiği gibi asit uç grubu açıkta kalmaktadır. Bu durumda yüzeyin formasyonu polar yapıdadır ve su değme açısı 50.9° olarak belirlenmiştir. UV ışık altında ışınlığında *trans* APABA molekülleri *cis*-APABA haline dönmektedir. Bu durumda teorik çalışmalarda da gösterildiği gibi polar asit uç grubu yüzeye doğru bükülmekte ve $-N=N-$ bağı yüzeye doğru yönelmektedir. APABA *cis* hale döndüğünde yüzey çift bağı varlığından dolayı oldukça hidrofobik hale gelecektir. Sonuç olarak yüzeyin su değme açısının büyümesi beklenmektedir. Literatürdeki bu tür çalışmalar incelendiğinde azo bileşikleri *cis*- hale geldiklerinde alınan su değme açılarının 88° civarında çıktığı belirlenmiştir [180]. Işık kontrollü yüzeyler UV ışık altında ışınlıklarında, görünür bölgede *trans* halde bulunan APABA moleküllerinden kaynaklanan 50.9° olan su değme açısı, APABA moleküllerinin *cis* hale dönmesiyle 89.9° 'ye olarak değişmektedir. Bu durumda yüzeyin *cis* formu için su değme açısı 89.9° olarak belirlenmiştir.

Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin tekrarlanabilirlik çalışması için yüzeyler *trans*→*cis*→*trans* geçişi gösterecek şekilde ışınlanmış ve her bir ışınlamadan sonra su değme açıları alınarak yüzeyin tekrar kullanılabilirlikteki güvenilirliği araştırılmıştır.



Şekil 6.26. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyleri için ışınlamaya bağlı *trans*→*cis*→*trans* döngüsüne ait su değme açısı ölçümleri

Hazırlanan yüzeylerin ışınlamaya bağlı fotoizomerizasyon döngüsü incelendiğinde (Şekil 6.26), yüzeylerin oldukça iyi bir tekrarlanabilirlik döngüsüne sahip oldukları görülmektedir. Bu sonuç hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin DNA çip çalışması için çoklu kullanıma uygun olduğunun bir göstergesi olarak yorumlanabilir.

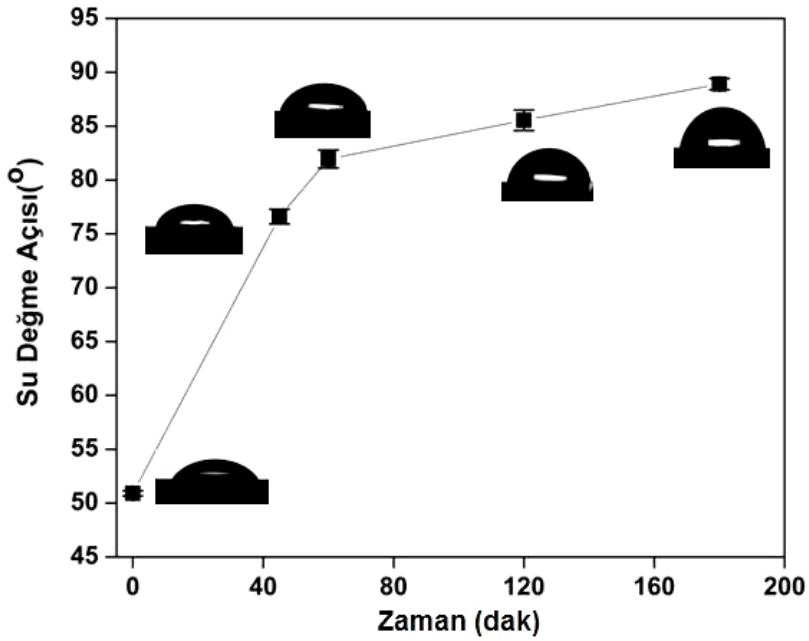
6.4.2. Işık-duyarlı yüzeylerin ışınlama zamanına bağlı fotoizomerizasyon özellikleri

Işık kontrollü yüzeylerin gösterdikleri fotoizomerizasyon özellikleri zamana bağlı ışınlanma çalışması yapılarak incelenmiştir. Hazırlanan yüzeyler farklı dalga boylarında ışındıklarında yüzeyler üzerindeki APABA molekülünün gösterdiği konformasyon değişimine bağlı olarak yüzeylerin hidrofobik/hidrofilik karakteri değişecektir. Bu sebeple, ışık kontrollü yüzeylerin farklı zamanlarda görünür bölge (450 nm) ve UV (366nm) ışık altında gösterdikleri izomerizasyon değişimleri yüzeylerin su değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir.

Işık kontrollü yüzeylerdeki trans-cis İzomerizasyonu

Işık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında kullanılan azobenzen türevi bir bileşik olan APABA molekülleri daha önce de bahsedildiği gibi görünür bölgede çözelti ortamında % 89 oranında *trans* konumda bulunmaktadır [181]. Bu nedenle hazırlanan yüzeyler öncelikle *trans* konumda olmayan APABA molekülü kalmaması amacıyla 1 saat 450 nm ışık altında ışınlanmış ve hemen yüzeyin üç farklı yerinden su değme açıları alınmıştır. Bu durumda yüzeyden elde edilen ortalama su değme açısı 50.9° olarak belirlenmiştir. Daha sonra *trans*-APABA molekülleri bağlı yüzeyler *cis*- duruma dönmesi için belli zaman aralıklarında 366 nm UV ışık altında ışınlanmış ve her bir ışınlama için su değme açısı ölçümleri alınmıştır.

Trans-cis izomerizasyonunun izlendiği yüzeylerin su değme açılarının 366 nm UV ışık altında farklı zamanlarda ışınlanmalarına bağlı değişimi Şekil 6.27'de verilmiştir. Şekil 6.27 incelendiğinde, zamana bağlı olarak 366 nm UV ışık altında ışınlanan yüzeylerin su değme açıları 50.9° ile 89.9° arasında değişen açılara sahiptir. Bu sonuç, *trans*-APABA bağlı yüzeylerdeki polar gruplar olan asit uç gruplarının molekülün *cis* hale dönmesiyle birlikte aşağı doğru bükülmesi sonucu yüzeyin hidrofobikliğinin artması şeklinde yorumlanabilmektedir.

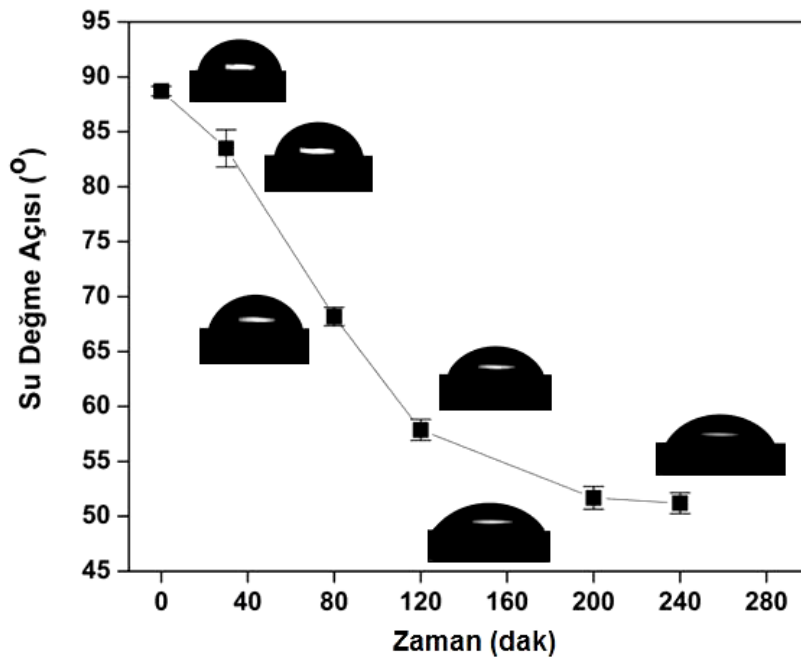


Şekil 6.27. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için ışınlamaya bağlı trans→cis değişimine ait su değme açısı ölçümleri

Şekil 6.27’de verilen grafik incelendiğinde, 366 nm UV ışık kullanılarak yapılan ışınlama işleminde ışınlama süresi arttıkça yüzeylere ait su değme açıları 120. dakikaya kadar hızlı bir şekilde artmaktadır. Işınlama süresi 120. dakikadan 180. dakikaya ulaştığında su değme açısı en yüksek değerine ulaşmaktadır. Ayrıca 120-180 dakika arasında su değme açısının artış hızı azalmış ve 120. dakikada 85° civarında olan değer 180. dakikada 89.9° değerine ulaşmıştır. Literatürde azobenzen türevi bileşiklerin kullanılmasıyla hazırlanan malzemelerdeki ışık-duyarlı moleküllerin *cis* forma döndüklerinde yüzeyin su değme açısının 88° civarında çıktığı belirlenmiştir [181]. Bu sonuç APABA molekülleri kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin 180 dakika sonunda *cis*-forma ulaştıkları şeklinde yorumlanabilmektedir.

Azobenzenlerin en ilginç özelliği hızlı, yeterli ve tam anlamıyla tersinir foto-izomerizasyon gösterebilmeleridir [185]. Azobenzen tipi moleküllerin *trans* ve *cis* halleri arasında belirgin bir enerji farkı olmasına rağmen

azobenzenlerin *cis* halde kalma süreleri çok uzun değildir. Yapılan araştırmalar, daha kullanışlı malzeme üretmek için ışık-duyarlı molekülün her iki halde de yeterli sürede kalmalarını sağlamayı amaçlamaktadır. Bu konuda yapılan literatür çalışmalarına göre ışık-duyarlı moleküllerin *cis*→*trans* dönüşümünün molekülün kullanılan yerine göre çok farklı zaman skalalarında değiştiği görülmektedir [195-198]. APABA moleküllerinin *trans* konumdan *cis* konuma dönüş süresinin incelenebilmesi amacıyla öncelikle yüzeyler karanlıkta bir gece boyunca bekletilmiş ve ilk önce bu durumdaki su değme açıları alınmıştır. Bu durumdaki yüzeyler için alınan su değme açısı 88.2° olarak belirlenmiştir. Görüldüğü gibi bir gece karanlıkta bekletilen yüzeyler için su değme açısı 89.9° 'den 88.7° 'ye çok küçük bir azalma ile değişmiştir. Daha sonra yüzeyler farklı zamanlarda 450 nm ışık ile ışınlanmış ve değişimler su değme açısı ölçümleri ile değişimleri izlenmiştir.



Şekil 6.28. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için ışınlamaya bağlı *cis*→*trans* değişimine ait su değme açısı ölçümleri

Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için ışınlamaya bağlı *cis*→*trans* değişimine ait su değme açısı ölçümleri incelendiğinde *cis* halde iken

88.7° olan su değme açısı ilk 120 dakika boyunca hızla azalırken, 120. dakikada su değme açısı 57.8° olarak belirlenmiştir. 120 ile 200 dakika arasındaki ışınlamalarda ise su değme açısı 57.8°'den 51.7°'ye azalmıştır. Görüldüğü gibi su değme açılarındaki değişim giderek azalmaktadır. 240. dakikada ise su değme açısı sadece 0.5° değişerek 51.2° değerine ulaşmıştır. İlgili grafikten de anlaşılacağı gibi ışık kontrollü yüzeyler üzerindeki APABA moleküllerinin 450 nm' de ışınlanmalarıyla *cis* durumdan *trans* duruma geçmesi sonucu yapılarındaki polar asit uç gruplarının tekrar açık duruma dönmesinden dolayı yüzeyler tekrar hidrofilik karakter kazanmıştır.

6.4.3. Işık kontrollü yüzeylerin farklı sıvılarla alınan değme açısı ölçümleri ile yüzey formasyonunun incelenmesi

Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin sıvı-yüzey etkileşiminin üzerine sıvıların özelliklerinin incelenmesi amacıyla, farklı sıvılar kullanılarak yüzeylerin hem görünür bölgede (450 nm) hem de UV ışık (366 nm) ile ışınlandıkları durumları için ileri (θ_{ileri}) ve geri değme açısı (θ_{geri}) ölçümleri alınmıştır. Değme açısı ölçümleri daha önce teorik bilgiler kısmında anlatıldığı gibi yüzeylerin oluşumunun belirlenmesinde önemli bir yere sahiptir. Kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yöntemi ile hazırlanan heterojen ve pürüzlü yüzeylerde kullanılan sıvıya ait damla temas ettiği yüzey boyunca farklı değme açıları gösterir. Bu yüzden maksimum ve minimum değerleri veren sırasıyla ileri (θ_{adv}) ve geri (θ_{rec}) değme açıları arasındaki fark değme açısı karmaşası olarak tanımlanan histerizi olarak adlandırılır [199-203].

Işık kontrollü yüzeyler için farklı sıvılar ile alınan ileri ve geri yönlü değme açıları, Eş. 6.2 ve Eş. 6.3 yardımıyla değme açısı değişimi ($\Delta\theta_{s(c)}$) ve *trans* konum için histerizinin ($\Delta\theta_h$) hesaplamasında kullanılmıştır [193,200].

$$\Delta\theta_s = \theta_{ileri}^{trans} - \theta_{ileri}^{cis} \quad (6.2)$$

$$\Delta\theta_h^{trans} = \theta_{ileri}^{trans} - \theta_{geri}^{trans} \quad (6.3)$$

Eş. 6.2’de verilen θ_{ileri}^{trans} ; APABA moleküllerinin *trans* konumda olduğu yüzeylere ait ileri yönlü değme açısı iken θ_{ileri}^{cis} ; 366 nm UV ile ışınlanarak APABA moleküllerinin *cis* konuma döndürüldüğü yüzeylerin ileri yönlü değme açısıdır. Bu iki açı değeri arasındaki fark hazırlanan yüzeylerin *trans* ve *cis* konum için kullanılan sıvılara bağlı değişiminin bir ölçüsüdür. Hazırlanan yüzeylere ait değme açısı değişimi yüzeylerin *trans* (açık) ve *cis* (kapalı) konumları için yüzeylerin hidrofilik/hidrofobik karakterindeki değişim hakkında bilgi sahibi olunmasına yardımcı olmaktadır.

Işık kontrollü yüzeyler için farklı sıvılar kullanılarak Eş.6.3’de histerizi hesaplanmıştır. İlgili eşitlikteki θ_{ileri}^{trans} ve θ_{geri}^{trans} büyüklükleri *trans* konumdaki yüzeyler için sırasıyla ileri ve geri yönlü değme açılarını ifade etmektedir. Çizelge 6.6’da *trans* ve *cis* konumdaki yüzeyler için farklı sıvılar kullanılarak alınan değme açıları ve ilgili hesaplamalar sonucunda elde edilen büyüklükler verilmiştir.

Histerizi bilindiği gibi heterojen yüzeylerdeki pürüzlülüğün bir ölçüsüdür [199-200]. Yüzeylerdeki düzenlenmeye bağlı pürüzlülük arttığında, yüzeylere ait ileri ve geri değme açısı değerleri arasındaki fark artmaktadır. Çizelge 6.6 incelendiğinde, çalışılan bütün sıvılarda yüzeylerdeki *trans-cis* dönüşümüne bağlı olarak histerizinin belirgin bir şekilde değiştiği görülmektedir. Bu sonuç yüzeylerin *trans* ve *cis* konumları için hidrofobik/hidrofilik karakterlerinin farklı olmasının bir sonucu olarak yorumlanabilir. Farklı sıvılar için alınan değme açısı ölçümlerine bağlı histerizi değerleri incelendiğinde, *trans* konumdaki yüzeylere ait en büyük histerizi değerinin apolar bir sıvı olan diiyodometan’a ait olduğu görülmektedir. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin *trans* konumda olması yüzeyler üzerindeki ışık-duyarlı molekül

olan APABA moleküllerinin *trans* konumda olması anlamındadır. APABA molekülleri *trans* konumda iken yüzeyler asit uç grubu ile zenginleşir. Bu nedenle *trans* konumdaki yüzeyler hidrofilik karaktere sahiptir.

Çizelge 6.6. Işık kontrollü yüzeylerin farklı sıvılar kullanılarak alınan değme açıları ile değme açısı değişimi ve histerizi değerleri

Sıvı	$\Delta\theta_s(^{\circ})$	$\Delta\theta_h^{trans}(^{\circ})$	<i>trans</i>	<i>cis</i>
			$\theta_{ileri} / \theta_{geri}$	$\theta_{ileri} / \theta_{geri}$
Su	38.4	21.5	50.5/ 29.0	88.9/ 39.4
Formamit	0.3	20.3	51.9 /31.6	62.2/ 21.5
Diiyodometan	1.1	32.3	68.5/ 36.2	47.4/ 13.5

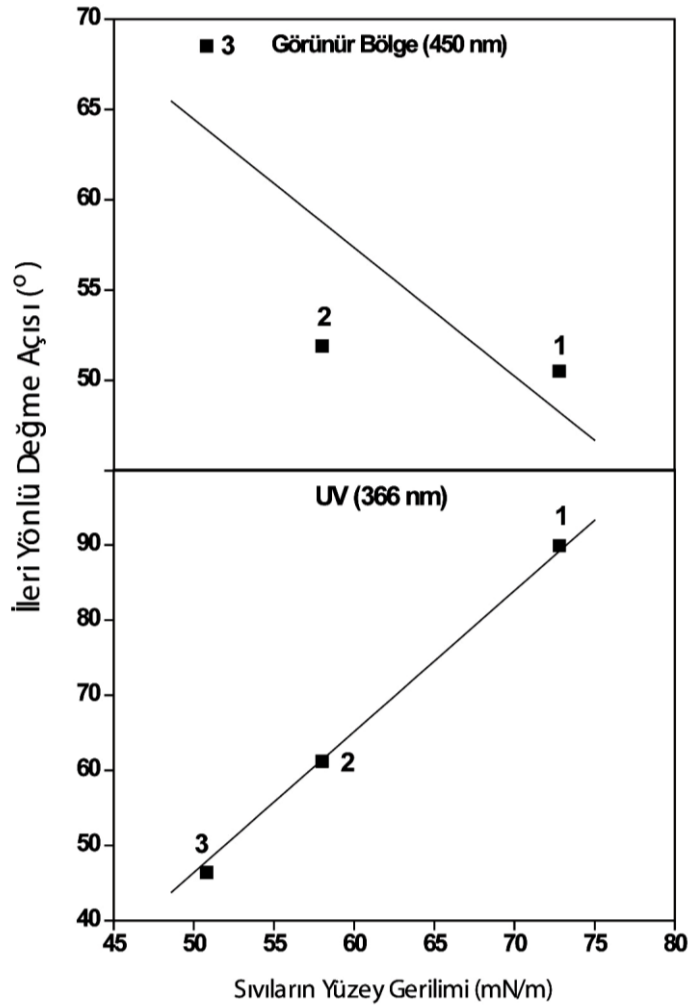
Hidrofilik yüzeyler üzerinde diiyodometan ile alınan ileri ve geri yönlü değme açısı değerlerinin diğer sıvılara kıyasla daha büyük olması beklenen bir sonuçtur. Bu sebeple, diiyodometan için hesaplanan 32.3° olarak hesaplanan histerizi değeri, polar sıvı olarak kullanılan suya (21.5°) ve formamit'e (20.3°) kıyasla daha büyük bir değerdedir.

Işık kontrollü yüzeyler için, ileri yönlü değme açılarının ilgili sıvıların yüzey gerilimlerine bağlı değişimi Şekil 6.29'da verilen grafik ile gösterilmiştir. İlgili grafik incelendiğinde, görünür bölgede yani 450 nm'de ışınlanmış yüzeyler için artan yüzey gerilimi ile değme açısı değerleri azalırken, 366 nm UV'de ışınlanmış yüzeylerde ise artan yüzey gerilimine bağlı olarak değme açılarında düzenli olarak artmıştır. Bu durumun, ilgili sıvılar ile ışık kontrollü yüzeylerdeki APABA molekülleri arasındaki etkileşimin molekülün *trans* ve *cis* durumuna göre farklı olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Şekil 6.29 incelendiğinde, *trans*-APABA bağlı yüzeyler için çizilen ileri değme açısının sıvıların yüzey enerjilerine bağlı negatif eğilimli eğrinin

eğimi $0.71^{\circ}/\text{mN/m}$ iken, *cis*-APABA molekülüleri bağlı yüzeylerden elde edilen eğrinin eğimi $1.87^{\circ}/\text{mN/m}$ olarak hesaplanmıştır. Bu değerler sıvılar ile *trans* ve *cis* konumdaki yüzeylerin etkileşiminin bir ölçüsüdür. Picraux ve arkadaşları hazırladıkları ışık kontrollü yüzeyler için farklı sıvılarla aldıkları ileri yönlü değme açılarına bağlı elde ettikleri doğrunun eğimlerinin *cis* konumdaki yüzeyler için daha büyük olduğunu belirlemişlerdir [193].

İlgili grafik incelendiğinde, *trans* konumdaki hidrofilik karakterli yüzeyler için kullanılan sıvıları yüzey gerilimlerinin artışı ile değme açıları azalmaktadır. Bu durum *cis* konumundaki yüzeyler için tam tersi bir etki göstermektedir. Hidrofobik özellik gösteren *cis* konumdaki yüzeyler için sıvıların yüzey geriliminin artışına bağlı olarak alınan değme açılarında da belirgin bir artış gözlenmektedir. Hidrojen bağı yapabilen su ve formamit sıvılarının değme açıları *trans* konumundaki yüzeyler için hidrojen bağı yapamayan diiyodometan sıvısına göre daha düşüktür. Bu durum *trans* konumda hazırlanan yüzeylerin asit son gruplu ve hidrofilik bir karakter taşımalarının bir sonucudur. Polar olan su ve formamit sıvıları hidrofilik karakterli *trans* konumdaki yüzeyler üzerinde yayılarak sırasıyla 50.5° ve 51.9° olmak üzere daha düşük değme açısı değerlerine sahip olmuşlardır. Işık kontrollü yüzeyler üzerinde sıvıların yayılma enerjisi, yüzey ile sıvı arasındaki yenilemeyen çekim kuvvetlerinin bir sonucudur [19, 200]. Hidrofilik karakterli *trans* konumdaki yüzeyler ile apolar diiyodometan molekülüleri kuvvetli hidrojen bağı yapamazlar ve buna bağlı olarak dipol-dipol kuvvetlerinin etkin olduğu diiyomometan sıvısı yüzeyler üzerine yayılamaz [193]. Bu sebeple, *trans* konumdaki yüzeyler için diiyodometan sıvısına ait 68.5° olarak belirlenmiştir.



Şekil 6.29. APABA-modifiye yüzeyler için sıvıların yüzey gerilimi değişimlerine bağlı görünür bölge ve UV ışık altındaki farklı sıvılardaki ileri değme açısı ölçümleri (Sıvılar; 1= Su, 2= Formamit, 3=Diiyodometan)

Hidrofobik karakter gösteren *cis* konumdaki yüzeyler için durum *trans* konumdaki yüzeylere göre farklılık göstermektedir. APABA moleküllerinin 366 nm UV ışık altında *cis* hale döndürülmesi sonucu moleküllerdeki asit uç gruplarının yüzeye doğru yönelmesi ile yüzeyler hidrofobik karakter kazanmıştır. Hidrofobik karakter kazanan bu yüzeyler için su ve formamit için alınan değme açıları sırasıyla 88.9° ve 62.2° olarak ölçülmüştür. İlgili grafik incelendiğinde hidrofobik *cis* konumdaki yüzeyler üzerinde hidrojen bağı yapabilen polar sıvılar yayılamaz ve daha yüksek değme açısı

değerleri göstermektedir. Bununla birlikte, apolar karakterli diiyodometan molekülleri *cis* konumlu hidrofobik özellikli yüzeyler ile daha kuvvetli etkileşir. Diiyodometanın yayılması için gerekli serbest enerji daha düşüktür. Aralarında olduğu diiyodometan molekülleri ve *cis* konumlu yüzeyler arasında dipol-dipol ve indüklenmiş dipol-dipol kuvvetlerinin etkindir [193]. İlgili yüzeyler için diiyodometan sıvısına ait ileri değme açısı 47.4° olarak ölçülmüştür.

Sonuç olarak, ışık kontrollü yüzeyler ile sıvıların ileri değme açılarındaki değişimleri, *trans* ve *cis* konumdaki yüzeyler için, APABA molekülleri ve ilgili sıvı molekülleri ara yüzeyindeki sıvı transferi özelliklerinin anlaşılmasına yardımcı olmaktadır.

Işık-duyarlı yüzeylerin serbest yüzey enerjilerinin belirlenmesi

Değme açısı, bir sıvı ile bir katının ilk tabakası arasındaki kovalent olmayan kuvvetlerinin bir ölçüsüdür. Bu fazlar arasındaki etkileşimlerin güçlü olması durumunda sıvı damlası katı yüzeyi üzerinde yayılır ve onu ıslatır. Ara yüzeylerde gerçekleşen fizikokimyasal işlemlerde serbest yüzey enerjilerinin çok büyük bir rolü vardır. Ara yüzeylerde gerçekleşen ve moleküller tarafından kontrol edilen bu işlemler hazırlanan yüzeylerin yüzey özellikleri ıslanabilme, yapışma, biyolojik uyumu ve baskı gibi birçok uygulama alanında önem taşır. Bu yüzey özelliklerinin oluşumunda yüzeylerin serbest enerjisinin rolü büyüktür [199-201].

Yüzey gerilim verilerini kullanarak ara yüzey geriliminin hesaplanması için birçok metot geliştirilmiştir. Bu çalışma kapsamında ise hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin *cis-trans* fotoizomerizasyonuna bağlı yüzey enerjileri değişimi ilgili eşitlikleri bölüm 3.4 verilen Van Oss eşitliği kullanılarak belirlenmiştir. Van Oss eşitliğinin kullanıldığı yüzey enerjisi hesaplamalarında ikisi polar biri apolar olmak üzere en az üç farklı sıvı kullanılır. Bölüm 3.4’de ifade edildiği gibi bu üç sıvıya ait olan Eş. 3.12’in

ortak çözülmesi sonucu ilgili yüzey için serbest yüzey enerjisi ve bileşenleri hesaplanır [195, 199-201]. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* konumlarına ait yüzey enerjilerinin hesaplanabilmesi amacıyla, apolar sıvı olarak diiyodometan, polar sıvılar olarak ise su ve formamit kullanılmıştır. Yüzey enerjilerinin hesaplanması için sıvıların yüzey gerilimleri ve bunların bileşenleri Çizelge 6.7’de verilmiştir.

Çizelge 6.7. Yüzey enerjilerin hesabında kullanılan sıvılar ve enerji bileşenleri (mJ/m²)

Sıvılar	γ_L	γ_L^{LW}	γ_L^-	γ_L^+	γ_L^{AB}
Polar					
Su	72.8	21.8	25.5	25.5	51.0
Formamit	58.0	39.0	39.6	2.28	19.0
Apolar					
Diiyodometan	50.8	50.8	0	0	0

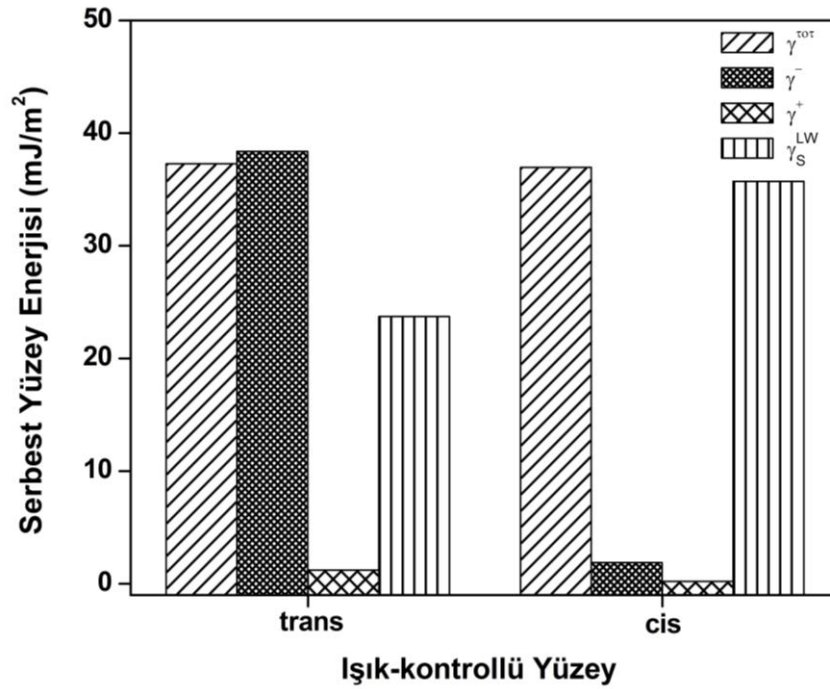
Çizelge 6.6’da verilen sıvıların yüzey gerilimleri ve bunların bileşenleri kullanılarak ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* durumdaki yüzey enerjileri ve bunların bileşenleri bölüm 3.4’de verilen eşitliklerin kullanılması sonucu hesaplanmıştır. Işık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* durumları için hesaplanan yüzey enerjileri ve bunların bileşenleri Çizelge 6.8 ve Şekil 6.30’daki grafik üzerinde gösterilmiştir.

Çizelge 6.8. Van Oss eşitliği kullanılarak hesaplanan ışık kontrollü yüzeylere ait yüzey enerji bileşenleri (mJ/m²)

Işınlama	γ_s^{LW}	γ_s^+	γ_s^-	γ_s^{tot}
Vis(450 nm)	23.72	1.19	38.37	37.28
UV (366 nm)	35.71	0.21	1.86	36.95

Çizelge 6.8’de ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* konumları için ilgili eşitlikler kullanılarak hesaplanan toplam serbest yüzey enerjileri γ_s^{tot} , lewis asit-baz bileşeni γ_s^{LW} , elektron alıcı yüzey enerji bileşeni γ_s^+ ve

elektron verici yüzey enerji bileşeni γ_s^- değerleri verilmiştir. Bu bileşenlerin hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* konumları için gösterdikleri değişimler Şekil 6.30'da verilen grafik üzerinde daha ayrıntılı olarak gösterilmektedir.



Şekil 6.30. Işık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* konumlarına bağlı yüzey enerjileri ve bunların bileşenlerinin değişimleri

İlgili grafik incelendiğinde, ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* durumları için toplam yüzey enerjileri sırasıyla 37.28 mJ/m² ve 36.95 mJ/m² olduğu gözlenmektedir. Bu durum ışık kontrollü yüzeylerin *trans* konumda iken daha aktif olduğu (açık) ve kullanıma hazır olduğu fakat *cis* konumda iken düşen yüzey enerjisi ile aktivitesinin düştüğü ve kullanılmaz hale geldiği yani sistemin kapandığı şeklinde yorumlanabilir. Işık kontrollü yüzeyler *trans* konumda bulunduklarında APABA moleküllerinin asit uç gruplarının aktif hale gelmesinden dolayı yüzeylerin hidrofilik karakter kazandığı daha önceki bölümlerde gösterilmiştir. Kobesrtein ve ark. (2004), ışık kontrollü yüzeylerde artan hidrofilik karaktere bağlı olarak toplam yüzey enerjisinin

arttığını ve yüzeylerin ileri uygulamalar için aktif hale geldiğini yaptıkları bir çalışma ile göstermişlerdir [192]. Şekil 6.30'da verilen grafik incelendiğinde, toplam yüzey enerjilerinin yanında bunların bileşenleri de verilmektedir. Işık kontrollü yüzeyler, *trans* konumda elektron alıcı yüzey enerji bileşeninden γ_s^+ , daha yüksek değerlerde elektron verici yüzey enerji bileşenine γ_s^- sahiptir. Bu durum, *trans* konumdaki ışık kontrollü yüzeyler üzerindeki APABA moleküllerinin polar asit uç gruplarının yüzey üzerinde yoğun bir şekilde bulunmasına bağlı olarak artan elektron verici kuvvetlerin artışı olarak yorumlanabilir [200,201]. Bununla birlikte, *trans* konumdaki yüzeylerde küçük değerlerde de olsa elektron alıcı enerji bileşeninin γ_s^+ varlığı ilgili grafikten gözlenmektedir. Bilindiği gibi, ışık-duyarlı moleküller görünür bölgede % 89 oranında *trans* konumda bulunmaktadır [181]. Bu nedenle *trans* konumdaki ışık kontrollü yüzeyler üzerinde tamamıyla *trans* konuma geçememiş ve *cis* pozisyonda bulunan moleküllerin varlığı nedeniyle yüzeylerde çok küçük değerlerde elektron alıcı enerji bileşeninin varlığı gözlenmiş olabilir. Bununla birlikte, *cis* konumdaki ışık kontrollü yüzeyler daha hidrofobik karakterde olduklarından dolayı düşük değerlerde elektron alıcı enerji bileşenine γ_s^- sahipken, elektron verici enerji bileşeni γ_s^+ bulunmamaktadır. Bu durum 366 nm UV altında ışınlanan yüzeylerdeki APABA moleküllerinin tamamen *cis* duruma dönmesinin bir sonucu olarak yorumlanabilir.

Sonuç olarak ışık kontrollü yüzeylerdeki *trans* ve *cis* konumlarına bağlı olarak karakterlerinde ortaya çıkan değişimler, yüzeylerin yüzey enerjilerinin ve bunların bileşenlerinin hesaplanması sonucu aydınlatılmıştır.

6.5. Işık kontrollü DNA Çip için Hazırlama Şartlarının Belirlenmesi

Işık kontrollü yüzeylerin dünyada yaygın ve kalıtsal bir hastalık olan **β -talasemi**'nin erken teşhisinde kullanılması amaçlanmaktadır. **Talasemi** (Akdeniz Anemisi) dünyanın birçok ülkesinde görülen anne ve babadan çocuklara geçen kalıtsal bir kan hastalığıdır. Talasemi, beta globin genindeki IVS-1 110 bölgesindeki G nükleotidi A nükleotidiyle yer değiştirmesi sonucu oluşan nokta mutasyona bağlı genetik bir bozukluktur [202]. Talasemi hastalığı için erken teşhis genetik birçok hastalık da olduğu gibi oldukça büyük öneme sahiptir. Bu tür genetik hastalıkların teşhisi için DNA çip çalışmaları yoğun bir biçimde çalışılmaktadır. Yershov ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada, β -talasemi'nin teşhisi için poli(akrilamit) jel üzerine çok küçük olan DNA 8 mer'lik etiketli oligonükleotid dizisi immobilize etmişler ve hastalığın teşhisi için hibridizasyon çalışması yapmışlardır [203]. Mirzabekov ve ark.(1997) ise, poli(akrilamit) jel üzerine 10 mer'lik etiketli DNA immobilize etmişler ve hibridizasyon ile hastalığın teşhisi üzerine çalışmışlardır [204].

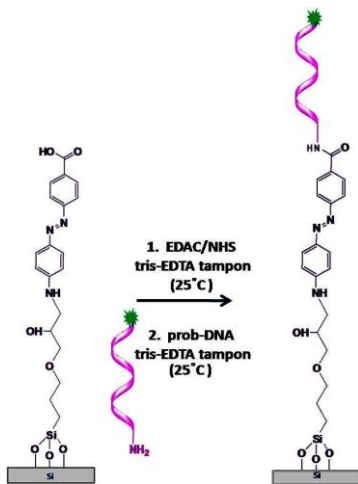
Bu çalışma kapsamında β -talasemi hastalığının teşhisi için literatürden farklı olan ve ışık ile kontrol edilebilen yeni bir DNA çip tasarlanması amaçlanmıştır. Bu amaçla, öncelikle ışık kontrollü yüzeyler üzerine Cy3 etiketli ve $-NH_2$ uç gruplu olarak β -talasemi hastalığının nokta mutasyonunu taşıyan IVS 110 (G $\rightarrow$ A) gen bölgesine ait oligonükleotid dizisi (prob-DNA) immobilize edilmiştir. Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için öncelikle prob-DNA dizilerinin ışık kontrollü yüzeyler üzerine optimum immobilizasyon şartlarının belirlenmesi amacı ile prob moleküllerine ait aşağıda anlatılan optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

6.5.1. Prob-oligonükleotid (Prob-DNA) derişimi etkisi

Çalışma kapsamında ışık kontrollü DNA çipin hazırlanması amacıyla, ışık kontrollü yüzeyler üzerine β -talasemi hastalığına ait nokta mutasyonlu

Cy3 floresans etiketli $-NH_2$ uç gruplu prob-DNA dizisi immobilize edilmiştir. Öncelikle ışık kontrollü yüzeyler üzerine immobilize edilen prob-DNA için en uygun derişimin belirlenmesi amacıyla pH= 7.4 tris-EDTA tamponu kullanılarak, 0.9, 1.8, 2.7, 3.6 μM olmak üzere dört farklı derişimde prob-DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler asit son grubuna sahip iken β -talesemi hastalığına ait nokta mutasyonlu Cy3 floresans etiketli prob-DNA ise $-NH_2$ uç grubuna sahiptir. NH_2 -uç gruplu prob-DNA iplikçiklerinin asit sonlu yüzeylere kovalent olarak bağlanabilmesi amacıyla öncelikle asit sonlu yüzeyler reaksiyona aktif hale getirilebilmek amacıyla 3 saat boyunca $25^\circ C$ ' da 10 mM EDAC/10 mM NHS (tris-EDTA tampon, pH 7.4) çözeltisi içerisinde bekletilmiştir.

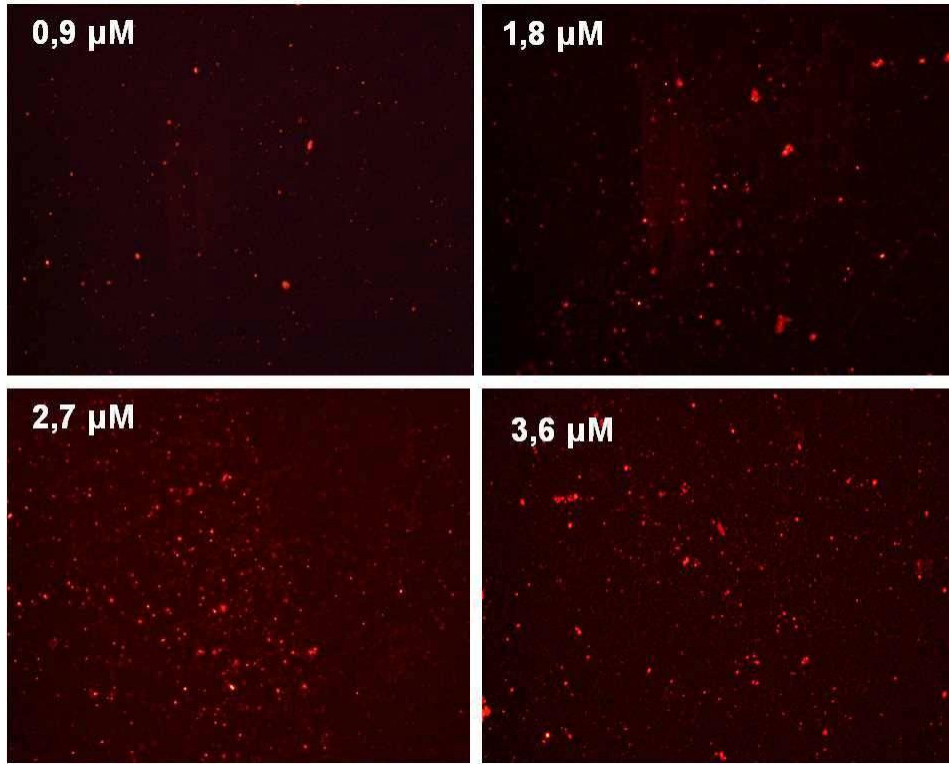
Bu sürenin sonunda aktifleştirilmiş yüzeyler saf su ile yıkandıktan sonra hızlı bir şekilde hazırlanan prob-DNA çözeltilerine daldırılmış ve $25^\circ C$ 'da 24 saat bekletilerek $-NH_2$ uç gruplu hedef DNA iplikçiklerinin aktifleştirilmiş asit sonlu ışık kontrollü yüzeyler üzerine kovalent olarak bağlanması sağlanmıştır (Şekil 6.31).



Şekil 6.31. Işık kontrollü yüzeyler üzerine prob-DNA iplikçiklerinin kovalent olarak bağlanmasının şematik gösterimi

Bağlanmadan kalan prob-DNA iplikçiklerinin yüzeyler üzerinden uzaklaştırılması amacıyla %1'lik sodyumdodesil sülfat (SDS) çözeltisinde 50°C sıcaklıkta 5 dakika boyunca yıkanmış daha sonra ultra saf su ile yıkanmış azot gazı ile kurutularak ileri deneyler için kullanıma hazır duruma getirilmiştir.

Işık kontrollü DNA çip için yukarıda da bahsedildiği gibi öncelikle en uygun prob-DNA derişimi belirlenmelidir. Bu tür çip çalışmalarında yüzeye bağlanan prob-DNA derişimi önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Buradaki amaç teşhis amaçlı bir çip hazırlayabilmektir. Hazırlanacak DNA çip hedef hastalığa ait teşhisi prob-DNA ile hedef-DNA iplikçiklerin hibridizasyonu sonucu tanımlayacaktır. Bu durumda çipi oluşturan prob-DNA iplikçiklerinin yüzey üzerinde en uygun hibridizasyon şartının oluşacağı biçimde, en düzgün şekilde kovalent bağlanabilmesi oldukça önemlidir [205-207]. En uygun prob-DNA derişiminin belirlenebilmesi amacıyla hazırlanan yüzeylerin 20 büyütme ile floresans mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Şekil 6.32'de verilen floresans mikroskobu görüntüleri incelendiğinde artan prob-DNA derişimine bağlı olarak yüzeydeki floresans sinyali artmaktadır.

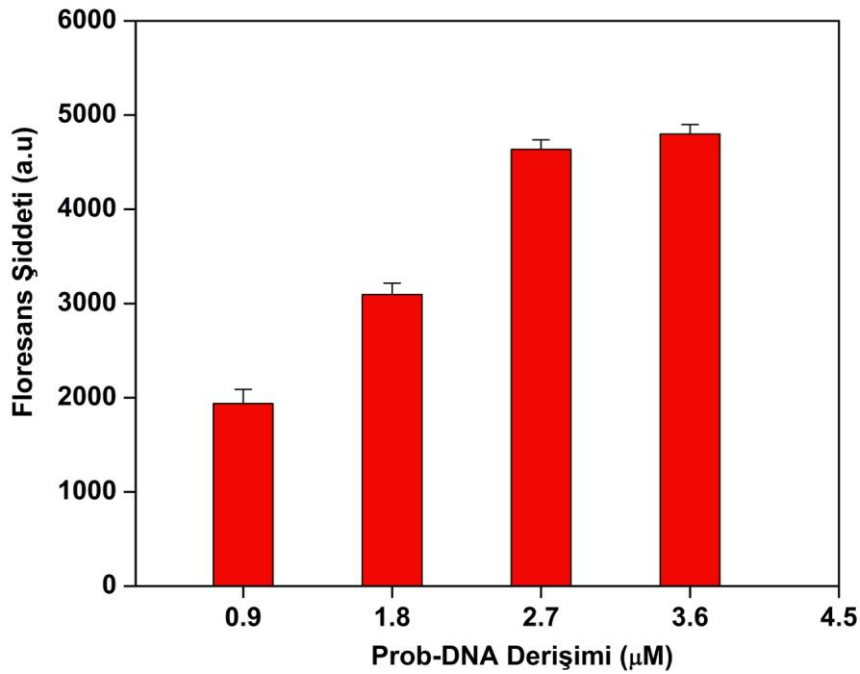


Şekil 6.32. Farklı derişimlerdeki prob-DNA çözeltileri kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin 20 X floresans mikroskobu görüntüleri

Işık kontrollü DNA çip hazırlanmasında prob-DNA Cy3 etiketli olarak satın alınmıştır. Cy3 boyasından floresans sinyali alınması için 550 nm'de uyarılması gereklidir. ~550 nm'de uyarılıma Cy3 boyası ~ 570 nm'de yeşil renkli floresans sinyali verir. Şekil 6.32 incelendiğinde sinyallerin kırmızı olduğu gözlenmektedir. Bunun nedeni kullandığımız Floresans Mikroskobunun filtresinin uygun olmayışından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle sinyaller kırmızı gözlenmektedir. Bu nedenle hibridizasyon çalışmaları için ileri bölümlerde anlatılacağı üzere Konfokal Mikroskobu kullanılmıştır.

Farklı derişimde prob-DNA kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü DNA çipler için alınan floresans mikroskobu görüntülerinden elde floresans şiddetleri Şekil 6.33'de gösterildiği gibi prob-DNA derişimine karşı grafiğe

geçirilmiştir. Prob-DNA derişiminin floresans şiddeti ile değişimini gösteren Şekil 6.33'deki ilgili grafik incelendiğinde, artan prob-DNA derişimine bağlı olarak beklendiği gibi floresans derişimi artmaktadır. Prob-DNA derişimi 0.9 μM 'dan 2.7 μM ' a değişirken floresans değişimi hızlı bir şekilde artarken derişim 2.7 μM 'dan 3.6 μM 'a arttırıldığında floresans şiddetinin çok az değiştii hem grafikten hem de bu grafikte kullanılan verilere ait floresans mikroskobu görüntülerinden rahatlıkla gözlenebilmektedir.



Şekil 6.33. Işık kontrollü DNA çip için artan prob-DNA derişimine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi. (Bekletme süresi= 24 saat)

İlgili grafik incelendiğinde ışık kontrollü DNA çip hazırlanması için 2.7 μM prob-DNA derişiminin en uygun derişim olduğu söylenebilir. Bu derişimin üzerindeki bir değer olan 3.6 μM prob-DNA için floresans şiddeti çok az değişmiştir. Bu sonuç hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler üzerine prob-DNA moleküllerinin immobilizasyonunda, yüzeylerin 2.7 μM derişiminde prob-DNA kullanıldığında bir doygunluğa ulaştığı söylenebilir. Bu nedenle, bu derişimin üzerinde yüzey üzerine kovalent bağlanmaların çok fazla

olmadığı ve buna bağlı olarak floresans şiddetinin çok az değiştiği şeklinde yorumlanabilir.

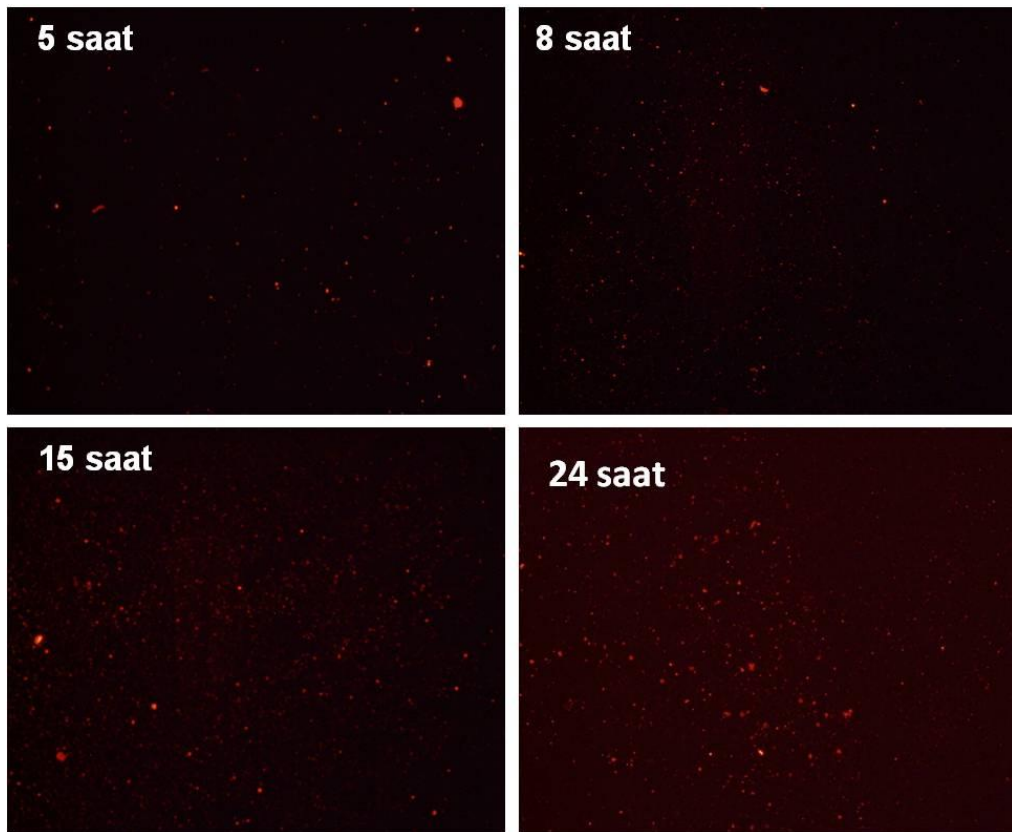
Elde edilen floresans mikroskobu görüntülerine göre, yüksek derişimlerde ışık kontrollü yüzeyler üzerine prob-DNA iplikçiklerinin kovalent bağlanmaların yanı sıra kendi aralarında oluşturdukları fiziksel bağlanmaların da oluşmaya başladığı söylenebilir. Fiziksel bağlanmalar hibridizasyon ile teşhis amaçlı kullanılacak sistemlerde hibridizasyonu engellediği için istenmeyen bir durumdur [205]. Bahsedilen fiziksel bağlanmalar DNA iplikçikleri arasındaki fiziksel etkileşimlere bağlı yumaklaşmaların oluşumu ile açıklanabilir. Bu durum Şekil 6.32’de verilen floresans mikroskobu görüntülerinden de gözlenebilmektedir. 3.6 μM DNA derişiminde alınan floresans mikroskobu görüntüsünde, fiziksel bağlanmalara bağlı oluşan yumaklaşmalar büyük boya noktacıkları olarak gözlenmektedir. Sonuç olarak, ışık kontrollü DNA çip hazırlanması işleminde en uygun prob-DNA derişimi 2.7 μM olarak belirlenmiştir.

6.5.2. Prob-DNA için immobilizasyon süresi etkisi

Hedef hastalık teşhisi için en hızlı ve güvenilir şekilde çalışacak ve piyasadaki diğer DNA çiplerden farklı olarak ışık ile kontrol edilebilecek yeni bir DNA çip hazırlanması amacıyla öncelikle hazırlanacak DNA çip için bir önceki bölümde anlatıldığı gibi prob-DNA için derişim çalışması yapılmıştır. Bir DNA çip çalışmasında, prob-DNA derişiminin yanında bu DNA iplikçiklerinin çip olarak tasarlanan katı desteğe kovalent bağlanma süresi yani immobilizasyon süresi de önemli bir parametredir [205]. Prob-DNA iplikçiklerinin ışık kontrollü yüzeyler üzerine kovalent bağlanma süresinin belirlenebilmesi amacı ile, optimum prob-DNA derişimi olarak kabul edilen 2.7 μM prob-DNA çözeltileri içerisinde ışık kontrollü yüzeyler 5; 8; 15; 24 saat olmak üzere farklı zamanlarda 25°C’da bekletilmiştir. Bu sürelerin sonunda yüzeyler bağlanmadan kalan veya fiziksel olarak birbiri ile bağlanan DNA iplikçiklerinin uzaklaştırılması amacıyla %1 SDS

çözeltisi ile 50°C sıcaklıkta 5 dakika yıkanmış daha sonra ultra saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutularak analize hazır hale getirilmiştir.

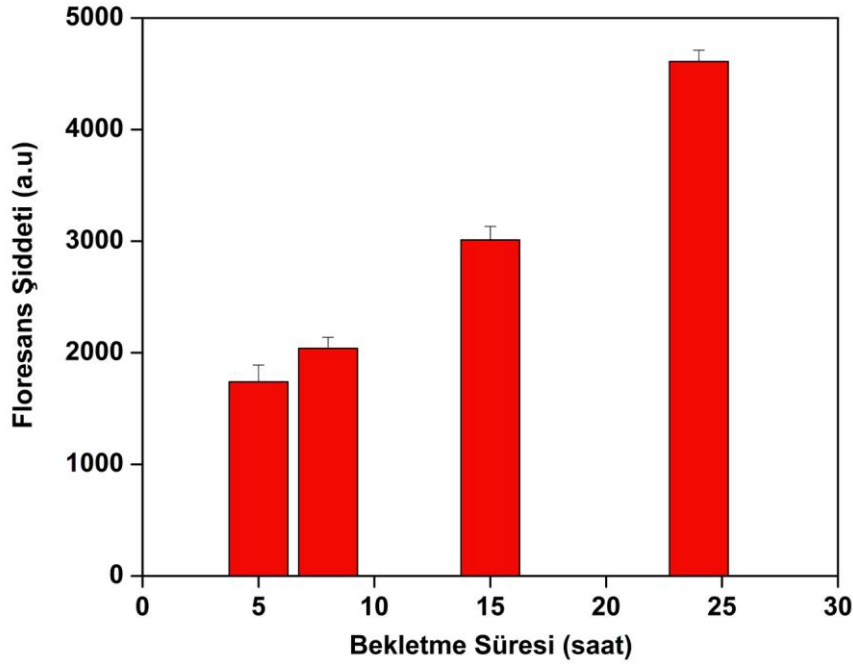
Prob-DNA iplikçiklerinin ışık kontrollü yüzeyler üzerine kovalent bağlanması için en uygun bekletme süresinin belirlenebilmesi amacıyla hazırlanan yüzeylerin 20X büyütme ile floresans mikroskobu görüntüleri alınmıştır.



Şekil 6.34. Farklı bekletme süreleri hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin 20X büyütme floresans mikroskobu görüntüleri (prob DNA=2.7 μ M)

Şekil 6.34’de verilen bu floresans mikroskobu görüntüleri incelendiğinde; 2.7 μ M prob-DNA çözeltileri içerisinde farklı zamanlarda bekletilen, EDAC/NHS sistemi kullanılarak aktiveştirilmiş ışık kontrollü yüzeylerin artan bekletme süresine bağlı olarak floresans sinyallerinin arttığı gözlenmektedir. Görüntülerde gözlemlendiği gibi yüzeyler üzerinde en uzun

bekletme süresi olan 24 saat için en fazla floresans sinyalinin alınmasının yanı sıra yüzey üzerinde herhangi bir istenmeyen fiziksel yumaklaşmanın oluşmadığı gözlenmektedir. Bu görüntülerden yararlanılarak yapılan floresans şiddeti analizleri Şekil 6.35’de grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 6.35. Işık kontrollü DNA çip için artan bekletme süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi

Şekil 6.34’de verilen floresans mikroskobu görüntülerinden yola çıkılarak yüzeylere ait floresans şiddetleri rakamsal olarak belirlenmiştir. Şekil 6.35’de verilen ilgili grafikte gözleendiği gibi, prob-DNA için artan immobilizasyon süresine bağlı olarak floresans şiddeti çok belirgin ve hızlı bir şekilde artmaktadır. İlk 5 saat ile 8 saat arasındaki bekletme sürelerine ait floresans sinyallerinde çok büyük fark gözlenmezken 15 saatin sonunda ilk 5 saate göre hızlı bir artış gözlenmiştir. Bununla birlikte en yüksek floresans şiddeti 24 saatlik bekletme süresi sonunda olduğu gözlenmiştir.

Bu sonuçlara bağlı olarak, 2.7 μ M prob-DNA çözeltisi kullanılarak hazırlanan ışık kontrollü DNA çip içi en uygun prob-DNA bekletme süresi 24 saat olarak belirlenmiştir.

6.6. Işık kontrollü DNA Çip için Hibridizasyon

Bilindiği gibi hibridizasyon, prob-DNA ipliğindeki nükleik asitlerin eşlenik DNA zincirindeki nükleik asitler ile hidrojen bağı yapması sonucu sarmal çift DNA zincirinin oluşmasıdır [208]. DNA zincirindeki tek (nokta) mutasyona bağlı olarak o gen bölgesinin oluşturduğu hastalığın teşhisi olasıdır. Teşhis nokta mutasyonlu yani bozuk gen bölgesinin hastalıklı bir kandan izole edilen DNA zinciri ile hibridizasyonu sonucu belirlenebilmektedir. DNA ipliklerinin hibridizasyonu seçici ve özel olduğundan hastalığın teşhisi yüksek ölçekte doğrudur. Bu çalışma kapsamında hazırlanan DNA çip piyasadaki diğer çiplerde farklı olarak hibridizasyonun ışık ile kontrolü yapılmaya çalışılmıştır. Literatürde azobenzen bileşikler ile modifiye edilen DNA iplikçiklerinin hibridizasyon kontrolü çözelti ortamında sağlanmıştır [209-210]. Bu noktadan hareketle literatürden farklı olarak bu çalışma kapsamında ışık-duyarlı azobenzen bileşiği DNA ipliğine modifiye edilmenin dışında bir katı destek üzerine tutturularak yeni bir DNA çip tasarlanmıştır. Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip görünür bölgede çalışacak yani DNA hibridizasyonu görünür bölgede gerçekleşerek β -talasemi tanısı rahatlıkla adlandırılabilirken, UV ışık altında hazırlanan çip kapalı konuma geçerken ve bir sonraki uygulama için steril bir ortamda hazır olarak bekletilebilecektir.

Bu amaç doğrultusunda öncelikle ışık kontrollü DNA çip için en uygun hibridizasyon ortamının sağlanmasına çalışılmıştır. En uygun ve hızlı hibridizasyonun sağlanabilmesi için eşlenik oligonükleotid derişimi ve hibridizasyon zamanı önemli parametreleri oluşturmaktadır.

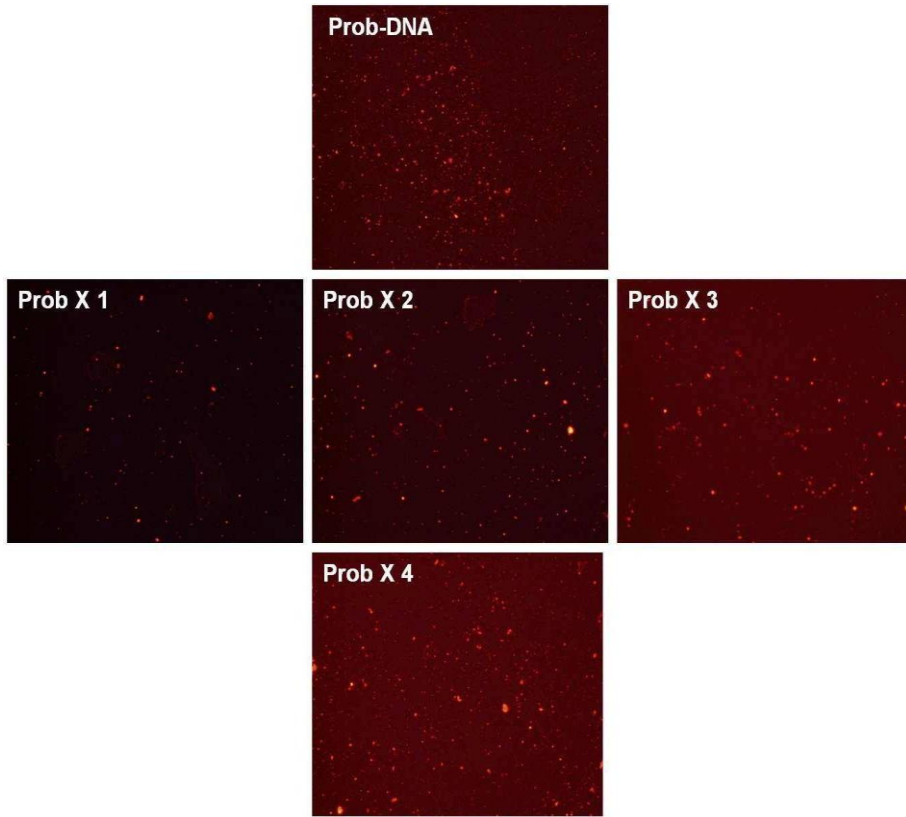
6.6.1. Eşlenik oligonükleotid derişiminin hibridizasyon üzerine etkisi

Optimum çalışma şartlarının belirlenebilmesi için öncelikle eşlenik oligonükleotid için derişim etkisi çalışılmıştır. Bu amaçla, 25 mer'lik Cy5 etiketli hedef oligonükleotid dizisi satın alınmıştır. Burada hedef DNA zinciri prob-DNA zincirinden farklı renkte floresans etiketli olarak kullanılmıştır. Bunun nedeni ışık kontrollü DNA çip için hem *Görünür Bölge* hem de *UV* ışık altındaki hibrizasyonlarının renk farkına dayalı olarak Konfokal Mikroskobu ile rahatlıkla gözlemleyebilmektir. Bu amaç doğrultusunda IVS 110 (G→A) mutasyonlu gen bölgesine sahip prob-DNA ile hibritleşmesi amacıyla eşlenik-DNA dizisi kullanılmıştır. Öncelikle eşlenik oligonükleotid dizisi için en uygun hibridizasyon derişiminin belirlenmesi amacıyla hibridizasyon etkinliği üzerine hedef oligonükleotid derişimi etkisi çalışılmıştır.

Bu çalışma için hedef oligonükleotid dizisinin tris-EDTA tamponu içerisinde (pH= 7.4) 2.7 μ M (probx1); 3.6 μ M (probx2); 8.1 μ M (probx3) ve 10.8 μ M (probx4) olmak üzere 4 farklı derişimde hedef-DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Seçilen hedef oligonükleotid derişimleri incelendiğinde, daha önceki deneylerle belirlenen optimum prob-DNA derişiminden oldukça fazla miktarlarda olduğu gözlenmektedir. En uygun ve en etkili hibridizasyonun yakalanabilmesi için bu tip katı destek üzerinde yürüyen çip sistemleri için genellikle hedef oligonükleotid derişimi prob-DNA derişiminden birkaç kat fazla miktarda olmalıdır [206-208]. Hazırlanan farklı derişimlerdeki hedef-DNA çözeltileri içerisinde ışık kontrollü DNA çip daldırılmış ve hibridizasyonun gerçekleşmesi için 24 saat süre ile vücut sıcaklığı ile uyumlu olması açısından 37°C sıcaklıkta bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda hazırlanan yüzeyler hibridizasyona girmeyen fazla miktardaki hedef oligonükleotidlerin uzaklaştırılması amacıyla 50°C sıcaklıkta %1'lik SDS çözeltisi ile 5 dakika süreyle yıkanmış ve hemen sonrasında ultra-saf su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutularak Floresans Mikroskobu ölçümü için hazır hale getirilmiştir.

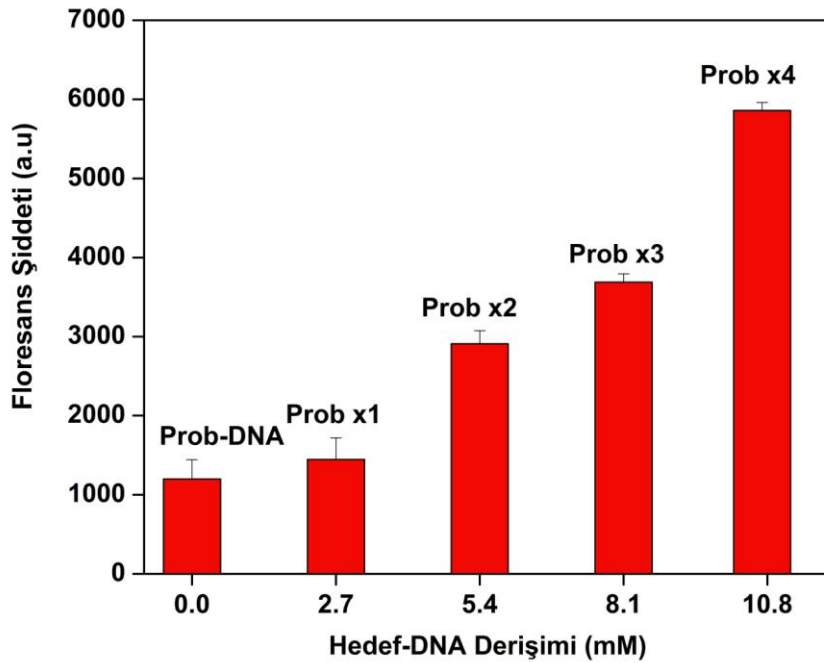
Floresans Mikroskobu görüntüleri (Şekil 6.36) alınan yüzeyler için gözlenen floresans sinyaline bağlı olarak hibridizasyon için en uygun hedef oligonükleotid derişimi belirlenmeye çalışılmıştır.

Şekil 6.36'da verilen Floresans görüntüleri incelendiğinde beklendiği gibi artan hedef oligonükleotid derişimine bağlı olarak floresans sinyali artmaktadır. Sadece bu görüntülere bakarak karar vermek güçtür. Bu sebeple bu yüzeylerin floresans şiddetleri rakamsal olarak belirlenmiş ve Şekil 6.37'de verilen grafik üzerinde artan hedef oligonükleotid derişimine bağlı floresans sinyali değişimi verilmiştir.



Şekil 6.36. Işık kontrollü DNA çip için artan hedef-DNA derişimine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimine ait Floresans Mikroskobu görüntüleri. (Bekletme süresi= 24 saat, prob-DNA derişimi= 2.7 μ M)

Hedef-DNA derişimine göre hazırlanan yüzeylerin hibridizasyonuna bağı floresans şiddeti değişimleri incelendiğinde, görüldüğü gibi dört farklı derişimde hedef-DNA çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltiler hazırlanırken daha öncede bahsedildiği gibi prob-DNA derişiminden daha yüksek derişimlerde olmasına dikkat edilmiştir. Buradaki amaç, hedef-DNA derişimini yüksek tutarak ışık kontrollü yüzeyler üzerine daha önce anlatıldığı gibi immobilize edilen nokta mutasyonlu DNA zincirleri ile hibridizasyon olasılığını arttırabilmektir.



Şekil 6.37. Işık kontrollü DNA çip için artan hedef-DNA derişimine bağı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi

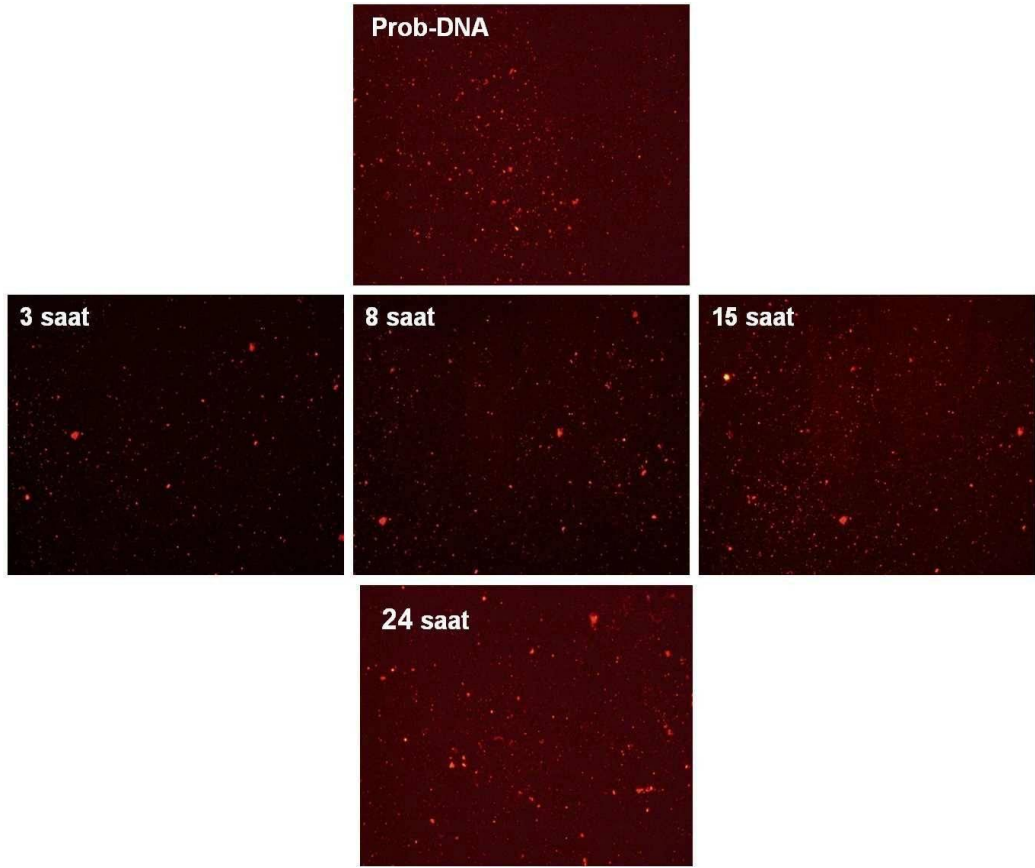
İlgili grafikten de gözlenebildiği gibi hedef-DNA derişimi prob-DNA derişimi ile birebir tutulduğunda yani 2.7 μ M kullanıldığında floresans sinyali çok az değişirken, hedef-DNA derişimi prob-DNA derişimin dört katı kullanıldığında yani 10.8 μ M olarak kullanıldığında floresans sinyali hızlı bir şekilde artış göstermiştir. Bununla birlikte Şekil 6.36'da verilen floresans mikroskobu görüntüleri de karşılaştırılırsa en yüksek hedef-DNA kullanılarak hazırlanan yüzeylerdeki sinyal artışı rahatlıkla gözlenebilirken yüzeylerde çok fazla

gözlenmeyen boya yumaklaşmalarının yüzey üzerinde düzgün ve ideal bir hibridizasyonun bu derişimde sağlandığı söylenebilir. Bu bilgilerin yanında dikkat edilirse hibridizasyon hedef-DNA derişimi prob-DNA derişiminin en az iki katı olduğu durumda hızlı bir şekilde artışa geçmektedir. Bu durumda en uygun hibridizasyonu sağlamak için hedef-DNA derişiminin prob-DNA derişiminin en az iki katı olması gerektiği söylenebilir. Sonuç olarak, en uygun hibridizasyonun oluşabilmesi için hedef-DNA derişimi en yüksek floresans sinyalinin alındığı 10.8 μM olarak belirlenmiştir.

6.6.2. Hibridizasyon süresi etkisi

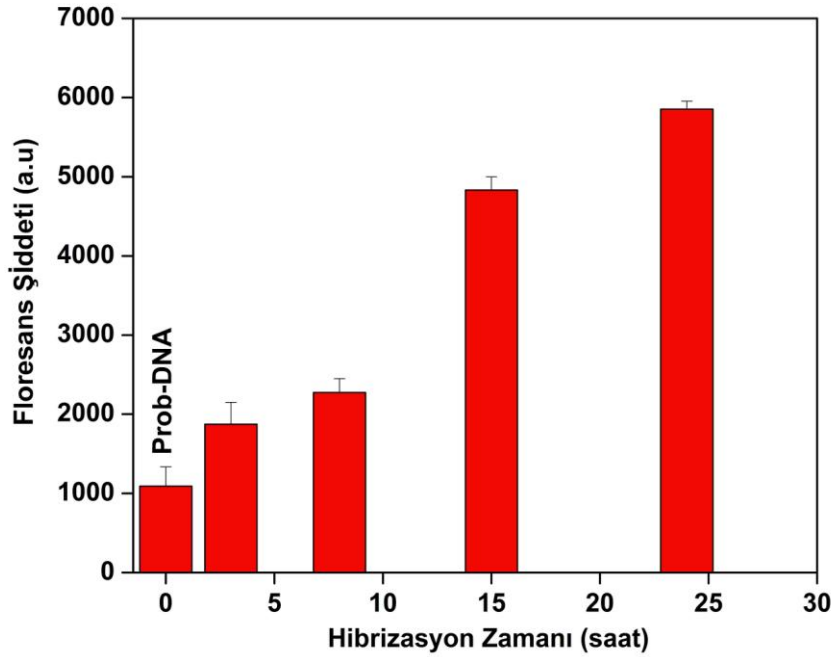
En uygun ve etkili hibridizasyon ortamının sağlanması için hedef-DNA derişiminin yanında hibridizasyon süresi de önemli bir parametredir. Hibridizasyon daha öncede belirtildiği gibi prob ve hedef DNA zincirlerindeki nükleotidlerin arasındaki hidrojen bağı oluşumunun bir ölçüsüdür [207-210]. Bu bağların oluşum süresi yani hibridizasyon süresi de optimum çalışma şartları belirlenmeye çalışılan bir DNA çip için bu anlamda önemli bir parametreyi oluşturmaktadır. Bilindiği gibi hibridizasyon hazırlanan çip hedef-DNA çözeltisi ortamına koyulduğu anda başlar fakat tam anlamıyla bütün ipliklerdeki hibridizasyonun tamamlanması için belirli bir süre geçmesi yani hidrojen bağı oluşumlarının tamamlanması gerekmektedir [207-210]. Bu amaçla, bir başka deyişle hibridizasyonun tamamlanma süresinin belirlenmesi amacı ile optimum hedef-DNA derişimi 10.7 μM olan hedef-DNA çözeltileri içerisinde hazırlanan ışık kontrollü DNA çip 3,8,15 ve 24 saatlik farklı zaman dilimlerinde bekletilerek yüzeylerdeki floresans şiddeti değişimi Floresans Mikroskobu kullanılarak ölçülmüştür.

Şekil 6.38 incelendiğinde, artan hibridizasyon süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddeti de artmaktadır. Floresans Mikroskobu görüntülerini daha ayrıntılı inceleyebilmek amacı ile yüzeylerin floresans şiddetlerinin rakamsal değerleri Şekil 6.39'da verildiği gibi hibridizasyon süresinin artışına karşı grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 6.38. Işık kontrollü DNA çip için artan hibridizasyon süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimine ait Floresans Mikroskobu görüntüleri (hedef-DNA = $10.7 \mu\text{M}$)

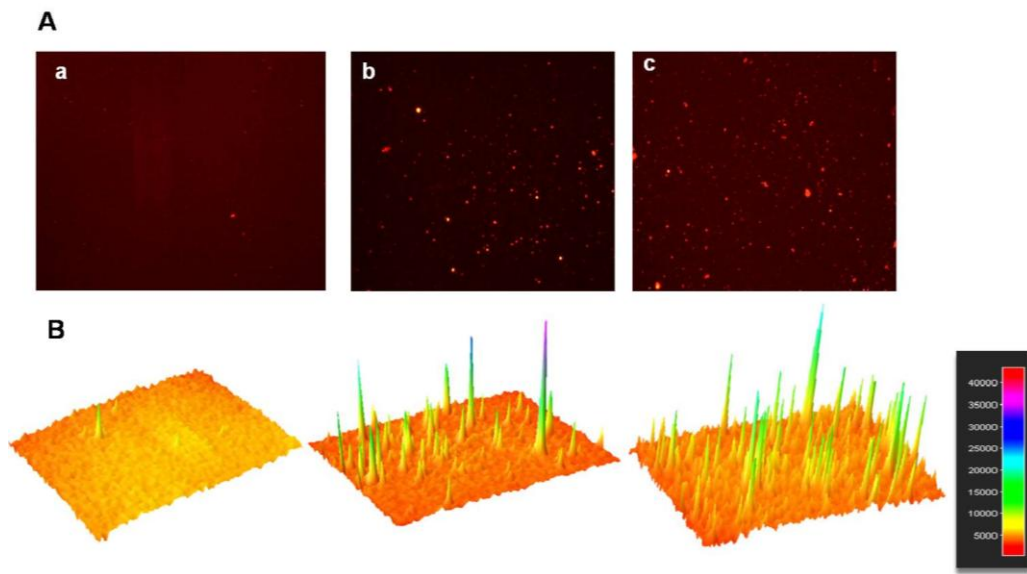
Hibridizasyon süresinin hazırlanan yüzeylerin floresans şiddetine bağlı değişiminin verildiği Şekil 6.39 incelendiğinde, hibridizasyonun hemen gerçekleşmeye başladığı 3 saat içerisinde prob-DNA floresans şiddetinin yaklaşık iki katı artmıştır. Bu durum hibridizasyonun ilk 3 saat içerisinde başlaması olarak yorumlanabilir. Burada önemli olan daha öncede bahsedildiği gibi hibridizasyonun tamamlanma süresidir. Hibridizasyonun tamamlanma süresinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmada sonucu elde edilen floresans şiddetinin hibridizasyon üzerine etkisi incelendiğinde, 24 saat sonunda en şiddetli olan floresans şiddeti elde edilmiştir.



Şekil 6.39. Işık kontrollü DNA çip için artan hibridizasyon süresine bağlı olarak yüzeylerin floresans şiddetlerinin değişimi (hedef-DNA= 10.7 μ M)

Hedef-DNA iplikçiklerinin prob-DNA ile eşleşmesinin Floresans Mikroskobu ile izlenmesinde alınan sinyalin gerçekten hibridizasyona ait olduğunun belirlenebilmesi gerekmektedir. Bilindiği gibi alınan sinyal hibridizasyon sonucu değil DNA iplikçiklerinin fiziksel etkileşimleri sonucunda da olabilmektedir. Bu durumu ayırt edebilmek amacıyla yumaklaşmaların rahatlıkla gözlenebileceği Floresans Mikroskobu görüntüleri incelenmelidir. Bu nedenle en fazla floresans sinyalinin gözleendiği 24 saatlik hibridizasyon süresine Floresans Mikroskobu görüntüleri incelendiğinde, boya kalıntısını gösterecek çok fazla bir hedef-DNA yumaklaşmasına rastlanmamaktadır. Daha önce deneyin yapılış kısmında da ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi bu tür fiziksel yumaklaşmaların önlenmesi için hazırlanan çip için yıkama basamağı çok önemlidir [204-206]. Hibridizasyon işleminde eşleşmeden kalan DNA iplikçiklerinin yüzeyden uzaklaştırılması amacıyla literatürdeki benzer çalışmalara uygun olarak yüzeyler öncelikle bir çeşit yüzey aktif madde olan %1 sodyumdodesil sülfat (SDS) çözeltisi ile daha sonrada saf su ile yıkanmış bağlanmadan kalan bütün artıkların yüzeyden uzaklaşması sağlanmıştır

[211-214]. Bu durumda hibridizasyon için en uygun bekleme süresi yani hibridizasyonun tamamlanma süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ile hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için en uygun hazırlama ve çalışma şartları belirlenmiştir. Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için her basamak için yüzeylerdeki değişim ve bu değişime bağlı olarak yüzeylerdeki floresans sinyaline bağlı değişim iki boyutlu ve üç boyutlu olarak Şekil 6.40'da verilmiştir.



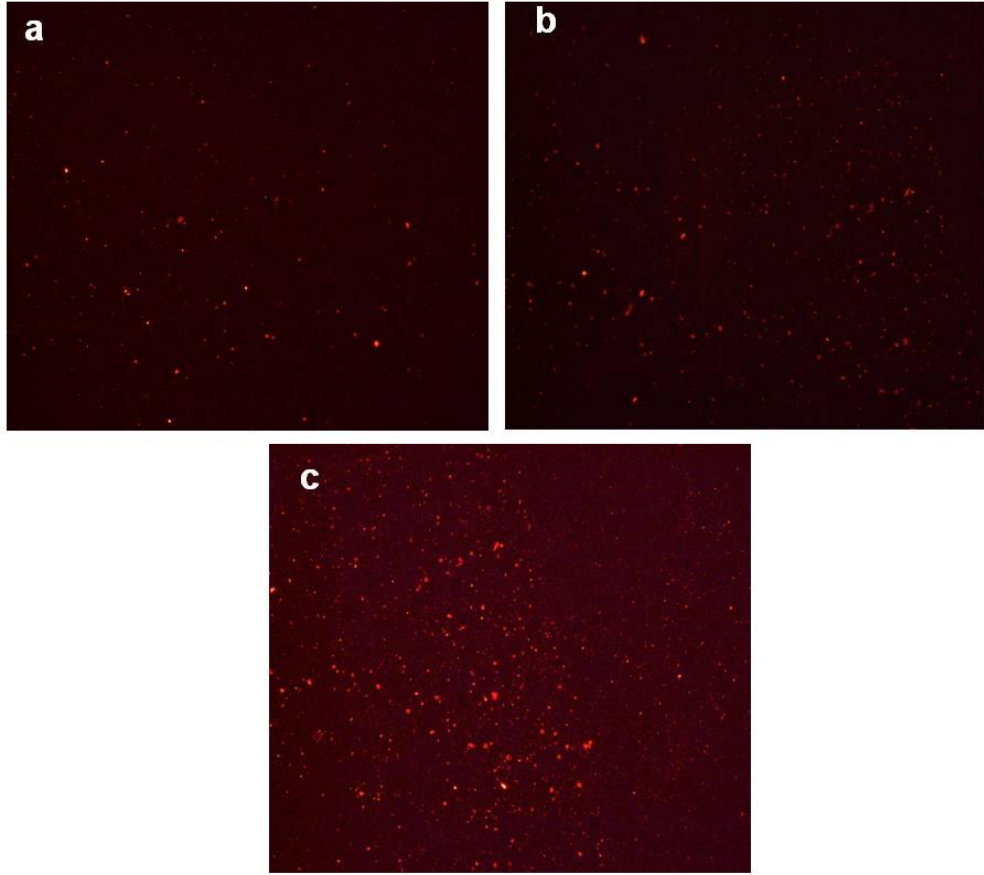
Şekil 6.40. Floresans Mikroskobu görüntüleri;(A) İki boyutlu;(a) APABA bağlı yüzeye, (b) prob-DNA bağlı yüzeye, (c) hibridizasyon sonrası yüzeye ait; (B) üç boyutlu

APABA bilindiği gibi ışık-duyarlı bir bileşiktir. Bu bakımdan floresans sinyali verebileceği düşünülmüş ve hazırlanan yüzeyler arasındaki farkı görebilmek için etiketli DNA iplikçikleri bağlanmadan önce sadece APABA bağlanarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için de Floresans Mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Şekil 6.40 (A)'da verilen APABA bağlı yüzeye ait floresans mikroskobu görüntüsü incelendiğinde çok az da olsa yüzeyin sinyal verdiği gözlenmektedir. Bu bileşiğin ışık-duyarlı olmasından dolayı beklenen bir durumdur. Bu ışık kontrollü yüzeyler üzerine Cy3 etiketli ve β -talasemi hastalığının mutasyonlu gen bölgesine sahip prob-DNA iplikçikleri bağlandığında görüldüğü gibi floresans şiddetinde ciddi bir artış olmuştur. Bu

durum Cy3 etiketli ve $-NH_2$ uç gruplu olarak kullanılan prob-DNA iplikçiklerinin başarılı bir şekilde APABA bağlı ışık kontrollü yüzeyler üzerine bağlanmasının bir sonucu olduğu söylenebilir. En son basamak olan hibridizasyon işlemine ait olan floresans mikroskobu görüntüleri incelendiğinde ise yüzeydeki etiketli iplikçiklerin sayısının arttığı ve buna bağlı floresans şiddetinin belirgin ölçüde arttığı görülmektedir. Bu şekilde ışık kontrollü DNA çipin hazırlanmasına ait basamaklar için oluşan tüm değişimler şekil 6.40'daki Floresans Mikroskobu görüntülerinden açıkça izlenebilmektedir.

6.6.3. Eşlenik olmayan oligonükleotid dizisini ile hibridizasyon kontrolü

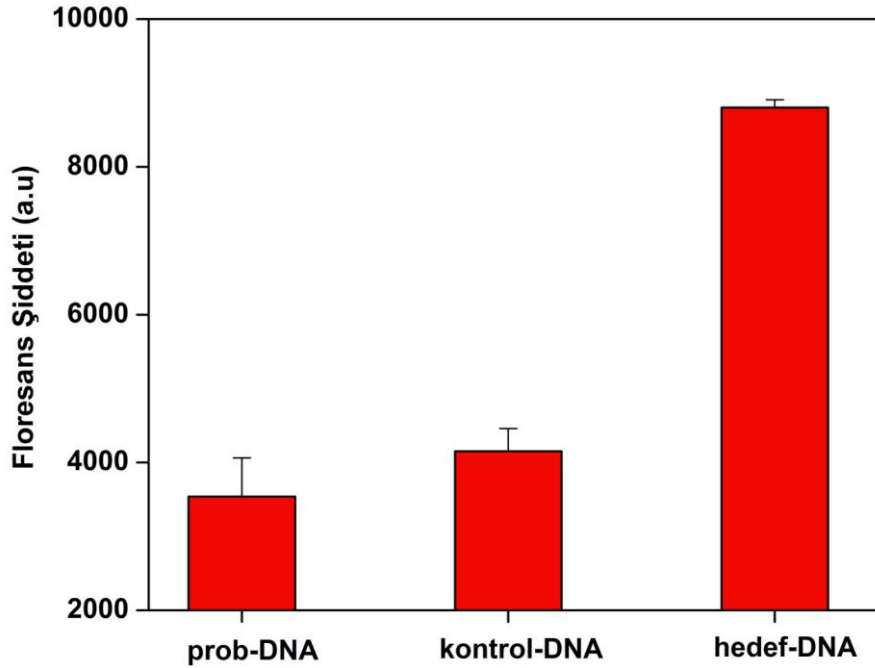
β -talasemi nokta mutasyonlu genetik bir hastalıktır. Nokta mutasyon oligonükleotid dizisinde bir nükleotidin eşleniğinin DNA çift sarmalını oluşturmak için eşleşeceği diğer oligonükleotid dizisinde olmamasıdır. β -talasemi hastalığının IVS-1 110 gen bölgesinde G nükleotidinin yerini A nükleotidinin almasıyla oluşan mutasyona bağlı bir hastalıktır [215-220]. Daha önceki bölümlerde anlatıldığı gibi çipin hazırlanması ve eşlenik DNA ile hibridizasyonuna yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmaların yanında hibridizasyonun etkinliğinin araştırılması amacı ile ışık kontrollü DNA çip için eşlenik olmayan oligonükleotid dizisi kullanılarak hibridizasyon kontrol çalışması yapılmıştır. Hibridizasyon için kontrol çalışmasında Cy5 etiketli eşlenik olmayan-DNA dizisi kullanılmıştır. Kontrol hibridizasyon çalışması deneysel kısımda anlatıldığı gibi daha önce eşlenik iplik olan hedef-DNA için yapılan optimizasyon çalışmalarında elde edilen verilere göre aynı şartlarda yapılmıştır. Yapılan kontrol hibridizasyon çalışması sonucunda alınan Floresans Mikroskobu görüntüsü Şekil 6.41'de verilmiştir.



Şekil 6.41. Işık kontrollü DNA çip için hibridizasyon kontrolüne ait; (a) prob- DNA, (b), eşlenik olmayan DNA (c) eşlenik-DNA ile hibridizasyon sonrası Floresans Mikroskobu görüntüleri

Şekil 6.41'deki Floresans Mikroskobu görüntülerinde; (a) prob-DNA bağlı, (b) eşlenik DNA zinciri ile hibridizasyon sonrası, (c) eşlenik olmayan DNA zinciri ile hibridizasyon sonrası yüzeyler gösterilmektedir. İlgili görüntüler incelendiğinde, hedef-DNA ile hibridizasyon sonrası (Şekil 6.41.c), prob-DNA bağlı yüzeylerdeki (Şekil 6.41.a) floresans şiddeti dikkate değer bir biçimde artış gösterirken, eşlenik olmayan kontrol-DNA ile yapılan hibridizasyon sonrası (Şekil 6.41.b) floresans sinyalinde çok fazla bir değişim gözlenmemektedir.

Bu Floresans Mikroskobu görüntülerinden elde edilen ilgili yüzeylere ait floresans şiddetleri Şekil 6.42'de grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 6.42. Eşlenik olan (hedef-DNA) ve eşlenik olmayan (kontrol-DNA) ile yapılan hibridizasyon sonucu elde edilen floresans şiddeti değişimleri

Şekil 6.42’de sırasıyla, prob-DNA bağlı, eşlenik olmayan kontrol-DNA ile hibridizasyon sonrası ve eşlenik olan hedef-DNA ile hibridizasyon sonrası yüzeylerine ait floresans sinyallerindeki değişim verilmektedir. İlgili grafik incelendiğinde, eşlenik olan hedef-DNA ile hibridizasyon sonrası ışık kontrollü DNA çip yüzeyindeki floresans sinyali dikkate değer bir biçimde artmıştır. Bunun yanında, eşlenik olmayan kontrol-DNA ile yapılan hibridizasyon işlemi sonrası yüzeylerin floresans sinyali prob-DNA bağlı yüzeylere göre çok az bir artış gözlenmiştir. Kontrol-DNA ile yapılan hibridizasyon çalışmasında gözlenen floresans sinyalindeki artış, hibridizasyonun dışında DNA iplikçiklerinin kendi aralarında gerçekleşen fiziksel etkileşimlerin bir sonucu olduğu söylenebilir. Soper ve ark. (2007) poli(metilmetakrilat) kullanarak hazırladıkları sisteme ait DNA hibridizasyonunu inceledikleri bir çalışmada, eşlenik olmayan DNA dizisinin çok küçük miktarlarda da olsa prob-DNA ile etkileştiğini floresans sinyalindeki artışa bağlı olarak gözlemlemişlerdir [221]. Ayrıca literatürde bu şekilde floresans etiketli olarak hazırlanan DNA çip sistemlerinde

hibridizasyonun kontrolü için yapılan eşlenik olmayan kontrol-DNA ile hibridizasyon çalışmalarda çok küçük miktarlarda da olsa DNA iplikçiklerinin kendi aralarındaki etkileşiminin olduğu gözlenmiştir [222-224]. Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip için yapılan bu kontrol hibridizasyon çalışması ile çipin hibridizasyonunun seçici ve güvenilir olduğu sonucuna varılabilir.

6.7. Hazırlanan DNA Çip için Hibridizasyonun Işık ile Kontrolü

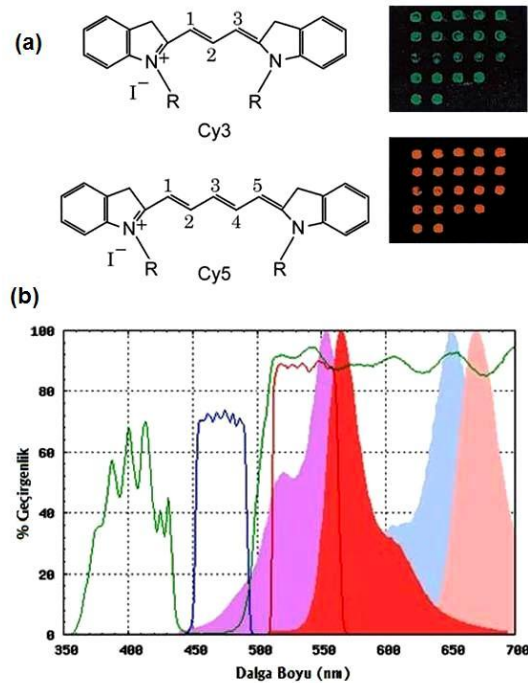
6.7.1. Kullanılan floresans boyaalarının özellikleri

Çalışma kapsamında hazırlanan bu yeni DNA çip için hibridizasyonun ışık ile kontrol edilebildiği literatürden farklı akıllı yeni bir malzeme olarak tasarlanması amaçlamıştır. Buradaki amaç, β -talasemi hastalığının teşhisinin yapılmasında UV ışık altında kullanıma hazır bir şekilde bekletilen çip, görünür bölgede hasta olduğu düşünülen kişiden alınan kan örneği içerisinde bekletilerek çip üzerindeki prob-DNA iplikçikleri ile hastalıklı kanda bulunan ve hastalıklı gen bölgesine sahip DNA iplikçiklerinin hibridizasyonunun Floresans veya Konfokal Mikroskobu kullanılarak gözlenebilmesidir.

Bu amaçla, hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler üzerine Cy3 etiketli prob-DNA (**CY3-5'-CTCTCTGCCTATTAGTCTATTTTCC-NH₂**) iplikçikleri bağlanmış ve β -talasemi hastalığının teşhisi amacıyla eşlenik iplik olarak ise farklı bir boya olan Cy5 etiketli (**CY5-5'-GGAAAATAGAGTAATAGGCAGAGAG**) DNA ipliği kullanılmıştır. Farklı renkte boyaların seçilmesinin nedeni hibridizasyon öncesi ve sonrası yüzeylerde oluşan renk farkının ve buna bağlı olarak hibridizasyon yüzdesinin Konfokal Mikroskobu kullanılarak hesaplanabilmesidir.

Daha önce DNA çip için hazırlama ve çalışma şartlarının belirlenmesi için yapılan deneylerde Floresans Mikroskobu kullanılmıştır. Bu görüntüler

incelendiğinde yüzeylerden alınan Floresans Mikroskobu görüntülerinde sadece kırmızı floresans sinyalleri alınmıştır. Kullanılan *Olympus BX51 Floresans Mikroskobu* üzerinde iki çeşit filtre bulunmaktadır. Bu filtreler, WB filtresi yani mavi filtre 450-480 nm aralığı için uygunken, WG filtresi yani yeşil filtre 510-550 nm aralığı için uygundur. Ayrıca filtrelerden WG filtresi DNA gibi biyolojik çalışmalara uygun olduğundan bu çalışmada floresans mikroskobu görüntüleri bu filtre kullanılarak alınmıştır. Dolayısıyla kullanılan filtreye bağlı olarak boyaların renkleri sadece kırmızı olarak gözlemlenmiştir. Yapılan Floresans Mikroskobu ölçümlerinde önemli olan hazırlanan çip için optimum hazırlama ve çalışma şartlarının floresans sinyaline bağlı olarak belirlemek olduğundan renk bu aşamada önemli değildir. DNA çip için optimum şartlar değişen floresans şiddetlerinden yola çıkılarak belirlenmiştir. Şekil 6.43'de ilgili boyalara ait moleküler yapıları ve emisyon spektrumları verilmiştir.

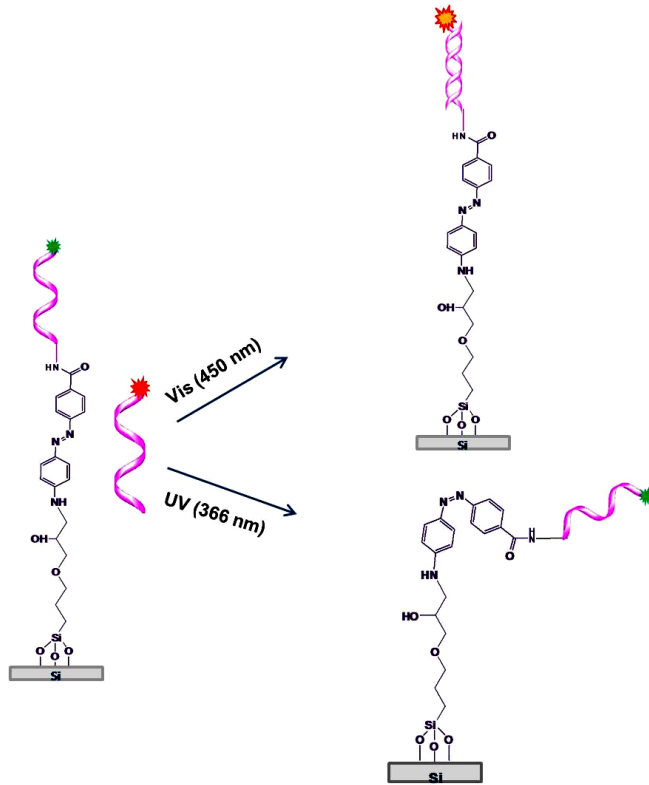


Şekil 6.43. Floresans boyalarının; (a) Cy3 ve Cy5 boyalarının moleküler yapıları ve renkleri, (b) Cy3 ve Cy5 boyalarının filtrelere bağlı renk spektrumu

Boyaların moleküler yapıları incelendiğinde yapıların birbirine yakın kimyasal yapılara sahip oldukları gözlenmektedir. Bununla birlikte Cy boyları ile kıyaslandığında, DNA çipin hazırlanmasında kullanılan ışık-duyarlı APABA molekülünün de bir çeşit boya olması ile birlikte yukarıda anlatıldığı gibi çok az da olsa floresans sinyali vermesi beklenen bir durumdur. Ayrıca Şekil 6.43 (B) verilen spektrum incelendiğinde, yeşil filtre kullanıldığında Cy3 ve Cy5 boyları kırmızı floresans sinyali vermektedirler. Çünkü boyların kendilerine ait uygun emisyon dalga boyları çok yakındır. Buna bağlı olarak ve ayrıca kullanılan filtreye bağlı olarak boylar aynı floresans sinyalinin vermektedirler.

6.7.2. Işık kontrollü hibridizasyon çalışması

Işık kontrollü akıllı malzemelerin üretimi son zamanlarda oldukça ilgi çeken bir çalışma alanını oluşturmaktadır. Işık duyarlı moleküller olan azobenzen bileşiklerinin 70 yılı aşkın bir geçmişi bulunmaktadır [225]. Birçok çalışma ile bu bileşiklerin özelliklerinin ve çalışma şartları üzerine yoğunlaşırken [226-227], son zamanlarda bu moleküllerin kullanılarak yapılan akıllı malzemelere öne çıkan bir başlık haline gelmiştir [228-232]. Bununla birlikte ışık-duyarlı moleküllerin biyokimyasal sistemler içerisinde kullanılarak oluşturulan akıllı malzemeler ise son birkaç yıldır üzerinde yoğunlukla çalışmaktadır [233-236]. Bu noktadan hareketle bu çalışmada kapsamında DNA hibridizasyonunun ışık ile kontrol edilebildiği yeni bir DNA çip hazırlamaktır. Bu amaçla hazırlanan DNA çip için şematik çalışma mekanizması Şekil 6.44'de verilmiştir.



Şekil 6.44. Işık kontrollü bu DNA çip için çalışma mekanizması şematik olarak gösterimi

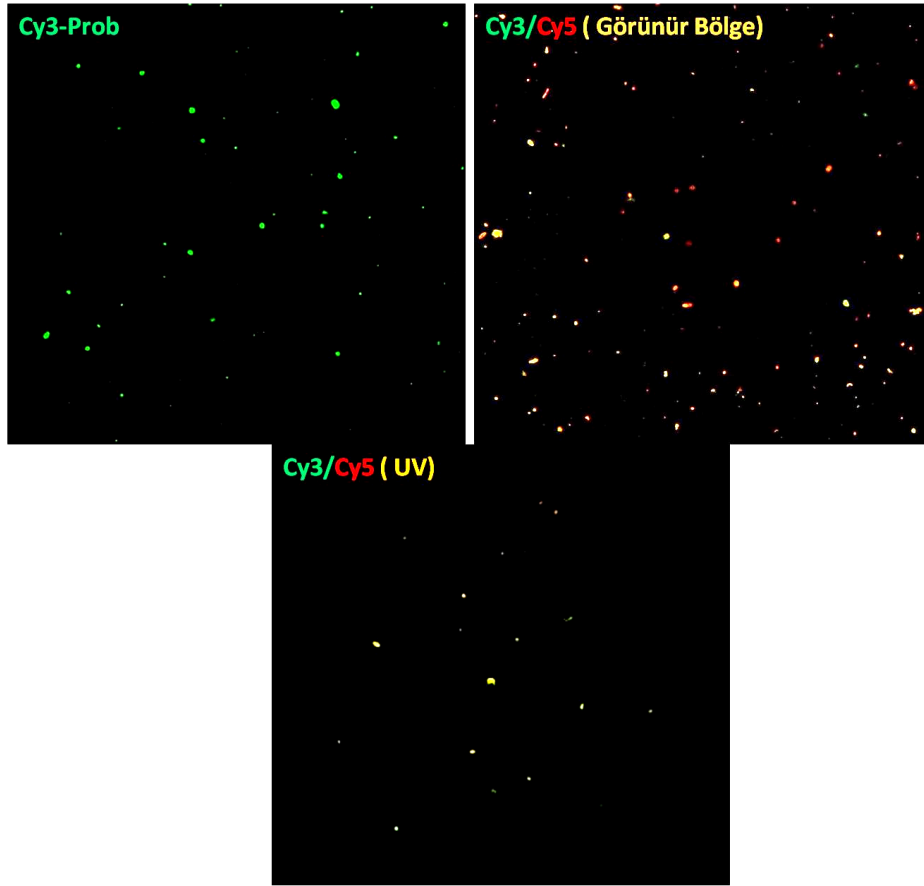
Hazırlanan DNA çip'den beklenen Şekil 6.44'de şematik olarak özetlendiği gibi görünür bölgede hedef hastalığın teşhisinde hızlı ve güvenilir bir kullanıma sahipken, kullanılmadığı zamanlarda UV ışık altında tekrar kullanıma hazır halde bekletilebilmesidir. Hazırlanan çip için hibridizasyon farklı boyaların kullanımı ile bir Konfokal veya Floresans Mikroskobu kullanımı ile gözlenebilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla, prob-DNA Cy3 etiketli, hedef-DNA ise Cy5 etiketli olarak seçilmiştir. Prob-DNA için kullanılan Cy3 boyası 550 nm'de uyarıldığında 570 nm'de yeşil renkli floresans sinyali verirken, hedef-DNA için kullanılan Cy5 boyası ise 650 nm'de uyarıldığında 670 nm'de kırmızı floresans sinyali vermektedir [237-238, 136-137].

Hazırlanan DNA çip için hibizasyonunun ışık ile kontrolünün incelenebilmesi amacıyla çip hem 450 nm hem de 366 nm ışık altında ışınlanmıştır. 450 nm ışık altında ışınlanan yüzeylerdeki bütün APABA

bileşiklerinin *trans* hale gelmesi yani çipin hibridizasyona açık hale gelmesi sağlanırken 366 nm ışık altında ışınlanan çip için ise bütün APABA moleküllerinin *cis* hale yani kapalı hale gelmesi ile Şekil 6.44'de gösterildiği gibi çipin hibridizasyona kapalı olması sağlanmıştır. Daha sonra hibridizasyona açık ve kapalı olarak tasarlanan bu iki yüzey daha önceki çalışmalarda belirlenmiş olan uygun hibridizasyon şartlarında hedef-DNA ile eşleştirilmiştir. Hibridizasyon tamamlandıktan sonra yüzeylerin Konfokal Mikroskobu görüntüleri *Leica* marka Konfokal Mikroskop kullanılarak, yağ ile 63 büyütmede alınmıştır.

Konfokal Mikroskobu görüntülerinden elde edilen piksel sayımına bağlı olarak hibridizasyon yüzdeleri mikroskop üzerindeki program vasıtasıyla hesaplanabilmektedir. Konfokal programı tarafından hibridizasyon sonrasında yüzeyler üzerinden Cy3 (prob-DNA, yeşil) boyasının yanında bir de Cy5, hedef-DNA, kırmızı) boyasının sinyali oluşmaktadır. Mikroskoba ait olan program bu boyaları piksel farkına bağlı olarak ayrı ayrı sayabilmektedir. Bu şekilde hibridizasyon sonucunda yüzeylerdeki hibritleşmeden kalan DNA iplikçikleri ile hibritleşen DNA iplikçikleri rahatlıkla ayırt edilebilmektedir. Bu durum bize hazırladığımız DNA çip için hibridizasyon yüzdesinin hesaplanabilmesine olanak sağlamaktadır [206-208, 211, 212].

Şekil 6.45'de bu yüzeylere ait Konfokal Mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, APABA moleküllerinin *trans* halde bulunduğu görünür bölgede oldukça fazla hibridizasyon gözlenmektedir. Görünür bölgede oluşan hibridizasyon prob-DNA ve hedef-DNA iplikçiklerinin eşleşmesi sonucu oluşan turuncu-kırmızı sinyallerin artışı ile rahatlıkla gözlenebilmektedir. Bununla birlikte UV ışık altında ışınlanarak kapalı hale getirilen DNA çip için ise hibridizasyonun çok az olsa da var olduğu alınan görüntülere dayalı olarak söylenebilir.



Şekil 6.45. Işık kontrollü DNA çipin açık (450 nm) ve kapalı (366 nm) durumlarındaki hibridizasyonlarına ait Konfokal Mikroskobu görüntüleri

Konfokal Mikroskobu görüntülerindeki Cy3 ve Cy5 boyalarının piksel sayımına bağlı olarak hazırlanan DNA çip için hibridizasyon yüzdesi mikroskobun kendi programı kullanılarak hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar sonucunda piksel sayımına bağlı floresans sinyali görünür bölgedeki prob-DNA ve hibridizasyon sonucu hedef-DNA için sırasıyla; 4.08×10^6 ve 2.48×10^6 iken, UV ışık altında ışınlanan yüzeylere ait prop-DNA ve hibridizasyon sonucu hedef-DNA için sırasıyla; 2.3×10^6 and 1.15×10^5 olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar ışığında hazırlanan ışık kontrollü DNA çipin *trans* pozisyonu için hesaplanan hibridizasyon % 61 civarında iken çipin UV ışık ile ışınlanması sonucu oluşan *cis* pozisyonu için % 5 dolaylarında kalmaktadır. Bu sonuç, hibridizasyonun ışık ile kontrolünün sağlanabildiği şeklinde yorumlanabilir. Literatürde bu tür ışık kontrollü

akıllı malzemeler üretilmiştir. Kessler ve ark. (2005), ışık-duyarlı azobenzen türü bir bileşik ile peptidleri modifiye etmişler ve bu peptidleri kullanarak hücre büyümesinin ışık ile kontrol edilebildiği akıllı ışık kontrollü bir malzeme üretmişlerdir. Bu malzeme görünür bölgede hücre büyümesine izin verirken UV ışık altında hücre büyümesi büyük ölçüde önlenmiştir [138]. Abel ve ark. (2007) ise yaptıkları bir çalışmada ışık ile büyük oranda kontrol edilebilen bir enzim inhibitörü tasarlamışlardır [239].

6.8. Işık kontrollü DNA çip için Gerçek Numunesi ile Kontrol Çalışması

Bilindiği gibi, Akdeniz Anemisi (Beta-talasemi) ülkemizde en çok görülen kalıtsal hastalıklardan biridir. Hastalık geninin Türkiye'deki ortalama görülme sıklığı % 4–5 kadardır, fakat özellikle güneyde bazı bölgelerde bu oran % 20'lere kadar çıkmaktadır. Beta-talasemi, otozomal resesif (genetik defektin hem anne hem babada taşındığı tipte) kalıtım gösterir. Akraba evliliklerinin yaygın olduğu bölgelerde hastalığın görülme sıklığı artmaktadır [240]. Oldukça küçük ve yapısal olarak basit bir gen olan β -globin geni, 11. kromozomun kısa kolu üzerinde, β -globin gen kümesi içinde yer almaktadır. β -globin geninden hemoglobinin β -globin zincirlerine giden yol üzerindeki mutasyonlar β -talasemiye ya da diğer bir anormal hemoglobine neden olma potansiyeline sahiptir [241]. β -talasemi'nin tanımlanmış olan 31 mutasyonu bulunmaktadır. Bunların içinde, IVS-I-110 Türkiye'de en sıklıkla rastlanan β -talasemi mutasyonudur [242-243]. β -talasemi'ye sahip olan çocuk doğumda normal görünüştedir, Kansızlık 3 – 9 ay arasında kendini gösterir. Bu çocuklar solgun yüzlü, iştahsız ve huzursuz olurlar, uyku uyuyamazlar. Giderek büyüme ve gelişmede yavaşlama, yüz kemiklerinde şekil bozukluğu ve gelişme geriliği oluşur. Tedavi edilmezlerse ilk 5 yaş içinde hayatlarını kaybederler. Talasemide tek tedavi, yaşam boyu ayda bir veya iki kez düzenli olarak filtre ile kan aktarımının yapılmasıdır. Yalnızca kan aktarımı ile tedavi yetersizdir. Çünkü parçalanmış kan hücrelerinden açığa

çıkan demir vücutta birikir. Biriken demir vücut dışına atılmazsa karaciğer, kalp ve diğer organlara zarar verir. Bu zarar engellenmezse, bu defa Talasemili hastanın gelişmesi bu aşamada duraklar ve hasta ergenlik çağında kaybedilebilir. Bunu engellemek için de biriken demiri vücuttan atmak üzere bazı ilaçlar kullanılır [240-243]. Daha öncede belirtildiği gibi hastalık taşıyıcı anne ve babadan çocuğa kalıtım yoluyla geçer. Bu saç rengi, şekli, göz rengi gibi anne ve babadan nakledilen bir özelliktir. Her bir özellik, biri anneden, diğeri babadan gelen bir gen çifti ile belirlenir. (Genler, çeşitli kalıtım özelliklerini içeren birimlerdir). Taşıyıcı grubundaki kişiler hastalık özelliğini genlerinde taşır. Yani anne ve babadan gelen, hastalığı belirleyen gen çiftinin iki kısmından biri hasta diğeri normaldir. Ancak bu kişilerde hastalık belirtileri yoktur. Taşıyıcılar tamamen sağlıklıdır. Fakat anne ve babanın her ikisi de taşıyıcı ise, çocuklarında, her hamilelikte % 25 olasılıkla hastalık çıkabilir. Bu durumda bu hastalığın erken tanısının yapılması oldukça önemlidir.

β -Talasemi hastalığı üzerine geliştirilen ışık kontrollü DNA çip için ticari DNA kullanılarak yapılan çalışmalar sonucunda çipin istenilen şartlarda çalıştığı daha önceki bölümlerde bahsedildiği gibi belirlenmiştir. Bu sonuçlara ek olarak, çip için gerçek kan numunesinden izole edilen DNA örnekleri ile kontrol çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışma için, gerçek kandan izole edilerek PCR'da çoğaltılan, normal (sağlıklı), taşıyıcı ve hastalıklı kan numuneleri *Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Genetik Anabilim Dalı*'ndan temin edilmiştir.

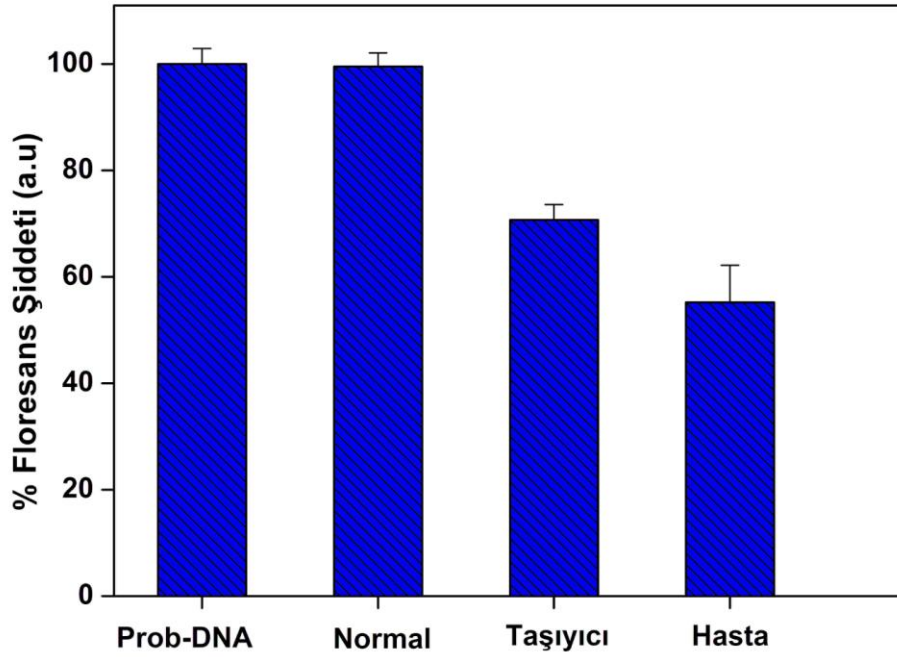
Bu çalışmada, çip'in gerçek numuneler ile güvenilir olarak çalışabilirliğinin incelenmesi esas alınmıştır. Bilindiği gibi PCR ürünü gerçek DNA numuneleri, ticari olarak satın alınan DNA dizilerinden çok daha büyük yapıdadır. Günümüzde piyasada geliştirilen birçok çip'in problemi ticari olarak satın alınarak çalışmaları yapılmış DNA dizileri ile çalışan çiplerin gerçek DNA numuneleri ile istenilen etkinlikte hibridizasyon verememesidir. Bu doğrultuda, ışık kontrollü DNA çip'in gerçek DNA

numuneleri ile de etkili bir hibridizasyon gösterebilmesi çipin ticari amaçlar doğrultusunda hazırlanabilmesi açısından oldukça önemlidir.

Gerçek kandan izole edilmiş ve PCR'da çoğaltılarak hazırlanan pH= 7.4 PCR tamponundaki etiketsiz DNA numuneleri, Cy3 etiketli prob-DNA bağlı ışık kontrollü yüzeyler üzerine damlatılarak hibridizasyonun tamamlanması için 37°C'da 24 saat bekletilmiştir. Burada hibridizasyonun floresans şiddetindeki azalma yardımıyla izlenmesi amaçlamıştır. Cy3 etiketli ışık kontrollü DNA çip yüzeyi üzerine etiketsiz gerçek DNA numuneleri damlatıldığında hibridizasyona bağlı olarak floresans şiddeti azalacaktır.

Şekil 6.46'da gerçek DNA numuneleri ile yapılan kontrol çalışmasına ait yüzeylerin floresans şiddetlerindeki değişim verilmektedir. Burada özellikle hibridizasyon öncesi ve sonrasında floresans mikroskobu ölçümlerinin yüzeylerin aynı yerlerinden alınarak yapılmıştır.

Şekil 6.46 incelendiğinde, Cy3 etiketli prob-DNA bağlı ışık kontrollü DNA çip yüzeyinden alınan floresans şiddeti 100 kabul edilmiştir. Buna bağlı olarak normal (sağlıklı), taşıyıcı ve hastalıklı kan numunelerinden izole edilerek PCR'da çoğaltılan DNA numuneleri ile yapılan hibridizasyon çalışmaları sonucu elde edilen floresans şiddetlerindeki azalışları bağlı olarak grafiğe geçirilmiştir.



Şekil 6.46. Işık kontrollü DNA çipin gerçek kan numunesinde elde edilen DNA dizileri ile hibridizasyonuna bağlı yüzeylerin floresans şiddetlerindeki değişim

Normal-DNA dizisi, sağlıklı bir insan kanından izole edilmiştir ve β -Talasemi hastalığına ait mutasyonlu bir gen dizisine sahip değildir. Dolayısıyla hazırlanan ışık kontrollü DNA çip’de herhangi bir hibridizasyon gözlenmektedir. İlgili grafik incelendiğinde, Prob-DNA dizisine ait floresans şiddetinin sadece % 0.48 civarında bir azalış olduğu görülmektedir. Bu sonuç DNA zincirlerinin hibridizasyonun dışında fiziksel adsorpsiyon ile tutunmaları sonucu etiketli zincirlerin sönümü olarak yorumlanabilir.

Taşıyıcı-DNA dizisi, kendisi β -Talasemi hastası olmayan fakat hastalıklı bir nesil dünyaya gelmesine neden olabilecek mutasyonlu geni taşıyan bir kişiden izole edilmiştir. Bu Taşıyıcı-DNA dizisi ile yapılan hibridizasyon çalışması sonucu çipin floresans şiddetinin yaklaşık % 29.3 azaldığı ve bu oranda bağıl olarak hibridizasyonun gerçekleştiği gözlenmektedir. Taşıyıcı-DNA dizisi de mutasyonlu gen bölgesine sahip olduğundan çipin hibridizasyon vermesi beklenen bir sonuçtur.

Hasta-DNA dizisi, kendisi β -Talasemi hastası olan ve hastalıklı bir nesil dünyaya gelmesine sebep verebilecek bir kişiden izole edilen DNA numunesidir. Yapılan kontrol hibridizasyon çalışması ile hasta-DNA dizisi ile hibridizasyon sonucu χ ip'in floresans şiddetindeki bağıl azalış % 44.8 olarak belirlenmiştir. Bu durumda hibridizasyon gerçek numuneler ile de etkili bir şekilde gözlenmiştir.

Sonuç olarak, ışık ile kontrol edilebilen yeni ve akıllı bir DNA χ ip tasarlanmıştır. Bu DNA χ ip için hazırlama ve çalışma şartları belirlenmiştir. Bu optimum şartlar altında hazırlanan DNA χ ip için hibridizasyonunun büyük oranda ışık ile kontrol edilebildiği görülmüştür. Ayrıca gerçek numuneler ile yapılan hibridizasyon kontrolü çalışmaları sonucunda, χ ip'in gerçek numuneler ile de etkili bir hibridizasyon vererek hasta ve taşıyıcı teşhisinde kullanılabileceği belirlenmiştir.

7. IŞIK KONTROLLÜ YÜZEYLERİN TEORİK TASARIMI

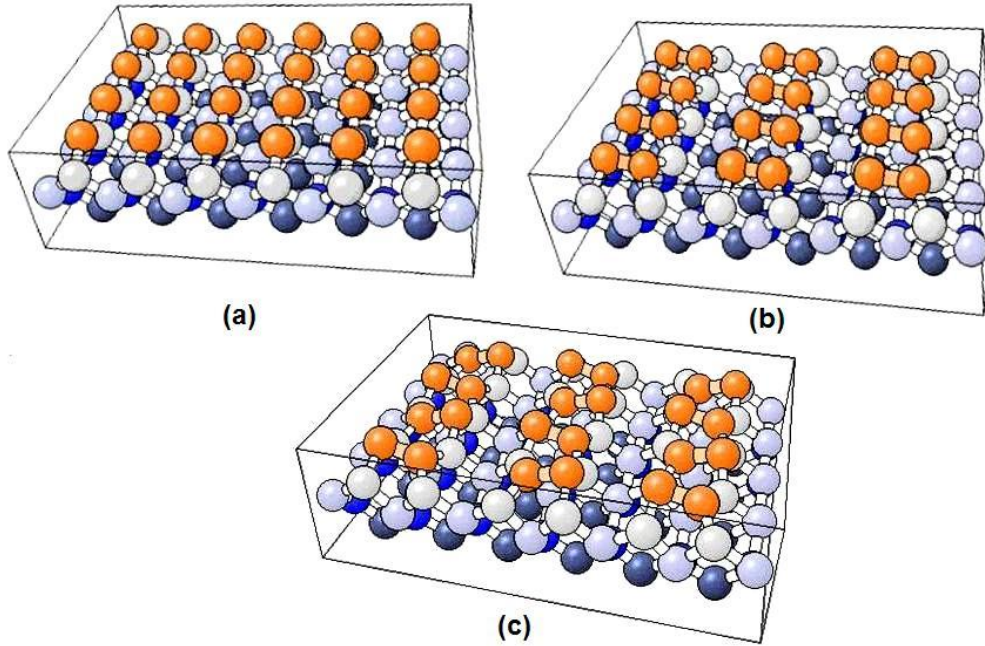
7.1. Teoriksel Metot

Bu çalışmada tüm hesaplamalar bir yoğunluk fonksiyonu teorisi (DFT) temeline dayanan Viyana *ab initio* simulasyon paket programı (VASP) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tek başına GPTS ve APABA molekülleri için yapılan teorik hesaplamalarda, vakum içine alınan moleküllerdeki tüm atomlar serbest bırakılıp en kararlı hallerine ulaşmaları sağlanmıştır. Yüzey modellemesi ise yapay ve yüzey normali boyunca periyodik olarak kurulmuştur. Birim hücreler atomik katmanlardan oluşan yedi tabaka ve buna ek olarak bağlanacak moleküller düşünülerek büyük bir vakum alanı (30 Å) alınmıştır. İlk 4 tabaka ideal temel hal (bulk) pozisyonlarında dondurulmuş ve bunların her biri 2 adet hidrojenle soğurulmuştur. Geri kalan tüm atomik katmanlardaki atomlar ve gönderilen moleküller durulması ve en düşük enerjiye ulaşabilmesi için serbest bırakılmıştır. Elektron-elektron etkileşmesi için, yoğunluk fonksiyonları teorisi (DFT) yerel yoğunluk yaklaşımı (LDA) kullanılmıştır. Korelasyonlar için ise Perdew ve Zunger'in geliştirdiği yöntem kullanılmıştır [150]. Teorik olarak elde ettiğimiz örgü sabiti olan 5.47 Å tüm yüzey hesaplarında kullanılmıştır.

7.2. Si (100) Yüzeyleri

Si(100) yüzeylerindeki dimer oluşumu toplam enerjiyi düşürür. Bu bakımdan, elmas yapılı yarı iletkenler aynı davranışı gösterirler. Yarı iletken yüzeyler üzerindeki bir bileşik, anyonik ve katyonik yüzeylerdeki boş bağlar arasında büyük bir enerji farkına sebep olur. Bu durum, tamamıyla doldurulmuş bağların bulunduğu yüzeylerin anyonik, boş bağların bulunduğu yüzeylerin ise katyonik olmasına neden olur. İdeal ve yapılanmamış Si(100)-1x1 yüzeyindeki iki tane Si atomu bir alt tabakadaki Si atomlarına bağlıdır. Şekil 7.1.a'da şematik olarak gösterilen bu yapılanmamış yüzeydeki her bir Si atomu iki tane bağ yapabilmektedir. Si

(100) yüzeyleri üzerindeki iki Si atomunun birbirine kovalent dimer denilen yapılar oluşmaktadır. Benzer atomlar arasında oluşan yüzey dimerleri simetrik olmaktadır. Diğer taraftan silikon gibi elemental yarı iletkenlerin yüzeyler, bir dimerdeki boş bağ doldurulup diğer dimer boş bırakıldığında dimerler eğilir. Yapılanmış Si(100) yüzeylerindeki atomların dimer oluşturması sonucu, bağ yapıcı bağ sayısı yarıya iner. Bu tür bir dizi boyunca tekrarlayan yeniden yapılanma Si(100)-2x1 olarak adlandırılır (Şekil 7.1.b). Oda sıcaklığında gözlenen bu (2x1) yapılanma düşük sıcaklıklarda eğilmiş dimerlerin c(4x2) şeklinde düzenlenmesi şekilde gözlenmektedir (Şekil 7.1.c) [244,245].

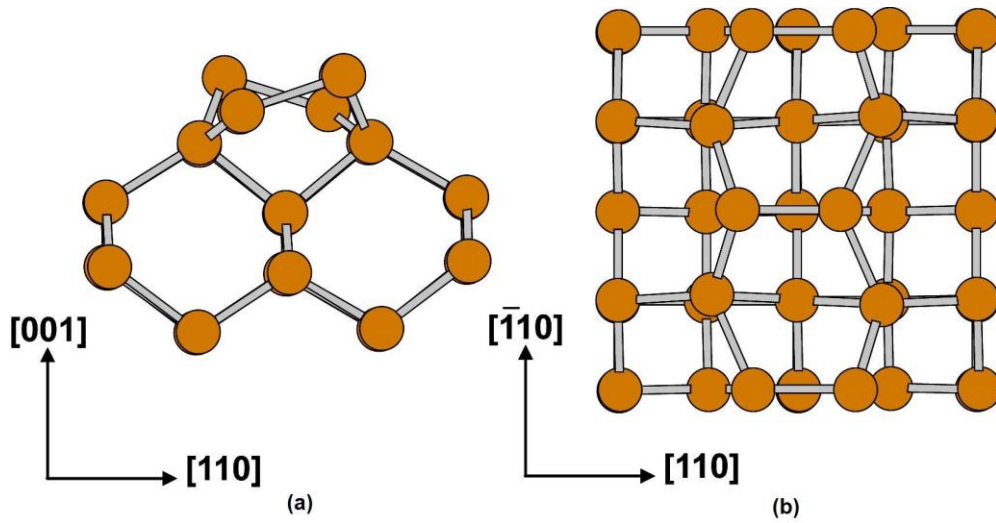


Şekil 7.1. Si(100) yüzeylerinin geometrik şekli; (a) Si(100)-(1x1), (b) Si(100)-(2x2), (c) Si(100)-(4x2) yüzeyinin [250]

Gay ve Srivastava (1999) yaptıkları bir çalışmada bu yapılanmaların dışında (2x2) yeniden yapılanmasının, (2x1) yeniden yapılanmasına göre dimer başına yaklaşık 0.24 eV daha kararlı olduğunu belirlemişlerdir [246]. Asimetrik (2x2) yeniden yapılanmasındaki dimer bağ uzunlukları asimetrik (4x2) yeniden yapılanmasına, (2x1) yeniden yapılanmasına göre daha yakın olduğu yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir [246].

7.2.1. Temiz Si(100)-2x2 yüzeyi

Çalışmada, (2x1) yapılanmasına göre daha kararlı olan (2x2) yapılanması kullanılmıştır. Si(100)-2x2 yüzeyinde Şekil 7.2’de görüldüğü gibi dört tane bağ yapılabilecek dimer bileşeni bulunmaktadır.



Şekil 7.2. Temiz Si(100)-2x2 yüzeyinin; (a) yandan, (b) üstten görünüşü

Temiz Si(100)-2x2 yüzeyi için yapılan optimizasyon çalışması sonucu Si—Si bağ uzunluğu 2.33 Å ve eğim açısı 19° olarak belirlenmiştir. Değişen dimer yapısındaki antifaz da yaklaşık aynı eğim açısı göstermektedir. Bu sonuçlar diğer LDA hesaplamaları ile uyum göstermektedir [246-247]. Fritsch ve Pavone (1995), Si(100)-2x2 yüzeyi için yaptıkları teorik hesaplamalar sonucunda Si—Si bağ uzunluğunu 2.33 Å olarak bulmuşlardır [245].

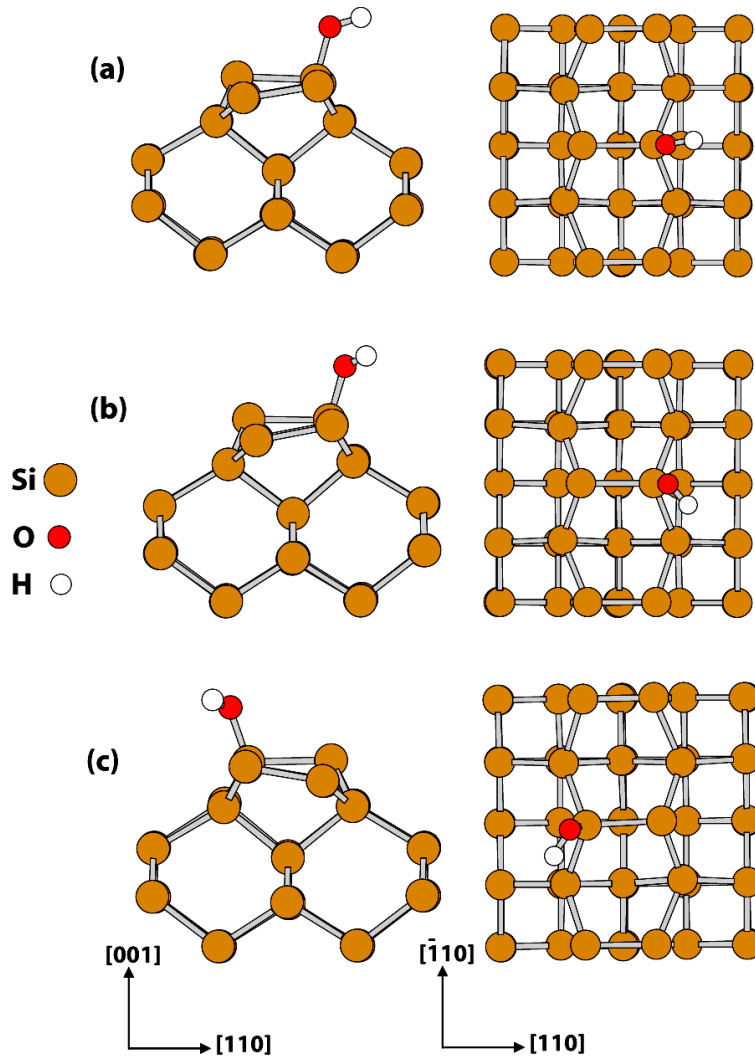
7.2.2. Kısmen hidrksillenmiş Si(100)-2x2 yüzey

GPTS molekülleri alkoksisilan türü bileşiklerdir. Bu tür bileşiklerin yüzey üzerine tek tabaka oluşumunda bağlanabilmesi için hidroksil (-OH) gruplarının varlığı önemlidir [248]. Bilindiği gibi Si(100)-(2x2) birim hücresinde 4 adet dimer bileşeni mevcuttur. Bu bağ yapabilecek Si

atomlarına GPTS moleküllerinin üçlü bağlanma yapacağı göz önüne alınarak bir adet hidroksil grubu ($-OH$) üç farklı bağlanma orientasyonunda bağlanmıştır (Şekil 7.3). Bu şekilde yüzeyler kısmen hidroksillenmiş ve yapılan durulma sonucunda hidroksil grupları için en uygun geometri belirlenmiştir.

Önerilen modeller için en düşük enerjili model temel alınarak bağıl enerji değerleri hesaplanmıştır. Önerilen modellere ait bağıl enerji değerleri sırasıyla model (a), (b) ve (c) için sırası ile 0.02, 0.01 ve 0.00 eV olarak bulunmuştur. En düşük enerjili kısmen hidroksillenmiş Si(100)-2x2 yüzeyinin Model (c) olduğu belirlenmiştir. Kısmen hidroksillenerek durulmuş tüm modellerde Si(100)-2x2 yüzeylerindeki Si—Si dimerlerinin başlangıç durumlarının aksine asimetrik durumdan simetrik duruma geçtiği gözlenmektedir.

En kararlı Model (c) için Si dimer bağ uzunluğu 2.39 Å'a artmıştır. Bu sonuç Kanai ve ark. (2005) tarafından yapılan bir çalışmada, Si—Si bağ uzunluğu 2.37 Å olarak bulunmuştur ve bu çalışmada bulunan değer ile uyum içerisinde [247]. Ayrıca Si—O bağ uzunluğu literatürle uyumlu olarak 1.68 Å olarak bulunmuştur [250]. Bir diğer önemli parametre olan O—H bağ uzunluğu 0.99 Å olarak belirlenmiştir. Sque ve ark. (2006) ise elmas yüzey üzerinde O—H bağ uzunluğunun 1.01 Å olduğunu yaptıkları teorik hesaplamalarda göstermişlerdir [249].



Şekil 7.3. Kısmen hidroksillenmiş Si(100)-(2x2) yüzeyler için önerilen, (a) Model a, (b) Model b ve (c) Model c modellerinin yandan ve üstten görünüşü

7.3. Epoksi-sonlu yüzeylerin teorik tasarımı

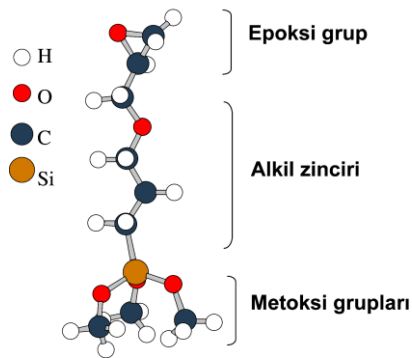
7.3.1. GPTS molekülü

Işık kontrollü yüzeyler, kendiliğinden düzenlenme yöntemi kullanılarak oluşturulan iki tabakalı bir tasarım ürünüdür. Bu çoklu tabakalı sistemin ilk tabakasını oluşturmak için epoksi-sonlu bir molekül olan (3-Glisidoksipropil)trimetoksisilan (GPTS) molekülü kullanılmıştır. GPTS molekülü bir organosilan molekülüdür ve yapısındaki metoksi (-OCH₃)

gruplarının ayrılması ile yüzeye bağlanma özelliği göstermektedir. Literatür incelendiğinde bu tip moleküllerin her üç metoksi grubunu da kaybederek yüzey kovalent olarak polimerleşerek veya doğrudan bağlanmasının daha kararlı yapılar oluşturduğu bilinmektedir [152]. GPTS moleküllerinin yapısında bulunan metoksi grupları örnek yüzeylere bağlanmada önemli bir rol oynamaktadır [153]. GPTS molekülü yapısında bulunan epoksi halkası nedeniyle kolaylıkla $-NH_2$, $-COOH$ and $-SH$ gibi fonksiyonel gruplara bağlanabilmektedir [154-156]. Bu özelliklerinden dolayı; birçok biyoteknolojik malzemenin üretilmesinde kullanım alanına sahiptir [157-159].

Öncelikle GPTS molekülünün tek başına en kararlı moleküler yapısının belirlenmesi amacıyla teorik hesaplamalar yapılmıştır. Daha sonra ise GPTS molekülü için üç metoksi grubunu kaybederek Si(100) yüzeyi üzerine bağlanmasına ait adsorpsiyon enerjisi ve yüzey üzerindeki moleküler geometrisi teorik hesaplamalar ile aydınlatılmaya çalışılmıştır.,

Bölüm 7.1’de teorisi anlatıldığı gibi, GPTS molekülü 20 Å vakum alanı içinde düşünülerek bütün atomların serbest bir şekilde hareket ederek en düşük enerjili oldukları en uygun geometriyi elde etmeleri sağlanmıştır. Şekil 7.4’de GPTS molekülünün DFT kullanılarak yapılan teorik hesaplamaları sonucunda elde edilen en düşük enerjili en uygun geometrisi verilmektedir.

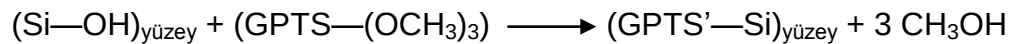


Şekil 7.4. GPTS molekülünün relaksasyonu sonucu elde edilen geometrik yapısı

Molekölün en olası geometrik yapısının belirlenebilmesi için yapılan durulma sonucunda, GPTS yapısındaki alkil zincirindeki C—H, C—C ve C—O bağ uzunlukları sırası ile 1.10 Å, 1.51 Å ve 1.39 Å olarak belirlenmiştir. Bunun yanında molekülün epoksi halkasındaki C—C ve C—O bağ uzunlukları sırası ile 1.45 Å ve 1.42 Å iken halkadaki C—O—C bağ açısı ise 59.2° olarak hesaplanmıştır. GPTS molekülüne ait metoksi gruplarındaki Si—O bağ uzunluğu ise 1.83 Å olarak belirlenmiştir. Teorik olarak bulunması gereken bağ uzunlukları ise sırayla 1.0 Å, 1.07 Å, 1.54 Å ve 1.43 Å değerindedir [250]. Motto ark. (2005) ise C—H ve C—O bağ uzunlukları sırası ile 1.11 Å ve 1.39 Å olarak belirlemişlerdir [251]. Bulunan sonuçlar literatürde yapılan çalışmalar sonucu bulunan bağ uzunlukları ile oldukça iyi bir şekilde uyum göstermektedir [252, 253]. GPTS molekülü için yapılan teorik hesaplamalar sonucunda; moleküler boyu 12.62 Å ve HOMO-LUMO boşluğu ise 4.59 eV olarak bulunmuştur.

7.3.2. GPTS bağlı Si(100)-(2x2) yüzeylerinin teoriksel tasarımı

GPTS moleküllerinin hidroksillenmiş silikon yüzeyleri üzerine kimyasal olarak bağlanmasına ait deneysel olarak gerçekleştirildiği düşünülen ilgili tepkime şematik olarak aşağıda verilmiştir [153].



Si(100) yüzeyler üzerinde bulunan hidroksil grupları ile GPTS molekülünün yapısında bulunan metoksi grupları arasında bir kimyasal reaksiyon gerçekleşir ve bu kimyasal bağlanma sonucunda metanol molekülü açığa çıkmaktadır [153,174]. Deneysel olarak, organosilan moleküllerinin bu şekilde ilgili yüzeyler üzerine kimyasal bağlanmasında; reaksiyon zamanı, sıcaklık, çözücünün cinsi ve pH gibi birçok etken moleküllerin yüzey üzerindeki bağlanma oluşumlarını etkilemektedir [153, 174, 254]. Bu nedenle, organosilan türevi bir bileşik olan GPTS moleküllerinin Si(100)-2x2 yüzeyleri üzerine tek tabaka oluşumunun teorik olarak hesaplanması hazırlanan sistem için önemli bir parametredir.

GPTS moleküllerinin kısmen hidroksillenmiş Si(100)-2x2 yüzeylere bağlanması ile ilgili olarak üç noktalı bağlanma modeli göz önüne alınmıştır. Bu amaç ile iki olası model önerilmiştir (Şekil 7.5). İlgili şekil incelendiğinde, GPTS molekülü Si(100) yüzey üzerine iki farklı model kullanılarak üç noktalı olarak bağlanmış ve boşta kalan dimer bileşeni yüzeyin başlangıçta hidroksillenerek aktif hale getirildiği düşünülerek –OH molekülü ile doldurulmuştur. GPTS moleküllerinin Si(100)-2x2 yüzeylerine bağlanmasına ilişkin önerilen modellerin hangisinin daha kararlı olduğunun teorik olarak belirlenebilmesi amacıyla, önerilen modeller için GPTS moleküllerinin Si(100) yüzey üzerine teorik adsorpsiyon enerjileri Eş.7.1 kullanılarak hesaplanmıştır [255-256] .

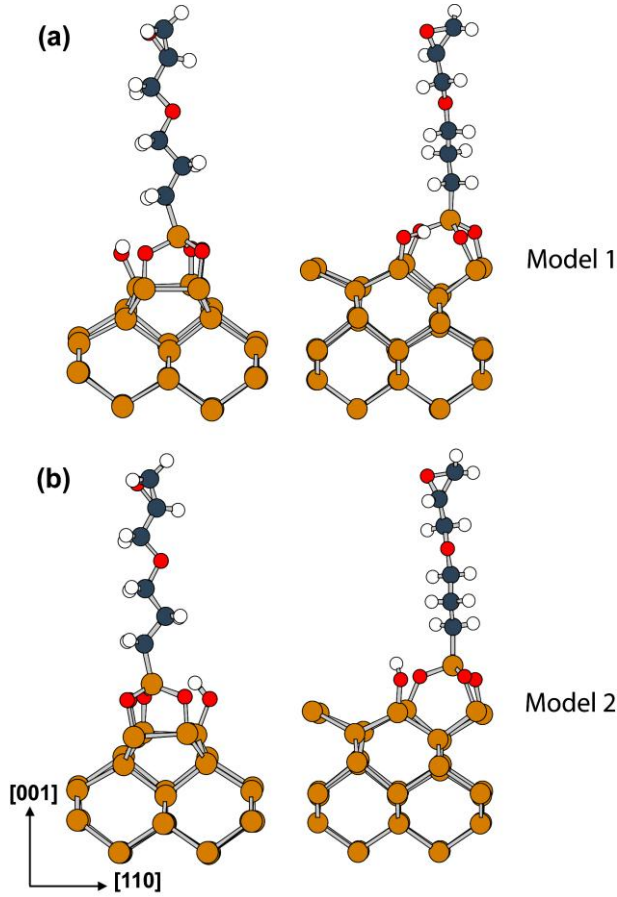
$$E_{ads} = E_{(Si-OH+GPTS)} - (E_{Si-OH} + E_{GPTS}) \quad (7.1)$$

İlgili eşitlikte verilen, $E_{(Si-OH+GPTS)}$; hidroksillenmiş Si(100)-2x2 yüzeylerine GPTS bağlı sistemin toplam enerjisini, E_{Si-OH} ; tek dimer'i –OH ile doyurulmuş hidroksillenmiş Si(100)-2x2 yüzeyine ait toplam enerjiyi ve E_{GPTS} ise GPTS molekülünün metoksi (-OCH₃) gruplarını kaybetmiş halinin toplam enerjisini ifade etmektedir.

Eş. 7.1 kullanılarak yapılan teorik hesaplamalar sonucunda, Model 1 için adsorpsiyon enerjisi 10.01 eV olarak hesaplanırken, Model 2 için ise 9.23 eV olarak belirlenmiştir. Bu durumda, daha büyük adsorpsiyon enerjisine sahip Model 1 daha kararlı bir yapı oluşturmaktadır [255-256]. GPTS moleküllerinin Si(100)-2x2 yüzeyi üzerine kimyasal olarak bağlanmasında Model 1'in 0.78 eV daha kararlı olduğu yapılan teorik hesaplamalar sonucunda belirlenmiştir.

Si(100) yüzey üzerine GPTS moleküllerinin daha kararlı olarak bağlandığı belirlenen Model 1 için yüzeylerdeki Si—Si bağ uzunluğu 2.41 Å olduğu gözlenirken, GPTS molekülünün üç noktadan bağlanması ile beraber

oluşan Si—O bağ uzunlukları ise 1.65 Å ile 1.69 Å arasında değişmektedir. GPTS molekülüne ait düzlemsel epoksi halkasındaki C—O bağ uzunluğu 1.42 Å ve C—O—C bağ açısı ise 61.7° olarak belirlenmiştir. Bulunan bağ uzunluğu literatürde bulunan değerler ile uyum içindedir [252]. Ayrıca, GPTS molekülünün yüzeyden itibaren moleküler boyu 12.06 Å olarak bulunmuştur. Yapılan teorik hesaplamalar sonucu GPTS moleküllerinin Si(100)-2x2 yüzeyi üzerindeki en olası geometrisi ve moleküler boyu aydınlatılmıştır.



Şekil 7.5. GPTS molekülünün (a) Model 1 ve (b) Model 2 olmak üzere Si(100)-2x2 yüzeyine farklı modellerde bağlanması

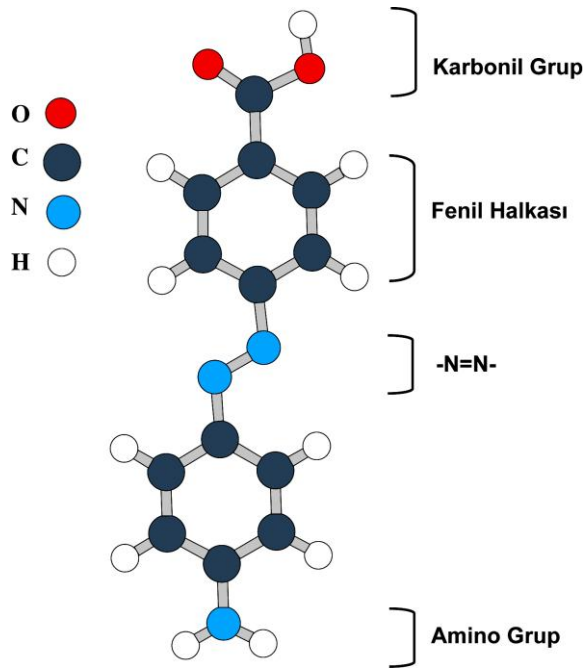
7.4. Işık kontrollü yüzey tasarımı için teorik hesaplamalar

Işık kontrollü Si(100)-2x2 yüzeyleri, ışık-duyarlı APABA molekülü kullanılarak tasarlanmıştır. APABA molekülünün epoksi-sonlu yüzeylere bağlanma özellikleri ve fotoisomerizasyon sırasındaki konformasyonel değişimi hazırlanan ışık kontrollü sistem için önemli parametreleri oluşturmaktadır. Işık kontrollü bu DNA çip içerisindeki ışık-duyarlılığını sağlayan APABA molekülü birimlerinin fotoizomerizasyon sırasındaki geometrisi, moleküler boyu ve durum enerjisi yapılan teorik hesaplamalar ile aydınlatılmıştır.

7.4.1. APABA molekülü

Yeni ve akıllı bir sistem olarak geliştirilen bu ışık kontrollü DNA çip'deki hibridizasyon kontrolü APABA molekülü kullanılarak ışık ile sağlanacaktır. Işık-duyarlı moleküllerin konformasyonel değişimleri bu tür moleküllerin kullanımları açısından oldukça önemli bir parametredir. Bu amaçla, hazırlanan ışık kontrollü DNA çip içerisindeki ışık-duyarlılığını sağlayan APABA molekülünün fotoizomerizasyon sırasındaki geometrisi, moleküler boyu ve durum enerjisi önemli parametreleri oluşturmaktadır. Öncelikle serbest APABA molekülü için epoksi-sonlu yüzey üzerine bağlanmadan önce kimyasal özelliklerinin belirlenebilmesi amacıyla teorik hesaplamalar yapılmıştır.

APABA molekülü genel olarak üç ana birimden oluşmaktadır. Şekil 7.6'de görülebileceği gibi APABA molekülü, bir amino grup, bir karbonil grup, iki fenil halkası ve konformasyonel değişimin olmasını sağlayan $-N=N-$ grubundan oluşmaktadır. APABA molekülünün yapısında bulunan $-N=N-$ grubu molekülün fotoizomerizasyon özelliği göstermesini sağlamaktadır.



Şekil 7.6. trans-APABA molekülünün yapısı ve fonksiyonel grupları

APABA molekülü belli dalga boyundaki ışık altında yapısındaki fenil halkalarının $-N=N-$ bağı etrafında serbestçe dönmesi sonucu *trans* ve *cis* hale geçebilmektedir. Bu fotoizomerizasyon özelliği nedeniyle APABA molekülü *photoanahtar* molekül olarak adlandırılabilir. Buna ilaveten yapıdaki amino grubu da diğer aktif moleküllerin (örneğin; protein, DNA ve doku gibi) kendisine kolaylıkla bağlanmasına yardımcı olmaktadır. Genelde organik moleküller yapılarında gerçekleşen birçok konformasyonel değişim arasındaki ufak enerji değişiklikleri ile karakterize edilirler [244-245]. APABA molekülünde bu enerji farklılıkları temel olarak ışık kontrolü ile $-N=N-$ etrafında serbest hareket edebilen fenil halkalarından kaynaklanmaktadır.

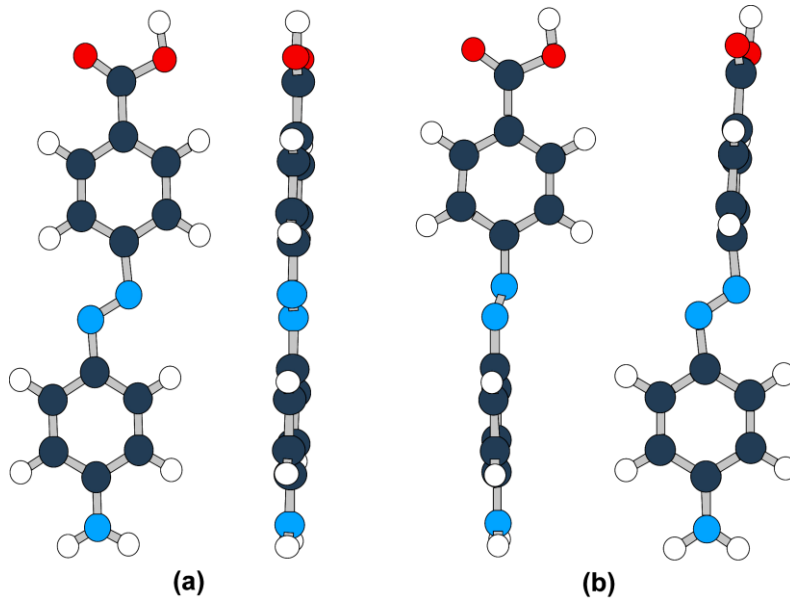
APABA molekülü 20 Å'luk tekrarlayan kübik kutular içinde düşünülerek yapılan hesaplamalar minimum enerjili yapı elde edilene kadar devam etmiştir. Molekülün en kararlı hali kazanana kadar gerçekleşen serbest hareketi sonucunda elde edilen en kararlı geometrideki *trans*-APABA molekülü için önemli bağ uzunlukları Çizelge 7.1'de verilmiştir.

Çizelge 7.1. APABA molekülü için hesaplanan bağ uzunlukları (Å). r_{1-2} ; atomların kovalent yarıçapları toplamı [257]

	$r_{N=N}$	r_{C-N}	$r_{C-C(C-Ph)}$	$r_{C-N(Ph-NH_2)}$	$r_{C=O}$	r_{C-O}
APABA	1.28	1.37	1.38-1.41	1.38-1.41	1.23	1.37
$r_{1-2}^{[257]}$	1.00	1.07	1.54	1.43	1.29	1.51
Literatür ^[264]	1.28	1.03	1.37-1.48	1.40-1.41	1.25	1.37

Çizelge 7.1 incelendiğinde, *trans*-APABA molekülü için yapılan teorik hesaplamalar sonucunda elde edilen sonuçların literatür ve teorik değerler ile uyum içerisinde olduğu görülmektedir. Ayrıca, *trans*-APABA molekülü için moleküler boy 16 Å ve HOMO-LUMO boşluğu 1.87 eV olarak bulunmuştur.

APABA molekülü görünür bölgede (450 nm) *trans* konumda bulunmaktadır. Literatür incelendiğinde, bu tip azobenzen tipi ışık-duyarlı moleküller için bu konumun en kararlı hal olduğu bilinmektedir [257]. APABA molekülünün *trans* hali için; Model A ve Model B olmak üzere olası iki model önerilmiştir. Bu önerilen olası modeller Şekil 7.7’de verilmiştir.



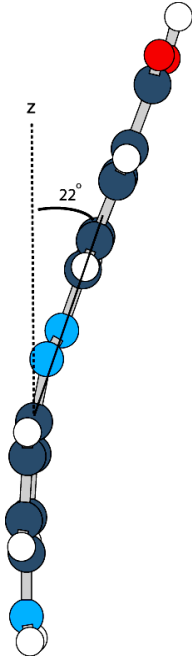
Şekil 7.7. *trans*-APABA molekülü için önerilen olası geometriler;
(a) Model A, (b) Model B

Trans-APABA molekülü için önerilen bu modeller incelendiğinde; Model A'da halkalar *trans* durumda aynı yöne doğru durmakta iken Model B'de halkalar birbirlerinden farklı yönlerde doğru dönmüş durumdadır. Bu iki olası geometri için yapılan geometrik optimizasyon sonucunda; Model A 0.228 eV daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Bu sonuç halkaların *trans* konumda aynı yöne doğru durmasının daha kararlı olduğunu kanıtlamaktadır.

APABA molekülü 366 nm UV ışık altında $-N=N-$ bağı etrafında dönerek *cis* konumuna geçmektedir. Burada önemli olan $-N=N-$ bağı etrafında halkaların kaç derece bükülerek dönebileceğidir. APABA molekülünün *cis* formasyonundaki en kararlı ve en olası yapısını belirlemek amacıyla molekül $-N=N-$ bağı etrafında çeşitli açılarda beş farklı model düşünülerek bükülmüş. Önerilen her bir model için oluşan geometrilerin enerjileri ve olası açıları hesaplanmıştır.

APABA molekülü *trans* konumda iken fenil halkaları, $-N=N-$ bağına göre 180° olacak şekilde bulunmaktadır. APABA molekülünün *cis*

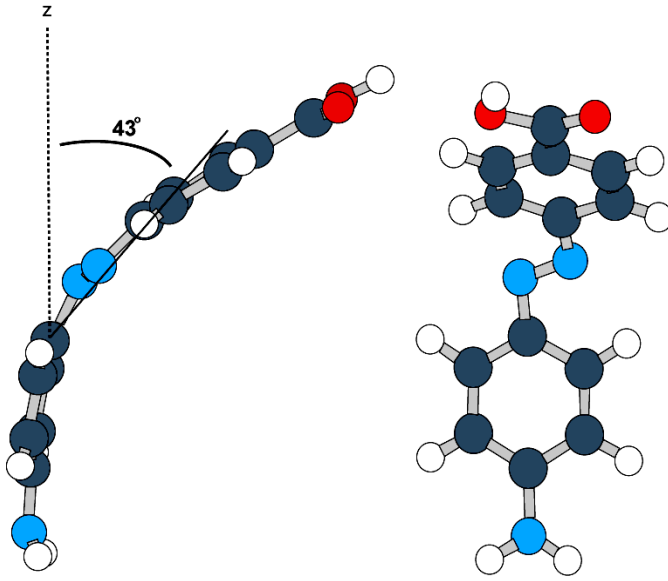
formasyonları incelenirken ilk önce, z ekseninden 22° açı ile bükülmüş olan *cis1*-APABA modeli önerilmiştir (Şekil 7.8).



Şekil 7.8. *cis1*-APABA molekülünün en olası geometrisi

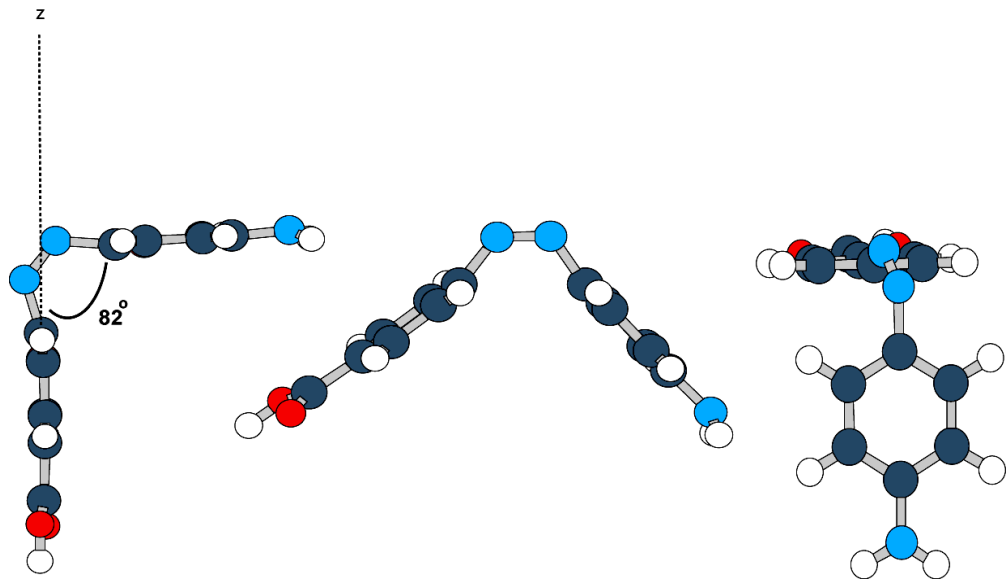
cis1-APABA modelinde APABA molekülü *trans* konumdan *cis* konuma geçişi için 22° bükülmüştür. Yapılan geometrik optimizasyon sonucunda *cis1*-APABA molekülünün boyu 13.80 Å olarak bulunmuştur.

APABA molekülü $-N=N-$ bağı etrafında 43° bükülmesine ait önerilen *cis2*-APABA modeli Şekil 7.9'da verilmiştir. Bu model için yapılan optimizasyon sonucunda moleküler boyu 12.63 Å olarak belirlenmiştir.



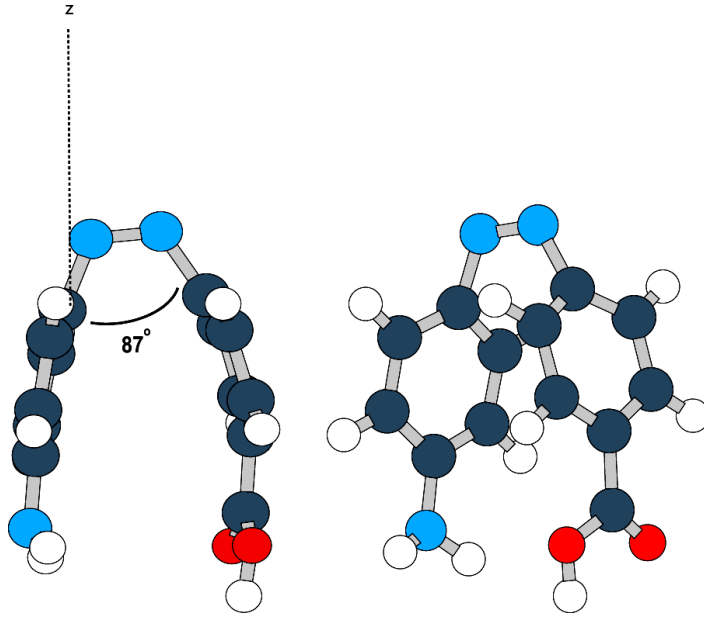
Şekil 7.9. *cis2*-APABA molekülünün en olası geometrisi

APABA molekülü, $-N=N-$ bağının etrafında 82° bükülerek model *cis3*-APABA önerilmiştir. Şekil 7.10'da görüleceği gibi molekül azot bağlarından ikiye bükülmüştür ve yeni olası bir model önerilmiştir. Bu önerilen yeni modele göre moleküler boy $10.48 \text{ \AA}$ olarak hesaplanmıştır.



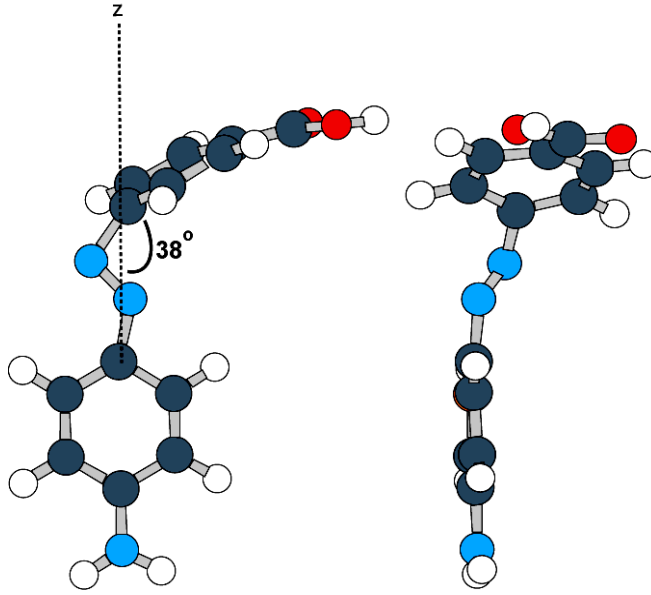
Şekil 7.10. *cis3*-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü

Şekil 7.11’de görüldüğü gibi *cis4*-APABA modelinde ise molekül azot bağı etrafında 87° bükülmüştür. Bu şekildeki geometri için optimizasyon sonucunda moleküle boy 7.08 Å olarak belirlenmiştir.



Şekil 7.11. *cis4*-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü

Ayrıca APABA molekülü için konformasyonel modelleme çalışmasında *cis* konformasyonu için halkaların yönlerinin farklılığında oluşabilecek enerji değişimi de model *cis5*-APABA’da incelenmiştir. Şekil 7.12’de görüldüğü gibi halkalardan biri diğerine ters yönde olacak şekilde molekül 38° bükülerek yeni bir geometri belirlenmiştir. Yapılan teorik hesaplamalar sonucunda, optimum moleküler boy 11.90 Å olarak hesaplanmıştır.



Şekil 7.12. *cis5*-APABA molekülünün farklı yönlerden görünüşü

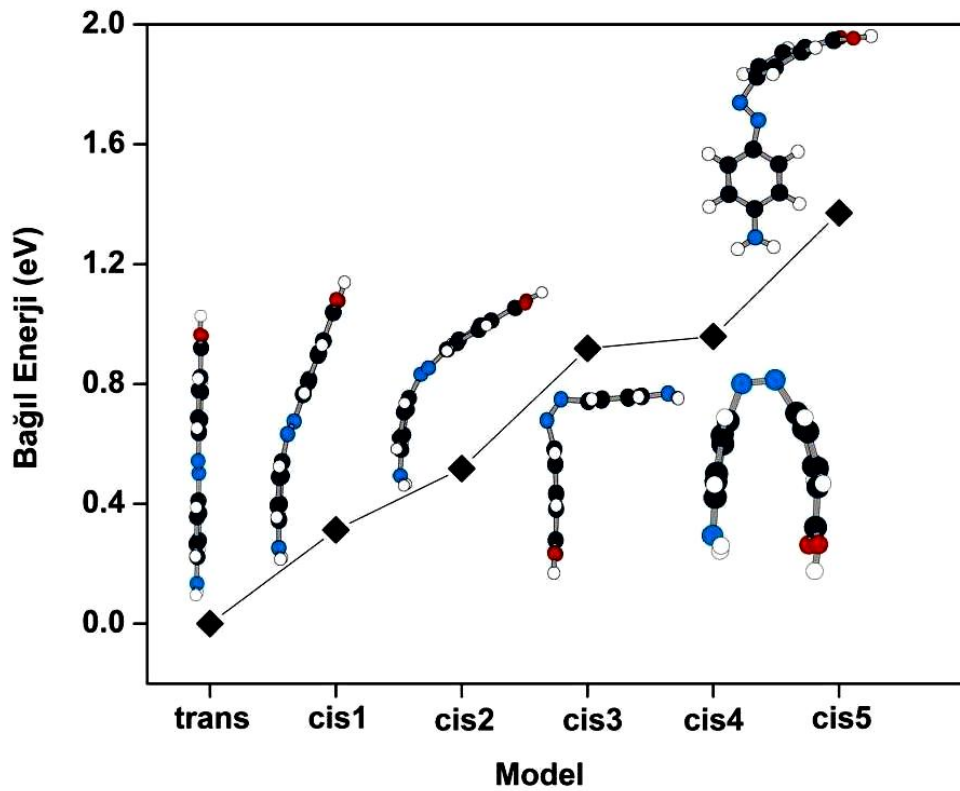
Yapılan optimizasyon çalışmalarından anlaşılabacağı gibi ışık-duyarlı APABA molekülü en kararlı geometrisine *trans* halde iken sahiptir. Molekülün *trans* konumundan *cis* konumuna geçişinde enerji giderek büyümekte ve molekül daha kararsız bir hal almaktadır.

APABA molekülünün *trans-cis* dönüşümü için önerilen modellerin bağıl enerjileri Çizelge 7.2.'de toplu olarak verilmektedir. Önerilen modellere ait olan bağıl enerjiler, yapılan hesaplamalar sonucunda en kararlı olduğu belirlenen *trans*-APABA molekülüne göre hesaplanmıştır. *trans*-APABA molekülünün enerjisi sıfır kabul edilerek, *trans-cis* dönüşümü için önerilen diğer modellere ait enerjiler buna göre sıralanmıştır.

Çizelge 7.2. Farklı konformasyonlardaki APABA molekülü için bağıl enerjiler

Modeller	<i>trans</i>	<i>cis1</i>	<i>cis2</i>	<i>cis3</i>	<i>cis4</i>	<i>cis5</i>
Bağıl Enerjiler(eV)	0	0.313	0.518	0.919	0.959	1.371

APABA molekülünün *trans-cis* dönüşümü için önerilen modellerin en kararlı oldukları geometrilerine ait bağıl enerji değişimleri Şekil 7.13’de grafiksel olarak verilmiştir.



Şekil 7.13. APABA molekülü için *trans-cis* konformasyonel değişimine ait modellerin bağıl enerji değişimleri

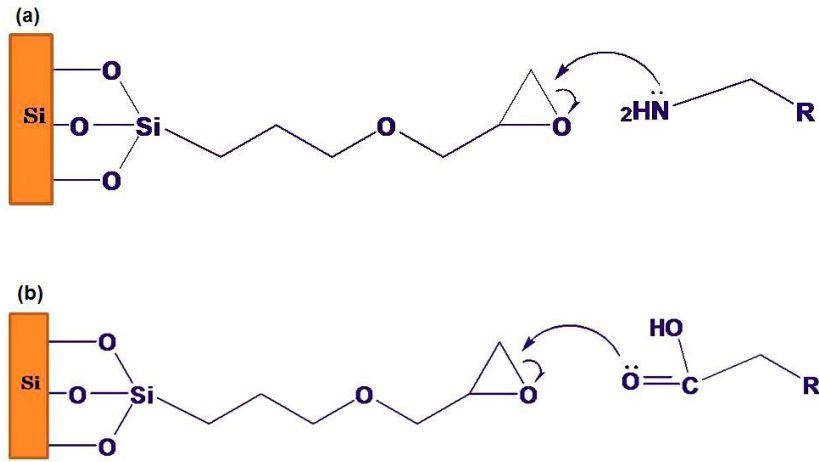
APABA molekülü *trans* konumdan *cis* konuma geçtikçe enerjisi artmakta ve daha kararsız bir yapı kazanmaktadır. Bilindiği gibi APABA molekülü 450 nm görünür bölgede *trans* halde bulunmaktadır. Bu da molekülün oda

koşullarında kararlı olduğunu göstermektedir. Fakat molekülün *cis* hale geçmesi için 366 nm UV gerekmektedir bu da daha yüksek enerjili bir ışınlama demektir [180]. İki farklı dalga boyunda ışınlendiğinde farklı konformasyonlara sahip olan APABA molekülü için bu iki konformasyon arasındaki enerji farkı 0.64 eV olarak hesaplanmıştır. Bu deneysel sonuca göre, APABA molekülü *cis* hale dönmek için enerjiye gereksinim duymaktadır. Ayrıca önerilen modellerin bağıl enerjileri incelendiğinde *cis2* ve *cis3* modellerinin, teorik olarak hesaplanan 0.64 eV enerji değerine yakın enerjiye sahip oldukları görülmektedir. Bu durumda APABA molekülünün bu iki modele yakın bir konformasyonda *cis* hale döndüğü düşünülebilir. Bu yapılan teorik hesaplamalar ile APABA molekülünün olası geometrileri ve enerjileri belirlenmiştir.

7.4.2 Işık kontrollü çok tabakalı yüzeylerin hazırlanma mekanizması

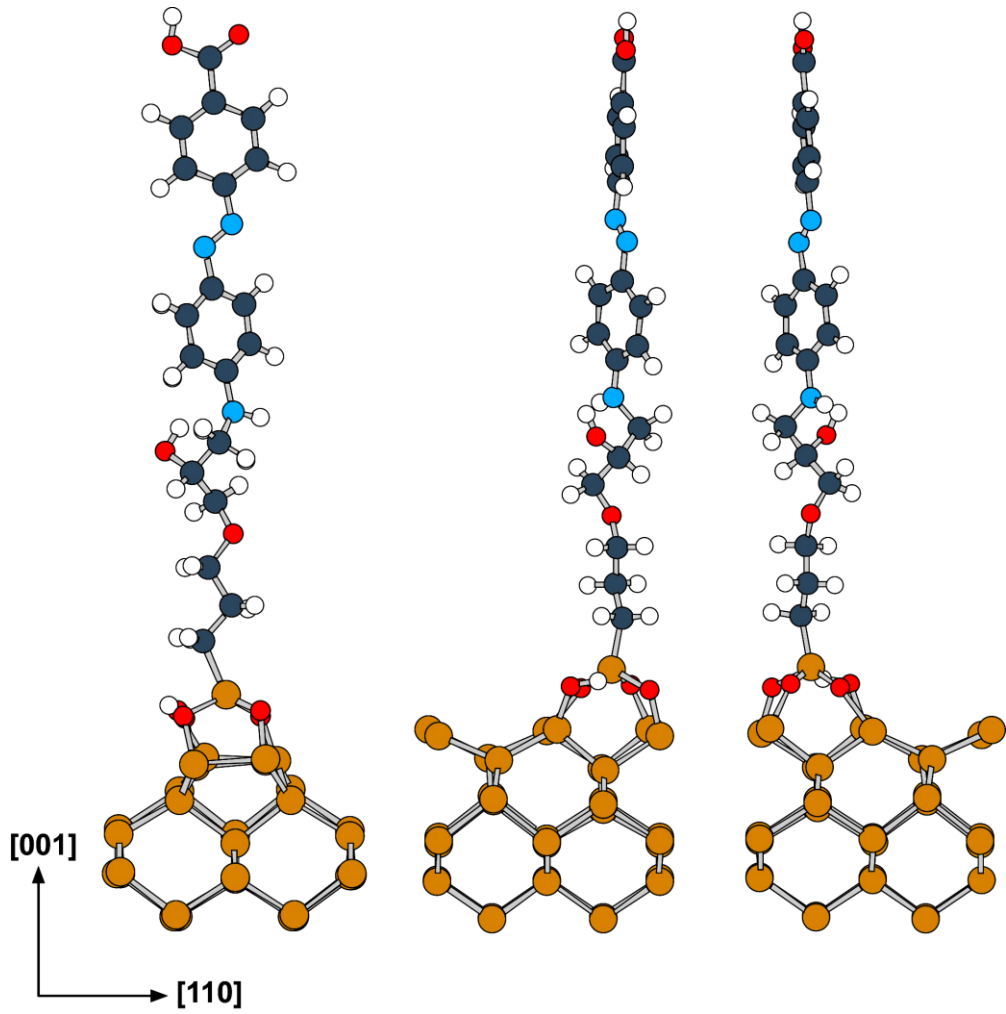
Işık kontrollü yüzeyler çok tabakalı bir sistem kullanılarak hazırlanmıştır. Bu sistem için ilk tabaka GPTS moleküllerinin kullanılmasıyla hazırlanan epoksi-sonlu yüzeyler, ikinci tabaka ise ışık-duyarlı APABA molekülünün, bu epoksi-sonlu yüzeyler üzerine bağlanması ile oluşturulmaktadır. Bu durumda ışık kontrollü yüzeylerin hazırlanmasında GPTS molekülleri ve APABA molekülleri arasındaki etkileşim önemli bir parametreyi oluşturmaktadır.

APABA molekülünün GPTS moleküllerine kimyasal olarak bağlanabilecek amino ($-NH_2$) ve asit ($-COOH$) fonksiyonel uç gruplarından oluşan iki aktif bölgesi bulunmaktadır. APABA molekülü yapısındaki bu fonksiyonel grupları kullanarak GPTS-modifiye yüzeyler üzerinde bulunan epoksi halkasını aşağıda verilen mekanizma doğrultusunda her iki fonksiyonel uç grubu tarafından açarak bağlanabilir [153, 174].



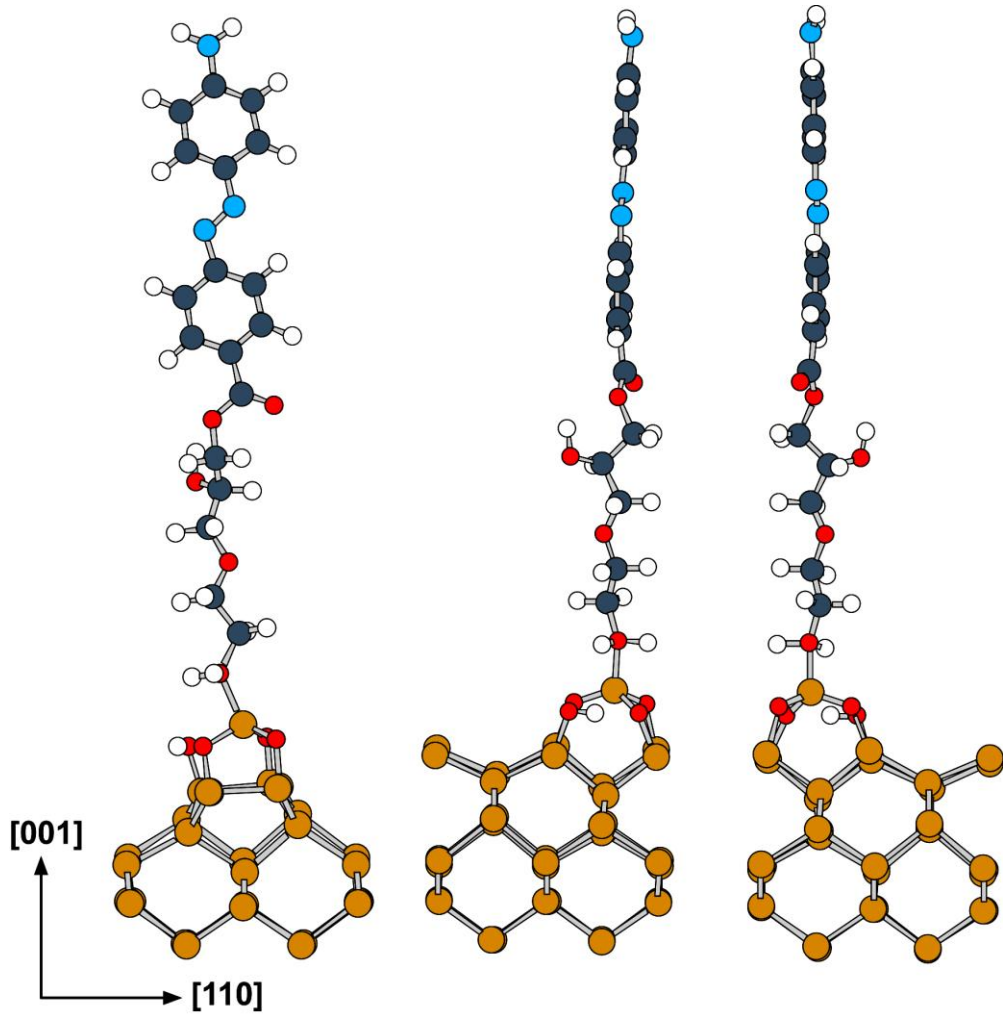
Şekil 7.14. GPTS-modifiye yüzeylerdeki epoksi halkasının; (a) $-\text{NH}_2$ fonksiyonel grubuyla (b) $-\text{COOH}$ fonksiyonel uç grubundan açılmasının şematik gösterimi

Bu aktif fonksiyonel uçlardan hangisinin GPTS molekülüne ait epoksi halkası daha aktif bir şekilde açacağını belirlemek amacı ile APABA molekülünün *trans* ve *cis* yapıları için teorik hesaplamalar yapılmıştır. Öncelikle APABA molekülünün, GPTS molekülüne $-\text{NH}_2$ (Model 1) ve $-\text{COOH}$ (Model 2) uçlarından *trans* olarak bağlanmasına ait iki farklı model önerilmiştir. Model 1’de epoksi sonlu yüzeylere APABA molekülünün $-\text{NH}_2$ fonksiyonel uç grubu kullanılarak bağlanmıştır. Bu durumda epoksi halkası $-\text{NH}_2$ kullanılarak açılmış APABA molekülü epoksi-sonlu yüzeylere kimyasal olarak bağlanmış ve asit sonlu ışık kontrollü yüzeyler elde edilmiştir.



Şekil 7.15. *trans*-APABA molekülünün epoksi-sonlu yüzeye $-NH_2$ fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi (Model 1)

APABA moleküllerinin *trans* konumda bağlanmasına ait diğer bir model olan Model 2'de ise epoksi-sonlu yüzeylere APABA molekülü $-COOH$ uç grubu kullanarak bağlanmıştır. Burada, epoksi halkası asit uç grubu ile açılmış ve APABA molekülü *trans* konumda kimyasal olarak ilgili yüzeye bağlanmıştır. Bu model kullanılarak amino-sonlu ışık kontrollü yüzey elde edilmiştir.

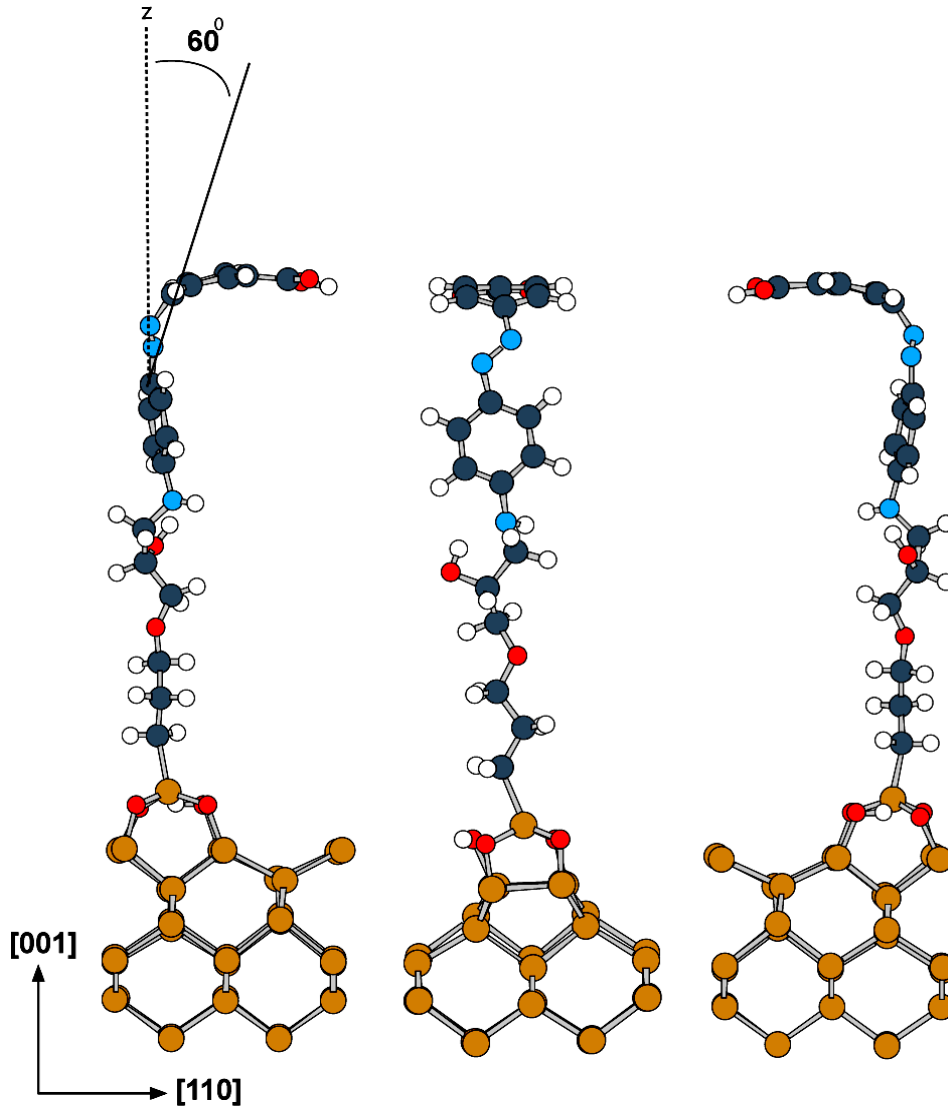


Şekil 7.16. *trans*-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi (Model 2)

trans-APABA moleküllerinin bağlanmasına ait önerilen, Model 1 ve Model 2 için yapılan optimizasyon çalışması sonucunda APABA molekülünün epoksi-sonlu yüzeylere –NH₂ uç grubundan bağlanmanın 0.43 eV daha kararlı olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte, yapılan optimizasyon sonucu Model 1 ve Model 2 için yüzeyden itibaren moleküler boyları sırasıyla; 25.80 Å ve 25.97 Å olarak hesaplanmıştır. Sonuç olarak, *trans*-APABA moleküllerinin epoksi-sonlu yüzeyler üzerine –NH₂ uç grubunu kullanarak bağlandığı ve bu şekilde APABA molekülüne ait asit uç grubunun bir sonraki aşamada DNA moleküllerinin bağlanması için açıkta kaldığı belirlenmiştir.

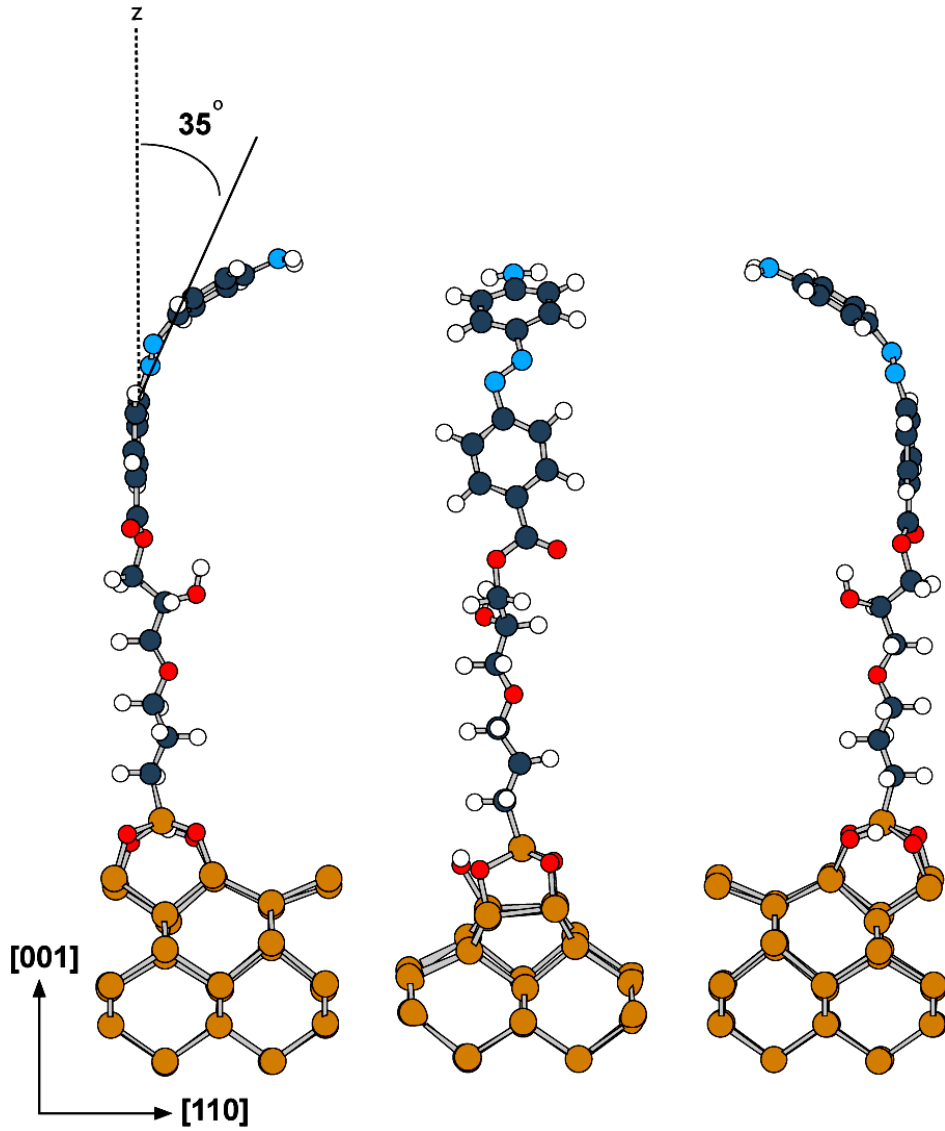
trans-APABA molekülü 366 nm UV ışık ile ışınlendiğinde —N=N— bağı etrafında fenil halkalarının dönmesi sonucu *cis*-APABA haline geçmektedir. Bu şekilde APABA molekülünün *trans-cis* izomerizasyonuna bağlı olarak hazırlanan ışık kontrollü sistemlerdeki değişimin incelenebilmesi için dört farklı model önerilmiştir. Bu modellerdeki APABA molekülünün konformasyonel değişimi ile çok tabaka sisteminin moleküler boyundaki ve enerjisindeki değişimin teorik olarak tespit edilebilmesi amaçlanmıştır.

Öncelikle asit-sonlu olarak hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerdeki *trans*-APABA (Model 1) molekülünün —N=N— bağı boyunca z-ekseni doğrultusunda 60° bükülmüştür (Model 1a). Model 1a olarak adlandırılan bu konformasyon için yapılan optimizasyon sonucunda hazırlanan sistem için en kararlı olan Model 1'e göre sistemin enerjisi 2.51 eV artmıştır. Daha kararsız bir hal kazanan Model 1a için APABA molekülünün *cis* konformasyona dönmesi sonucu yüzeyden itibaren çoklu tabakalım sistemin moleküler boyunun 4.24 Å azaldığı belirlenmiştir. Bu durum, *trans-cis* konformasyon değişimine bağlı olarak sistemin kararsızlaşması olarak yorumlanabilir.



Şekil 7.17. Model 1a: *cis*-APABA molekülünün $-NH_2$ fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi

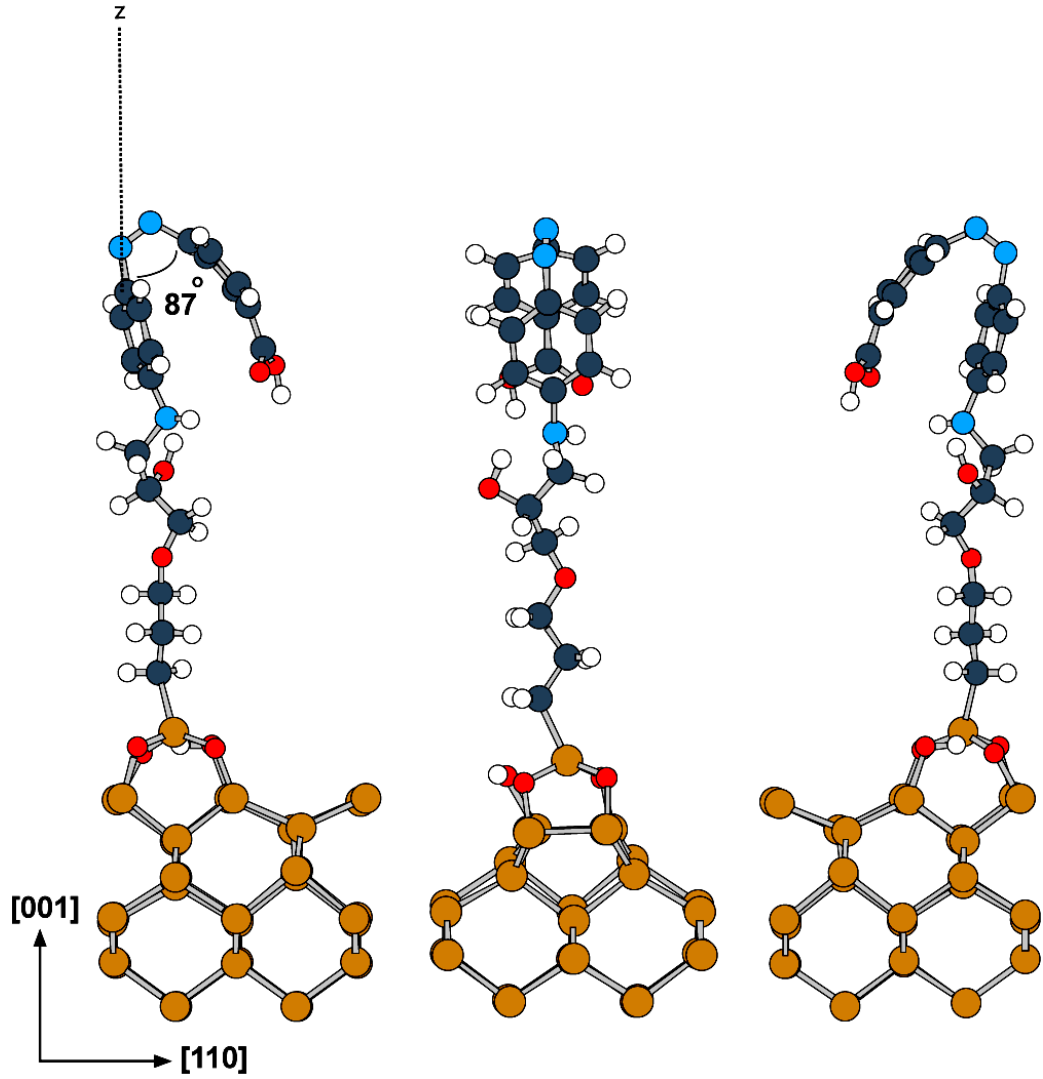
Şekil 7.18 incelendiğinde, epoksi-sonlu yüzeyler üzerine *trans*-APABA molekülü $-COOH$ uç grubundan bağlanmıştır. Hazırlanan bu amino sonlu ışık kontrollü yüzeylerdeki APABA molekülü $-N=N-$ bağlarında z-ekseni boyunca 35° büküldüğünde sistemin en kararlı durumuna göre moleküler boy $3.97 \text{ \AA}$ azalmış ve sistemin enerjisi ise 0.146 eV artmıştır.



Şekil 7.18. Model 2a: *cis*-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi

cis-APABA molekülünün –N=N– bağı etrafında serbestçe dönmesi ve molekülün kırılma açısı oldukça önemli parametreler arasındadır. Yukarıda gösterilen Şekil 7.17 ve Şekil 7.18’de *cis* konformasyonel geçişte APABA molekülü sırasıyla z-ekseni boyunca 60° ve 35° açılarla bükülmüştür. Şekiller dikkatle incelendiğinde fonksiyonel gruplar yüzeye paralel olarak durmaktadır. Teorik hesaplamaların bir sonraki basamağında ise APABA molekülünün uç grupları olan –NH₂ ve –COOH fonksiyonel gruplarının yüzeye doğru biraz daha bükülerek sistemin

tamamıyla kapalı (off) hale geçmesi durumundaki sistemin enerjisi ve moleküler özellikleri araştırılmıştır.

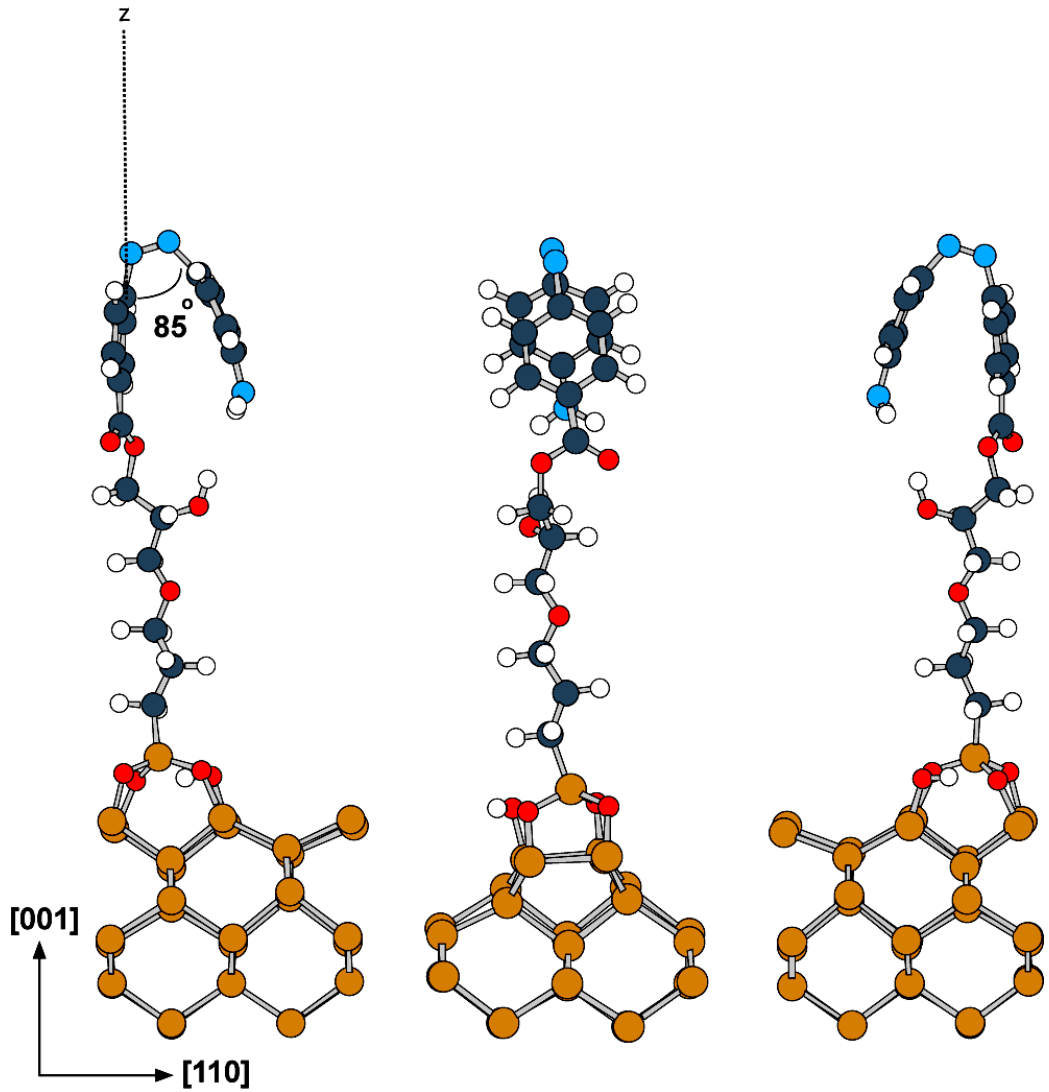


Şekil 7.19. Model 1b: *cis*-APABA molekülünün -NH_2 fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi

Diğer bir fonksiyonel bağlanma noktası olan -NH_2 ucundan GPTS bağlı yüzeye bağlanan APABA molekülü (Şekil 7.19) z-ekseni boyunca fenil halkaları karşılıklı gelecek şekilde -N=N- bağı etrafında 87° açıyla bükülmüş ve -COOH fonksiyonel uç grubu aşağıda kalacak şekilde sistem kapalı (off) duruma getirilmiştir. İlgili sistem incelendiğinde, en

karalı bulunduğu *trans*-durumuna göre 1.82 eV enerjisinin arttığı ve moleküler boyunun ise 7.2 Å daha azaldığı görülmektedir.

APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasında molekül z-ekseni boyunca 85° bükülmüş ve diğer fonksiyonel uç grubu olan –NH₂ grubunun aşağı doğru gelerek sistemin kapalı (off) duruma geçmesi sağlanmıştır.



Şekil 7.20. Model 2b: *cis*-APABA molekülünün –COOH fonksiyonel uç grubundan bağlanmasına ait optimize edilmiş yüzeyin farklı yönlerden gösterimi

Şekil 7.20 incelendiğinde, sistemin fonksiyonel ucu olan $-NH_2$ grubunun reaksiyon vermeyecek şekilde kapalı (off) duruma geçtiği ve buna bağlı olarak molekülün yapısındaki fenil halkalarının karşılıklı konuma geldiği görülmektedir. Buna bağlı olarak ışık kontrollü sistemin en kararlı halde bulunduğu *trans* konumuna (Model 1) göre 1.22 eV daha kararsızlaştığı ve moleküler boyunda ise 6.88 Å'lık bir azalma olduğu gözlenmiştir.

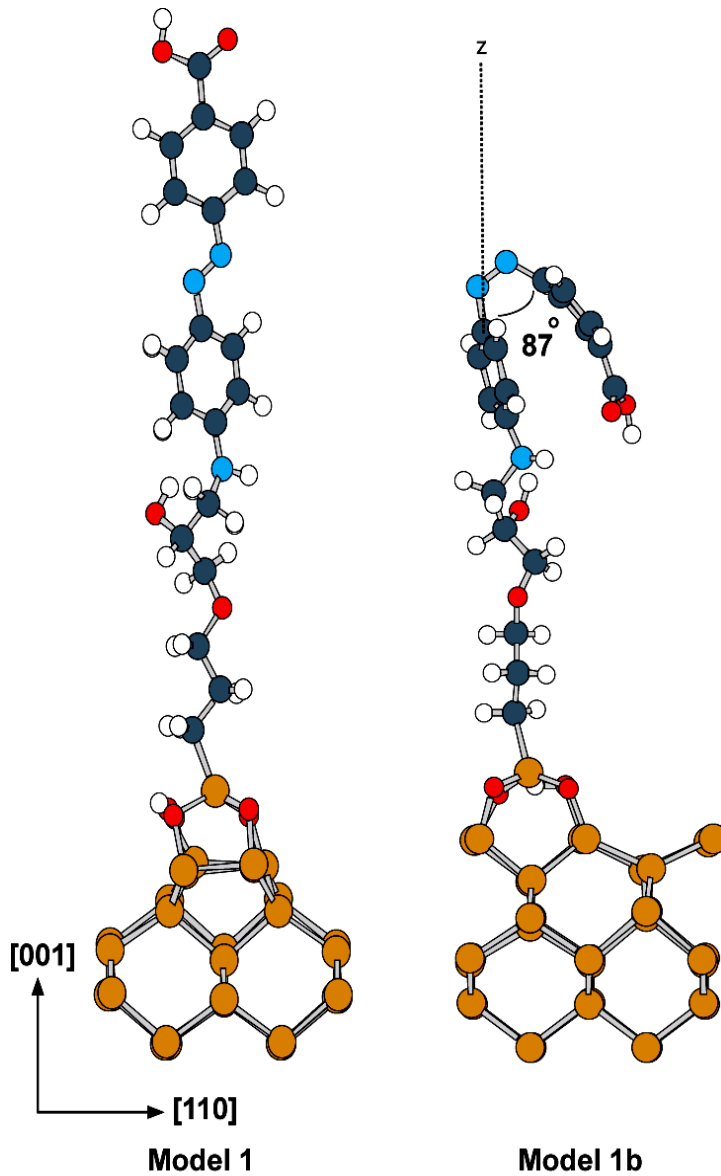
Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylere ait yapılan teorik hesaplamalar sonucu sistemlere ait elde edilen bağıl enerjileri ve yüzeyden itibaren moleküler boyu Çizelge 7.3'de toplu olarak verilmektedir.

Çizelge 7.3. Işık kontrollü yüzeylerdeki APABA molekülü için farklı modellere ait *trans-cis* isomerizasyonları için moleküler boy ve sistemin bağıl enerjileri

Model	Moleküler Boy (Å)	Bağıl Enerji (eV)
Model 1	25.80	0.00
Model 2	25.97	0.43
Model 1a	21.56	2.51
Model 2a	22.00	0.58
Model 1b	18.73	1.65
Model 2b	19.09	2.25

Çizelge 7.3'de toplu verilen sonuçlarda *trans* konumu için daha kararlı bir bağlanma olan $-NH_2$ ucundan bağlanmaya (Model 1) ait sistemin enerjisi sıfır kabul edilerek diğer hesaplanan sistem enerjileri buna göre bağıl olarak düzenlenmiştir. *Cis* durumundaki sistem için bağıl enerji değerleri (Model 1a ve Model 1b) kıyaslandığında ise Model 1b'nin 0.86 eV daha kararlı bir yapı oluşturduğu görülmektedir. Bununla birlikte tamamen

kapalı durumdaki *cis* konumdaki sistemin moleküler boyunun 18.73 Å iken tamamen açık duruma geçtiği *trans* konum için ise sistemin moleküler boyunun 25.80 Å olduğu belirlenmiştir. Yapılan teorik çalışmalar doğrultusunda hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için *trans* ve *cis* durumlarındaki en kararlı konumları Şekil 7.21’de toplu olarak gösterilmektedir.



Şekil 7.21. Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler için *trans*-APABA (Model 1) ve *cis*-APABA (Model 1b) molekülünün en kararlı konumları

Teorik hesaplamalar sonucu ışık kontrollü yüzeyler için optimum *trans* ve *cis* konumları, enerjileri ve moleküler boyları belirlenmiştir. Bilindiği gibi APABA molekülü 450 nm UV altında *trans* halde iken 366 nm UV altında *cis* konuma geçmektedir. Bu iki dalga boyu yardımıyla moleküllerin ortalama *trans-cis* dönüşüm enerjileri hesaplanabilmektedir.

$$E = h\nu \quad (7.2)$$

$$\nu = \frac{c}{\lambda} \quad (7.3)$$

Eş. 7.2 ve Eş. 7.3 kullanılarak moleküllerin *trans* ve *cis* durumları için enerjileri hesaplandığında; *trans* hal için $E_{\text{trans}} = 4.41 \times 10^{-19} \text{ j} = 2.75 \text{ eV}$ olarak, *cis* hali için ise $E_{\text{cis}} = 5.43 \times 10^{-19} \text{ j} = 3.39 \text{ eV}$ olarak bulunmuştur.

Işık kontrollü yüzeylere ait *trans* ve *cis* konumlarına ait *trans-cis* dönüşüm enerjileri teorik ve deneysel olarak kıyaslandığında farklı oldukları görülmektedir. Bu enerji farkına birçok etmen neden olabilir. Öncelikle birçok literatürde de bahsedildiği gibi ışınladıklarında sadece % 88-90 civarında tamamıyla *trans* konumda moleküller elde edilebilmektedir [253]. Bu durum teorik hesaplamalar ve deneysel sonuçlar arasındaki farkın en belirgin nedeni olabilir. Bununla birlikte GPTS moleküllerinin teorik hesaplamalarda yüzeye üçlü köprü şeklinde bağlandığı öngörülmüştür fakat bazı deneysel çalışmalarda GPTS benzeri organosilan moleküllerinin iki metoksi grubundan yüzeye bağlanırken üçüncü metoksi grubunun moleküllerin birbirine bağlanması için kullanılabildiği bilinmektedir [153]. Bunlara ek olarak teorik hesaplamalarda ön görüldüğü gibi ışık-duyarlı moleküller 366 nm UV altında tamamıyla ikiye bükülmüyor olabilir. Morgenstern ve ark.(2006) azobenzen molekülü için *cis-trans* dönüşümü arasındaki enerji değişimini belirlemek amacıyla yaptıkları teorik hesaplamaları ve deneysel sonuçlarını karşılaştırdıklarında iki sonucun birbirinden oldukça farklı olduğunu benzer şekilde görmüşlerdir [258]. Sonuç olarak, bu öngörülen

nedenler ile teorik hesaplamalar ve deneysel sonuçlar eğilim olarak benzer fakat enerji farkı olarak beklendiği gibi birbirinden farklı çıkmış olabilir.

8. SONUÇLAR

- β -Talasemi hastalığının teşhisinde kullanılması amaçlanan ışık kontrollü DNA çip çok tabakalı bir sistem kullanılarak hazırlanmıştır.
- Bu çok tabakalı ve ışık kontrollü sistemin ilk tabakasını oluşturan epoksi-sonlu yüzeyler, temizlenmiş ve hidrosillenmiş Si (100) yüzeyleri üzerine 3-(Glisidoksipropil)trimetoksisilan (GPTS) moleküllerinin kendiliğinden düzenlenme yöntemi ile kovalent bağlanması sonucu hazırlanmıştır.
- Epoksi-sonlu yüzeylerin kimyasal bileşimi X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) kullanılarak belirlenmiştir.
- Epoksi-sonlu yüzeyler için optimum hazırlama şartları elipsometrik kalınlık ve değme açıları ölçümleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümler sonucunda, en uygun GPTS derişimi % 1 (v/v) ve en uygun bekletme süresi 18 saat olarak belirlenmiştir.
- Epoksi-sonlu yüzeyler üzerine APABA moleküllerinin kovalent bağlanmasıyla ışık kontrollü yüzeyler hazırlanmıştır. Öncelikle, azobenzen türevi ışık-duyarlı 4,(4'-aminofenilazo) benzoik asit (APABA) molekülü *Schündehütte* metodu kullanılarak sentezlenmiştir. Yapılan sentez sonunda % 69 verimle APABA bileşiğı elde edilmiştir.
- Işık-duyarlı APABA molekülünün kimyasal yapısı; ATR-FTIR spektrumu ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektrumu ve Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) ölçümleri ile aydınlatılmıştır.
- Işık-duyarlı APABA bileşiğinin fotoizomerizasyon özelliğı DMSO içerisindeki molekül değışik sürelerde UV ışık ile uyarılmıştır ve absorbans değeriindeki değışim UV Spektrofotometresi ile izlenmiştir.
- Işık-duyarlı APABA bileşiğı için UV ışınlama zamanına göre $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişindeki absorbans değeri değışimi değeri kullanılarak *trans-cis*

izomerizasyon kinetiğinin birinci dereceden olduğu belirlenmiş ve hız sabitini veren doğrunun eğimi $2.44 \times 10^{-3} \text{ dak}^{-1}$ olarak hesaplanmıştır.

- Epoksi-sonlu yüzeylere ışık-duyarlı APABA moleküllerinin bağlanması ile oluşturulan ışık kontrollü yüzeylerin kimyasal bileşimi XPS kullanılarak belirlenmiştir. Işık kontrollü yüzeylerdeki ait N atomları için; N 1s pikinin fit edilmesi sonucu 400.8 eV değerinde % 57 bağıl oranında -N=N- bağına ait pik, 402.5 eV değerinde ise % 43 bağıl oranında -N-C- bağına ait pik gözlenirken, C atomları için C 1s pikinin fit edilmesi sonucu, 285.8 eV'da % 43 bağıl oranında aromatik ve alifatik -C-C- ve -C=C- bağı; 287.0 eV'da % 29 bağıl oranında -C-O- bağı; 286.4 eV'da % 19 bağıl oranında -C=O bağı ve 289.8 eV'da % 9 bağıl oranında -O-C=O bağı olmak üzere dört farklı pik gözlenmiştir.
- Işık kontrollü yüzeyler için optimum hazırlama şartları elipsometrik kalınlık ve değme açıları ölçümleri kullanılarak belirlenmiştir. Bu ölçümler sonucunda, en uygun APABA derişimi 20 mM, optimum bekletme süresi 24 saat ve optimum çalışma ortam sıcaklığı 22°C olarak belirlenmiştir.
- GPTS ve GPTS-APABA molekülleri ile tasarlanan Si (100) yüzeylerin temiz yüzeylere göre bağıl elipsometrik kalınlıkları sırası ile 2.49 nm ve 4.78 nm olarak bulunmuştur. Hidroksillenmiş Si(100) yüzeylerin ise kalınlığı 1.2 nm olarak bulunmuştur. Bu sonuç GPTS ve APABA moleküllerinin tek tabaka şeklinde düzenlendiğini göstermektedir.
- Tasarlanan yüzeylerin 3-boyutlu, 2-boyutlu yüzey morfolojileri ve yüzeyler üzerindeki yükseklik dağılımları atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ile belirlenmiştir. Hidroksillenmiş, GPTS ve GPTS-APABA bağlanmış Si(100) yüzeylerinin AFM görüntülerinden RMS değerleri sırası ile 0.280, 0.42, ve 0.840 nm olarak tespit edilmiştir.
- Yüzeylerin hidrofilik ve hidrofobik karakterleri su değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Temiz, hidroksillenmiş, GPTS ve GPTS-APABA bağlanmış Si(100) yüzeylerinin su değme açıları sırası ile 71.9°, 3.0°, 53.6° ve 50.9°

olarak belirlenmiştir. Su değme açısı ölçümleri ile yüzeyler üzerinde oluşturulan filmlerin yüzeylerin hidrofobik/hidrofilik yapısını değiştirdiği görülmektedir.

- Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin fotoisomerizasyon özellikleri değme açısı ölçümleri ile belirlenmiştir. Işık kontrollü yüzeyler UV ışık altında ışınladıklarında, görünür bölgede *trans* halde bulunan APABA moleküllerinden kaynaklanan 50.9° olan su değme açısı, APABA moleküllerinin *cis* hale dönmesiyle 89.9° 'ye olarak değişmekte olduğu belirlenmiştir.
- Hazırlanan ışık kontrollü yüzeylerin sıvı-yüzey etkileşiminin üzerine sıvıların özelliklerinin incelenmesi amacıyla, farklı sıvılar kullanılarak yüzeylerin hem görünür bölgede (450 nm) hem de UV ışık (366 nm) ile ışınladıkları durumları için ileri (θ_{ileri}) ve geri değme açısı (θ_{geri}) ölçümleri alınmıştır. Bu değerler kullanılarak yüzey pürüzlülüğünün bir göstergesi olan histerizi değeri *trans* yüzeylerde; su, formamit ve diiyodometan çözücüleri için sırasıyla 21.5° , 20.3° ve 32.3° olarak hesaplanmıştır.
- Değme açısı değerleri kullanılarak ışık kontrollü yüzeylerin *trans* ve *cis* durumları için toplam yüzey enerjileri Van Oss eşitliği kullanılarak sırasıyla 37.28 mJ/m^2 ve 36.95 mJ/m^2 olarak hesaplanmıştır. Bu durum ışık kontrollü yüzeylerin *trans* konumda iken daha aktif olduğu (açık) ve kullanıma hazır olduğu fakat *cis* konumda iken düşen yüzey enerjisi ile aktivitesinin düştüğü ve kullanılmaz hale geldiği yani sistemin kapandığı şeklinde yorumlanabilmektedir.
- Işık kontrollü yüzeyler üzerine β -Talasemi hastalığına ait nokta mutasyonlu Cy3 floresans etiketli $-\text{NH}_2$ uç gruplu prob-DNA immobilize edilerek teşhis amaçlı ışık kontrollü DNA çip hazırlanmıştır.
- Hazırlanan ışık kontrollü DNA çip hazırlanmasına ait tüm optimizasyon çalışmaları Floresans Mikroskobu kullanılarak yapılmıştır. Çip'in hazırlanmasına dair yapılan optimizasyon çalışmaları sonucu, prob-DNA

derişimi 2.7 μM ve immobilizasyon süresi 24 saat olarak belirlenmiştir. Bu şartlar sağlanan çip'den en uygun ve şiddetli floresans sinyali alınmıştır.

- Işık-kontrollü DNA çip için yapılan hibridizasyon çalışmaları sonucunda en uygun hedef-DNA derişimi 10.8 μM olarak ve en uygun hibridizasyon süresi 24 saat olarak gözlenmiştir.
- Hazırlanan DNA çip'deki ışık ile hibridizasyonun kontrolünün belirlenebilmesi amacıyla vis ve UV ışık altında ışınlanan yüzeylerin yapılan hibridizasyon çalışması sonucu Konfokal Mikroskobu görüntüleri alınmıştır. Konfokal mikroskobu görüntülerinden piksel sayımına bağlı olarak hesaplanan hibridizasyon yüzdeleri, *trans* yüzeyler için % 61 iken *cis* yüzeyler için % 5 olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre hazırlanan çip için hibridizasyonun ışık ile kontrol edilebildiği sonucuna ulaşılabilmektedir.
- Işık kontrollü DNA çip için gerçek kan numunelerinden izole edilerek elde edilen PCR ürünü, normal, taşıyıcı ve hastalıklı DNA dizileri ile kontrol hibridizasyon çalışmaları yapılmıştır. Sonuç olarak çip'in taşıyıcı ve hastalıklı DNA için çok fazla ayırım yapamadığı fakat mutasyonlu bölgeyi tanımlayarak hibridizasyonun gerçekleştiği floresans şiddetlerindeki azalmaya bağlı olarak belirlenmiştir.
- Hazırlanan ışık kontrollü yüzeyler çok tabakalı bir sistemdir. Bu çok tabakalı sistem için hazırlanan her bir tabakadaki moleküllerin yüzeyler üzerine bağlanma mekanizması, geometrisi ve enerjisi önemli parametreleri oluşturmaktadır. Bu parametreler VASP programı kullanılarak yapılan teorik hesaplamalar ile aydınlatılmıştır.
- Epoksi-sonlu Si(100)-2x2 yüzeyler için yapılan teorik hesaplamalar sonucu GPTS molekülünün moleküler boyu 12.62 Å ve HOMO-LUMO boşluğu ise 4.59 eV olarak bulunmuştur.

- Işıık-duyarlı APABA molekülünün fotoizomerizasyon sırasındaki konformasyonel değişimi için beş farklı model önerilmiştir. Teorik hesaplamalara göre, önerilen modellerin bağıl enerjileri incelendiğinde *cis2* ve *cis3* modellerinin, teorik olarak hesaplanan 0.64 eV enerji değerine yakın enerjiye sahip oldukları görölmektedir.
- Hazırlanan ışıık kontrollü yüzeyler için önerilen farklı modellere göre yapılan teorik hesaplamalar sonucunda, *trans* yüzeyler için Model 1, *cis* yüzeyler için ise Model 1b en kararlı yapılar olduğu belirlenmiştir.
- Bütün bu sonuçlar değerlendirildiğinde, ışıık kontrollü bu DNA çip'in teşhis amaçlı çalışmalarda verimli bir biçimde kullanılabilecek yeni ve akıllı bir sistem olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

1. Ball, P., "Life's lessons in design", **Nature**, 409: 413-416 (2001).
2. Goodsell, D.S., "Bionanotechnology: Lessons from Nature", **Wiley-Liss**, New York, 1-40 (2004).
3. Freitas, R.A.Jr, The future of nanofabrication and molecular scale devices in nanomedicine," **Studies in Health Technology and Informatics**, 80: 45-59 (2002).
4. Whitesides, G.M., "The right size in nanobiotechnology", **Nature Biotechnology**, 21: 1161-1165 (2003).
5. Jain, K.K., "Current status of molecular biosensors", **Medical Device Technology**, 14: 10-15 (2003).
6. Barone, P.W., Baik, S., Heller, D.A., Strano, M.S., "Near-infrared optical sensors based on single-walled carbon nanotubes", **Nature Materials**, 4: 86-92 (2005).
7. Cornell, B.A., "Optical Biosensors: Present and Future", Lighler, F., Taitt C. R., eds., **Elsevier**, Amsterdam, 457 (2002).
8. Cao, Y., Lee, K.Y.E., Kopelman, R., "Poly(decyl methacrylate)-based fluorescent PEBBLE swarm nanosensors for measuring dissolved oxygen in biosamples", **Analyst**, 129: 745-750 (2004).
9. Chen, R.J., Bangsaruntip, S., Drouvalakis, K.A., "Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 100: 4984-4989 (2003).
10. Böcking, T., Kilian, K., Gaus, K., Gooding, J., "Single-step dna immobilization on antifouling self-assembled monolayers covalently bound to silicon (111)", **Langmuir**, 22: 3494-3496 (2006).
11. Kumar, G.S., Neckers, D.C., "Photochemistry of azobenzene-containing polymers", **Chemical Review**, 89: 1915-1925 (1989).
12. Wang, J., Kara, S., Long, T.E., Ward, T.C., "Synthesis of central functionalized asymmetric triblock copolymers for surface modification and switchable surface properties", **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, 38: 3742-3750 (2000).

13. Feng, J.X., Haasch, R.T., Dyer, D.J., "Photoinitiated synthesis of mixed polymer brushes of polystyrene and poly(methyl methacrylate)", **Macromolecules**, 37: 9525-9537 (2004).
14. Zhao, B., "Synthesis of binary mixed homopolymer brushes by combining atom transfer radical polymerization and nitroxide-mediated radical polymerization", **Polymer**, 44: 4079-4083 (2003).
15. Zhao, B., He., T., "Synthesis of well-defined mixed poly(methyl methacrylate)/polystyrene brushes from an asymmetric difunctional initiator-terminated self-assembled monolayer", **Macromolecules**, 36: 8599-8602 (2003).
16. Minko, S., Muller, M., Motornov, M., Nitschke, M., Grundke, K., Stamm, M., "Two-level structured self-adaptive surfaces with reversibly tunable properties", **Journal of the American Chemical Society**, 125: 3896-3900 (2003).
17. Draper, J., Luzinov, I., Mino, S., "Mixed polymer brushes by sequential polymer addition: anchoring layer effect", **Langmuir**, 20: 4064-4075 (2004).
18. Sidorenko, A., Minko, S., Schenk-Meuser, S.K., Duschner, H., Stamm, M., "Switching of polymer brushes", **Langmuir**, 15: 8349-8355 (1999).
19. Minko, S., Patil, S., Datsyuk, V., Simon, F., Eichhorn, K.J., Motornov, M., Usov, D., Tokarev, I., Stamm, M., "Synthesis of adaptive polymer brushes via "grafting to" approach from melt", **Langmuir**, 18: 289-296 (2002).
20. Julthongpiput, D., Lin, Y.H., Teng, J., Zubarey, E.R., Tsukruk, V.V., "Y-Shaped amphiphilic brushes with switchable micellar surface structures", **Journal of the American Chemical Society**, 125: 15912-15921 (2003).
21. Luzinov, I., Minko, S., Tsukruk, V.V., "Adaptive and responsive surfaces through controlled reorganization of interfacial polymer layers", **Progress in Polymer Science**, 29: 635-698 (2004).
22. Julthongpiput, D., LeMieux, M., Tsukruk, V.V., "Micromechanical properties of glassy and rubbery polymer brush layers as probed by atomic force microscopy", **Polymer**, 44: 4557- 4562 (2003).
23. Willner, I., "Photoswitchable biomaterials: En route to optobioelectronic systems", **Accounts of Chemical Research**, 30: 347-356 (1997).
24. Willner, I., Rubin, S., "Control of the structure and functions of biomaterials by light", **Angewandte Chemie International Edition**, 35: 367-385 (1996).

25. Pieroni, O., Fissi, A., Angelini, N., Lenci, F., "Photoresponsive polypeptides", ***Accounts of Chemical Research***, 34: 9-17 (2001).
26. Dugave, C., Demange, L., "Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: implications and applications", ***Chemical Review***, 103: 2475-2532 (2003).
27. Shibaev, V., Bobrovsky, A., Boiko, N., "Photoactive liquid crystalline polymer systems with light-controllable structure and optical properties", ***Progress in Polymer Science***, 28: 729-836 (2003).
28. Yu, Y., Nakano, M., Ikeda, T., "Photomechanics: Directed bending of a polymer film by light ", ***Nature***, 425: 145-147 (2003).
29. Tamada, T., Nagasawa, J., Nakanishi, F., Abe, K., "Structure and growth of hexyl azobenzene thiol sams on Au(111)", ***Langmuir***, 14: 3264-3271 (1998).
30. Zhang, J., Whitesell, J.K., Fox, M.A., "Photoreactivity of self-assembled monolayers of azobenzene or stilbene derivatives capped on colloidal gold clusters", ***Chemistry of Materials***, 13: 2323-2331 (2001).
31. Behrendt, R., Schenk, M., Musiol, H., Moroder, L., "Photomodulation of conformational states. Synthesis of cyclic peptides with backbone-azobenzene moieties", ***Journal of Peptide Science***, 5: 519-529 (1999).
32. Behrendt, R., Renner, C., Schenk, M., Wang, F., Wachtveitl, J., Oesterheld, D., Moroder, L., "Photomodulation of the conformation of cyclic peptides with azobenzene moieties in the peptide backbone", ***Angewandte Chemie International Edition***, 38: 2771-2774 (1999) .
33. Renner, R., Behrendt, S., Spörlein, J., Wachtveitl, L., Moroder, "Photomodulation of conformational states. I. Mono- and bicyclic peptides with (4-amino)phenylazobenzoic acid as backbone constituent", ***Biopolymers***, 54: 489-500 (2000).
34. Lim, H., Han, J., Kwak, D., Jin, M., Cho, K., "Photoreversibly switchable superhydrophobic surface with erasable and rewritable pattern", ***Journal of the American Chemical Society***, 128: 14458-14459 (2006).
35. Asanuma, H., Yoshida, T., Liang, X., Komiyama, M., "Photoregulation of the formation and dissociation of a DNA duplex by using the cis-trans isomerization of azobenzene", ***Angewandte Chemie International Edition***, 38: 2393-2395 (1999).

36. Sisido, M., Harada, M., Kawashima, K., Ebato, H., Okahata, Y., "Photoswitchable peptide antigens on solid surfaces", **Biopolymers**, 47: 159-165 (1998).
37. Asanuma, H., Liang, X., Yoshida, T., Komiyama, M. , "Photocontrol of DNA duplex formation by using azobenzene-bearing oligonucleotides", **ChemBioChem**, 2: 39-44 (2001).
38. Kamei, T., Kudo, M., Akiyama, H., Wada, M., Nagasawa, J., Funahashi, M., Tamaoki, N., Uyeda T.Q.P., "Visible-light photoresponsivity of a 4-(dimethylamino)azobenzene unit incorporated into single-stranded dna: demonstration of a large spectral change accompanying isomerization in DMSO and detection of rapid (Z)-to-(E) isomerization in aqueous solution", **European Journal of Organic Chemistry**, 11: 1846-1853 (2007).
39. Love, C.J., Estroff, A.L., Kribel, K.J., Nuzzo, G.R., Whitesides, G.M., "Self-assembled monolayers of thiolates on metal as a form of nanotechnology", **Chemical Review**, 105: 1103-1169 (2005).
40. Crandell, B.C., Lewis, J., "Nanotechnology research and perspectives", **MIT Press**, Cambridge, 67-107 (1989).
41. Drexler, K.E., "Nanosystems: Molecular machinery, manufacturing, and computation", **John Wiley & Sons**, New York, 990-998 (1992).
42. Drexler, K.E., Peterson, C., Pergamit, G., "Unbounding the future: The nanotechnology revolution", **William Morrow**, New York, 5-43 (1991).
43. Köhler, M., Fritzsche, W., "Nanotechnology: An introduction to nanostructuring techniques", **Wiley-VCH**, Germany, 1-9 (2004).
44. Lilley, D.M.J., "The ribosome functions as a ribozyme", **ChemBioChem**, 2: 31-35 (2001).
45. Drexler, K.E., "Molecular engineering: An approach to the development of general capabilities for molecular manipulation", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 78: 5275-5278 (1981).
46. Niemeyer, C.M., "Self-assembled nanostructures based on DNA: Towards the development of nanobiotechnology", **Current Opinion in Chemical Biology**, 4: 609-618 (2000).
47. Niemeyer, C., "The developments of semisynthetic DNA–protein conjugates", **Trends in Biotechnology**, 20: 395-401 (2002).

48. Seeman, N.C., "DNA engineering and its application to nanotechnology", ***Trends in Biotechnology***, 17: 437-443 (1999).
49. Fritzsche, M., Belcher, A.M., Radmacher, M., Walters, D.A., Stucky, G.D., Morse, D.W.E., Mann, S., "Flat pearls from biofabrication of organized composites on inorganic substrates", ***Nature***, 371: 49-51 (2002).
50. Penn, S.G., Natan, M.J., He, L., "Nanoparticles in bioanalysis", ***Current Opinion in Chemical Biology***, 7: 609-615 (2003).
51. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S.P., Alivisatos, A.P., "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels" ***Science***, 281: 2013-2016 (1998).
52. Wu, X., Liu, H., Liu, J., Haley, K.N., Treadway, J.A., Larson, J.P., Ge, N., Peale F., Bruchez, M.P., "Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots", ***Nature Biotechnology***, 21: 41-46 (2003).
53. Strother, T., Cai, W., Zhao, X., Hamers, R. J., Smith, L.M., "Synthesis and characterization of DNA-modified silicon(100) surface", ***Journal of the American Chemical Society***, 122: 1205-1209 (2000).
54. Lin, Z., Strother, T., Cai, W.J., Smith, L.M., Hamers, R., "DNA attachment and hybridization at the silicon (100) surface", ***Langmuir***, 18: 788-796 (2002).
55. Meller, A., Branton, D., "Single molecule measurements of DNA transport through a nanopore", ***Electrophoresis***, 23: 2583-2591 (2002).
56. Southern, E.M., "Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis", ***Journal of Molecular Biology***, 98: 503-507 (1975).
57. Lehninger, A.L., "Principles of Biochemistry", ***Worth Publishers***, New York, 1-23 (1982).
58. Janata, J., "Principles of Chemical Sensors", ***Springer & Verlag***, New York, 8-23 (1989).
59. Poole, C.P., Owens, F.J., "Introduction to Nanotechnology", ***John Wiley & Sons, Inc.***, USA, 1-8 (2003).
60. Russell, B., "A history of western philosophy", ***Simon & Schuster***, New York, 5-10 (1972).

61. Langmuir, I., Blodgett, K.B., "A new method of investigating monomolecular films", *Kolloid-Zeitschrift*, 73: 257-263 (1935).
62. Bigelow, W.C., Pickett, D.L., Zisman, W.A., "Oleophobic monolayers: I. Films adsorbed from solution in non-polar liquids", *Journal of Colloid Science*, 1: 513-538 (1946).
63. Nuzzo, R.G., Allara, D.L., "Adsorption of bifunctional organic disulfides on gold surfaces", *Journal of the American Chemical Society*, 105: 4481-4483 (1983).
64. Laibinis, P.E., Whitesides G.M., Allara, D.L., Tao, Y.T., Parikh, A.N., Nuzzo, R.G., "Comparison of the structures and wetting properties of self-assembled monolayers of n-alkanethiols on the coinage metal surfaces, copper, silver, and gold", *Journal of the American Chemical Society*, 113: 7152-7167 (1991).
65. Troughton, E.B., Bain, C.D., Whitesides, G.M., Nuzzo, R.G., Allara, D.L., Porter, M.D., "Monolayer films prepared by the spontaneous self-assembly of symmetrical and unsymmetrical dialkyl sulfides from solution onto gold substrates: structure, properties, and reactivity of constituent functional groups", *Langmuir*, 4: 365-385 (1988).
66. Wilber, J.L., Whitesides, G.M., "Nanotechnology", Timp, G. ed., *Springer&Verlag*, Germany, 1-55 (1999).
67. Smith, K.R., Lewis, A.P., Weiss, S.P., "Patterning self-assembled monolayers", *Progress in Surface Science*, 75: 1-68 (2004).
68. Ulman, A., "An introduction to ultrathin organic films", *Academic Press*, San Diego, 1-13 (1991).
69. Bain, C.D., Troughton, E.B., Tao, Y.T., Evall, J., Whitesides, G.M., Nuzzo, R.G., "Formation of monolayer films by the spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold", *Journal of the American Chemical Society*, 111: 321-335 (1989).
70. DeBono, R.F., Loucks, G.D., Manna, D.D., Krull, U.J., "Self-assembly of short and long-chain n-alkyl thiols onto gold surfaces: A real-time study using surface plasmon resonance techniques", *Canadian Journal of Chemistry*, 74: 677-688 (1996).
71. Shimazu, K., Yag, I., Sato, Y., Uosaki, K., "In situ and dynamic monitoring of the self-assembling and redox processes of a ferrocenylundecanethiol monolayer by electrochemical quartz crystal microbalance", *Langmuir*, 8: 1385-1387 (1992).

72. Karpovich, D.S., Blanchard, G.J., "Direct measurement of the adsorption kinetics of alkanethiolate self-assembled monolayers on a microcrystalline gold surface", **Langmuir**, 10: 3315-3322 (1994).
73. Major, R.C., Zhu, X.Y., "Two-step approach to the formation of organic monolayers on the silicon oxide surface", **Langmuir**, 17: 5576-80 (2001).
74. Klaus, J.W., Sneh, O., George, S.M., "Growth of SiO₂ at room temperature with the use of catalyzed sequential half-reactions", **Science**, 278: 1934-1936 (1997).
75. Zhu, X.Y., Mulder, J.A., Bergerson, W. F., "Chemical vapor deposition of organic monolayers on Si(100) via Si-N linkages.", **Langmuir**, 15: 8147-8154 (1999).
76. Cotton, F.A., Wilkinson, G., "Advanced inorganic chemistry", **Wiley**, Chichester, 370-375 (1980).
77. Maboudian, R., "Surface processes in MEMS technology", **Surface Science Reports**, 30: 207-270 (1998).
78. Ho, C.M., Tai, Y.C., "Micro-electro-mechanical-systems (MEMS) and fluid flows", **Annual Review of Fluid Mechanics**, 30: 579-612 (1998).
79. Southern, E., Mir, K., Shchepinov, M., "Molecular interactions on microarray", **Nature Genetics**, 21: 5-9 (1999).
80. Cheng, Q., Brajter-Toth, A., "Selectivity and sensitivity of self-assembled thioctic acid electrodes", **Analytical Chemistry**, 64: 1998-2000 (1992).
81. Shimoboji, T., Larenas, E., Fowler, T, Kulkarni, S., Hoffman, A.S., Stayton, P.S., "Photoresponsive polymer–enzyme switches", **Proceedings of the National Academy of Sciences**, 99: 16592-16596 (2002).
82. Yager, K.G., Barrett, C.J., "Novel photo-switching using azobenzene functional materials", **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 182: 250-261 (2006).
83. Rau, H., "Photochemistry and photophysics", Rebek, J., ed., **CRC Press**, Boca Raton, 110-119 (1990).
84. Delaire, J.A., Nakatani, K., "Linear and nonlinear optical properties of photochromic molecules and materials", **Chemical Reviews**, 100: 1817-1846 (2000).

85. Brzozowski, L., Sargent, E.H., "Azobenzenes for photonic network applications: Third-order nonlinear optical properties", ***Journal of Materials Science: Materials in Electronics***, 12: 483-489 (2001).
86. Schulze, F.W., Petrick, H.J., Cammenga, H.K., Klinge, H., "Thermodynamic properties of the structural analogs benzo[c]cinnoline, trans-azobenzene, and cis-azobenzene", ***Zeitschrift für Physikalische Chemie***, 107: 1-19 (1977).
87. Mita, I., Horie, K., Hirao, K., "Photochemistry in polymer solids. 9. Photoisomerization of azobenzene in a polycarbonate film", ***Macromolecules***, 22: 558-563 (1989).
88. Monti, S., Orlandi, G., Palmieri, P., "Features of the photochemically active state surfaces of azobenzene", ***Chemical Physics***, 71: 87-99 (1982).
89. Brown, E.V., Granneman, G.R., "Cis-trans isomerism in the pyridyl analogs of azobenzene. Kinetic and molecular orbital analysis", ***Journal of the American Chemical Society***, 97: 621-627 (1975).
90. Haberfield, P., Block, P.M., Lux, M.S., "Enthalpies of solvent transfer of the transition states in the cis-trans isomerization of azo compounds. Rotation vs. the nitrogen inversion mechanism", ***Journal of the American Chemical Society***, 97: 5804-5806 (1975).
91. Lamarre, L., Sung, C.S.P., "Studies of physical aging and molecular motion by azochromophoric labels attached to the main chains of amorphous polymers", ***Macromolecules***, 16: 1729-1736 (1983).
92. Vollmer, M.S., Clark, T.D., Steinem, C., Ghadiri, M.R., "Photoswitchable Hydrogen-Bonding in Self-Organized Cylindrical Peptide Systems", ***Angewandte Chemie International Edition***, 38: 1598-1601(1999).
93. Kerzhner, B.K., Kofanov, V.I., Vrubel, T.L., "Photoisomerization of aromatic azo compounds adsorbed on a hydroxylated surface", ***Zhurnal Obshchei Khimii***, 53: 2303-2306 (1983).
94. Funke, U., Gruetzmacher, H.F., "Dithia-diaza [n.2] paracyclophanes", ***Tetrahedron***, 43: 3787-3795 (1987).
95. Hartley, G.S., "The Cis-form of azobenzene", ***Nature***, 140: 281 (1937).
96. Fischer, E., "Calculation of photostationary states in systems A $\rightleftharpoons$ B when only A is known", ***Journal of Physical Chemistry***, 71: 3704-3706 (1967).

97. Rau, H., Greiner, G., Gauglitz, G., Meier, H., "Photochemical quantum yields in the A (+h.nu.) .dblarw. B (+h.nu., DELTA.) system when only the spectrum of A is known", **Journal of Physical Chemistry**, 94: 6523-6524 (1990).
98. Magennis, S.W., Mackay, F.S., Jones, A.C., Tait, K.M., Sadler, P.J., "Two-photon-induced photoisomerization of an azo dye", **Chemistry of Materials**, 17: 2059-2062 (2005).
99. Naito, T., Horie, K., Mita, I., "The effects of the size of reaction groups and the mode of photoisomerization on photochromic reactions in polycarbonate film", **Macromolecules**, 24: 2907-2911 (1991).
100. Uznanski, P., Kryszewski, M., Thulstrup, E.W., "Linear dichroism and trans cis photo-isomerization studies of azobenzene molecules in oriented polyethylene matrix", **European Polymer Journal**, 27: 41-43 (1991).
101. De Lange, J.J., Robertson, J.M., Woodward, I., "X-ray crystal analysis of trans-azobenzene", **Proceedings of the Royal Society of London**, A171: 398 (1939).
102. Hampson, G.C., Robertson, J.M., "Bond lengths and resonance in the cis-azobenzene molecule", **Journal of the Chemical Society**, 419-413 (1941).
103. Brown, C.J., "A refinement of the crystal structure of azobenzene", **Acta Crystallographica**, 21: 146-152 (1966).
104. Naito, T., Horie, K., Mita, I., "Effects of main-chain structures and formation of hydrogen bonds on photoisomerization of azobenzene in various polymer films", **Polymer**, 34: 4140-4145 (1993).
105. Willner, I., Rubin, S., "Control of the structure and functions of biomaterials by light", **Angewandte Chemie International Edition**, 35: 367-385 (1996).
106. Balasubramanian, D., Subramani, S., Kumar, C., "Modification of a model membrane structure by embedded photochrome", **Nature**, 254, 252-254 (1975).
107. Lee, W.S., Ueno, A., "Photocontrol of the catalytic activity of a β -cyclodextrin bearing azobenzene and histidine moieties as a pendant group", **Macromolecular Rapid Communications**, 22: 448-450 (2001).

108. Ciardelli, F., Pieroni, O., "Molecular Switches", Feringa, B.L., ed., **Wiley-VCH**, Germany, 399 (2001).
109. Sisido, M., Ishikawa, Y., Harada, M., Itoh, K., "Helically arranged azobenzene chromophores along a polypeptide chain. 2. Prediction of conformations and calculation of theoretical circular dichroism", **Macromolecules**, 24: 3999-4003 (1991).
110. Pieroni, O., Houben, J.L., Fissi, A., Costantino, P., "Reversible conformational changes induced by light in poly(L-glutamic acid) with photochromic side chains", **Journal of the American Chemical Society**, 102: 5913-5915 (1980).
111. Houben, J.L., Fissi, A., Bacciola, D., Rosato, N., Pieroni, O., Ciardelli, F., "Azobenzene-containing poly(L-glutamates). Photochromism and conformation in solution", **International Journal of Biological Macromolecules**, 7: 575-580 (1983).
112. Malcolm, B.R., Pieroni, O., "The photoresponse of an azobenzene-containing poly(L-lysine) in the monolayer state", **Biopolymers**, 29: 1121-1123 (1990).
113. Fissi, A., Pieroni, O., Balestreri, E., Amato, C., "Photoresponsive polypeptides. photomodulation of the macromolecular structure in poly(*N* (phenylazophenyl)sulfonyl)-L-lysine)", **Macromolecules**, 29: 4680-4685 (1996).
114. Fissi, A., Pieroni, O., Ciardelli, F., "Photoresponsive polymers: Azobenzene-containing poly(L-lysine)", **Biopolymers**, 26: 1993-2007 (1987).
115. Wang, L., Schultz, P.G., "Expanding the genetic code", **Angewandte Chemie International Edition**, 44: 34-66 (2004).
116. Nakayama, K., Endo, M., Majima, T., "A hydrophilic azobenzene-bearing amino acid for photochemical control of a restriction enzyme *Bam*HI", **Bioconjugate Chemistry**, 16: 1360-1366 (2005).
117. Nakayama, K., Endo, M., Majima, T., "Photochemical regulation of the activity of an endonuclease *Bam*HI using an azobenzene moiety incorporated site-selectively into the dimer interface", **Chemical Communications**, 21: 2386-2387 (2004).
118. Voinova, M.V., Jonson, M., "Electronic transduction in model enzyme sensors assisted by a photoisomerizable azo-polymer", **Biosensors and Bioelectronics**, 20: 1106-1110 (2004).

119. Liang, X., Asanuma, H., Kashida, H., Takasu, A., Sakamoto, T., Kawai, G., Komiyama, M., "NMR Study on the photoresponsive DNA tethering an azobenzene. assignment of the absolute configuration of two diastereomers and structure determination of their duplexes in the *trans*-form", ***Journal of the American Chemical Society***, 125: 16408-16415 (2003).
120. Liu, M., Asanuma, H., Komiyama, M., "Azobenzene-tethered T7 promoter for efficient photoregulation of transcription", ***Journal of the American Chemical Society***, 128: 1009-1015, (2005).
121. Briggs, D., Seah, M.P., "Practical surface analysis 2. ion and neutral spectroscopy", ***John Wiley***, Chichester, UK, 23-28 (1992).
122. Briggs, D., Seah, M.P., "Practical surface analysis 1. Auger and X-ray spectroscopy", ***John Wiley***, Chichester, 32-45 (1990).
123. Beamson, G., Briggs, D., "High resolution XPS of organic polymers: The scienta 300 database", ***John Wiley***, Chichester, 57-62 (1992).
124. Milling, A., "Surface characterization methods", ***Marcel Dekker***, New York, 56-67(1999).
125. Neubauer, G., Cohen, S.R., McClennandi G.M., Horne, D., Mate, C. M., "Force microscopy with a bidirectional capacitance sensor" ***Review of Scientific Instruments***, 61: 2296-2308 (1990).
126. Azzam, R.M.A., Bashara, N.M., "Ellipsometry and polarized light", ***North Holland***, Amsterdam, 287-295 (1977).
127. Leng, J., Opsal, J., Chu, H., Senko, M., Aspnes, D.E., "Analytic representations of the dielectric functions of materials for device and structural modeling", ***Thin Solid Films***, 313-314: 132-136 (1998).
128. Bubert, H., Jenett, H., "Surface and thin film analysis", ***Wiley-VCH***, Germany, 56-89 (2002).
129. Koberstein J.T., "Encyclopedia of polymer science and engineering", ***John Wiley***, New York, 237-279 (1987).
130. Siebold, A., Walliser, A., Nardin, M., Oppliger, M., Schultz, J., "Capillary rise for thermodynamic characterization of solid particle surface", ***Journal of Colloid and Interface Science***, 186: 60-70" (1997).
131. Chibowski, E., Jurak, M., "Topography and surface free energy of DPPC layers deposited on a glass, mica, or PMMA support", ***Langmuir***, 22: 7226-7234 (2006).

132. Chibowski, E., Holysz, L., Radleczuk, H., "Comparison of the Lifshitz–van der Waals / acid–base and contact angle hysteresis approaches for determination of solid surface free energy", ***Journal of Adhesion Science and Technology***, 16: 1547-1568 (2002).
133. Tejada, R.I., Marik, J.J., Winer, J.H., "A new metachromatic fluorescent stain for rapid morphologic evaluation of human sperm", ***Fertility and Sterility***, 36: 535-538 (1981).
134. Holf, M., Huttere, R., Fidler, V., "Fluorescence Spektroskopie in Biologie", ***Springer***, Germany, 98-105 (2005).
135. Internet: "John Innes Centre web sayfası", www.jic.ac.uk/microscopy/more/T5_6.htm (2009).
136. Prasad, V., Semwogerere, D., Weeks, E.R., "Confocal microscopy of colloids", ***Journal of Physics: Condensed Matter***, 19: 113102 (2007).
137. Pawley, J.B., "Handbook of biological confocal microscopy", ***Springer***, New York, USA, 19-73 (1995).
138. Auernheimer, J., Dahmen, C., Hersel, U., Bausch, A., Kessler, H., "Photoswitched Cell Adhesion on Surfaces with RGD Peptides", ***Journal of the American Chemical Society***, 127: 16107-16110 (2005).
139. Tomasulo A., Ramakrishna M.V., "Quantum confinement effects in semiconductor clusters. II", ***Journal of Chemical Physics***, 105: 3612-3626 (1996).
140. Jensen, F., "Introduction to computational chemistry", ***John Wiley & Sons Inc.***, USA, 47-57 (1999).
141. Pulay, P., "Ab initio calculation of force constants and equilibrium geometries in polyatomic molecules", ***Molecular Physics***, 17: 197-204 (1969).
142. Pulay, P., "Analytical derivative methods in quantum chemistry, Ab initio methods in quantum chemistry", Lawley, K. P., ed., ***John & Wiley Sons Inc.***, USA, 27-39 (1987).
143. Fermi, E., "A statistical method for determining some properties of the atom", ***Rend. Accad. Naz. Lincei.***, 6: 602-607 (1927).
144. Thomas, L.H., "The calculation of atomic fields", ***Proceedings of the Cambridge Philosophical Society***, 23: 542-550 (1927).

145. Fermi, E., "A statistical method for the determination of some properties of atoms. II. Application to the periodic system of the elements" *Zeitschrift für Physik*, 48: 73-79 (1928).
146. Hohenberg, P., Kohn, W., "Inhomogeneous electron gas", *Physical Review*, 136: 864-871 (1964).
147. Kohn, W., Sham, L.J., "Self-consistent equations including exchange and correlation effects", *Physical Review*, 140: 1133-1138 (1965).
148. Condon, B.J., "Surface area and porosity determination by physisorption and theory", *Elsevier*, Netherlands, 24-35 (2006).
149. Ceperley, D.M., Alder, B.I., "Ground state of the electron gas by a stochastic method", *Physical Review Letters*, 45: 566-569 (1980).
150. Perdew, J.P., Zunger, A., "Self-interaction correction to density-functional approximations for many-electron systems", *Physical Review B*, 23: 5048-5079 (1981).
151. Schündehütte, K.H., "Houben-Weyl: Methoden der organischen chemie", *Thieme Verlag*, Stuttgart, 340-342 (1965).
152. Silberzan, P., Leger, L., Ausserre, D., Benattar, J.J., "Silanation of silica surfaces. A new method of constructing pure or mixed monolayers", *Langmuir*, 7: 1647-1651 (1991).
153. Tsukruk, V.V., Luzinov, I., Julthongpiput, D., "Sticky molecular surfaces: Epoxysilane self-assembled monolayers", *Langmuir*, 15: 3029-3032 (1999).
154. Patolsky, F., Zheng, G., Lieber, C.M., "Nanowire-based biosensors", *Analytical Chemistry*, 78: 4260-4269 (2006).
155. Tasis, D., Tagmatarchis, N., Bianco, A., Prato, M., "Chemistry of carbon nanotubes", *Chemical Reviews*, 106: 1105-1136 (2006).
156. Gooding, J.J., Wibowo, R., Liu, J., Yang, W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F.J., Shapter, J.G., Hibbert, D.B., "Protein electrochemistry using aligned carbon nanotube arrays", *Journal of the American Chemical Society*, 125: 9006-9007 (2003).
157. Rupcich, N., Goldstein, A., Brennan, J.D., "Optimization of sol-gel formulations and surface treatments for the development of pin-printed protein microarrays", *Chemistry of Materials*, 15: 1803-1811 (2003).

158. Pandey, P.C., Upadhyay, S., Tiwari, I., Tripathi, V.S., "An organically modified silicate-based ethanol biosensor", ***Analytical Biochemistry***, 288: 39-43 (2001).
159. Cloarec, J.P., Deligianis, N., Martin, J.R., Laurence, I., Souteyrand, E., Polychronakos, C., Lawrence, M.F., "Immobilization of homooligonucleotide probe layers onto Si/SiO₂ substrates: characterization by electrochemical impedance measurements and radiolabelling", ***Biosensors and Bioelectronics***, 17: 405-412 (2002).
160. Yuan, W., Oouji, W.J.V., "Characterization of organofunctional silane films on zinc substrates", ***Journal of Colloid and Interface Science***, 185: 197-209 (1997).
161. Satyanarayana, N., Sinha, S.K., "Tribology of PFPE overcoated self-assembled monolayers deposited on Si surface", ***Journal of Physics D: Applied Physics***, 38: 3512-3522 (2005).
162. Kern, W., Puotinen, D.A., "Cleaning solutions based on hydrogen peroxide for use in silicon semiconductor technology", ***RCA Review***, 31: 187-206 (1970).
163. Kallury, K.M.R., Brennan, J.D., Krull, U.J., "Depth profiling of functionalized silane films on quartz and silicon substrates and of urease immobilized on such films by angle-resolved x-ray photoelectron spectroscopy", ***Analytical Chemistry***, 67: 2625-2634 (1995).
164. Moulder, J.F., "Handbook of X-ray photoelectron spectroscopy", ***Perkin-Elmer Corporation***, Eden Prairie, USA, 287-295 (1992).
165. Chehimi, M.M., Abel, M.L., Watts, J.F., Digby, R.P., "Surface chemical and thermodynamic properties of γ -glycidoxypolytrimethoxysilane-treated alumina: an XPS and IGC study", ***Journal of Materials Chemistry***, 11: 533-543 (2001).
166. Zhang, M.C., Kang, E.T., Neoh, K.G., Tan, K.L., "Surface modification of aluminum foil and PTFE film by graft polymerization for adhesion enhancement", ***Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects***, 176: 139-150 (2001).
167. Sales, J.A.A., Airoidi, C., "Calorimetric investigation of metal ion adsorption on 3-glycidoxypolytrimethylsiloxane+propane-1,3-diamine immobilized on silica gel", ***Thermochimica Acta***, 427: 77-83 (2005).
168. Aspnes, D.E., "Handbook of optical constants of solids", Palik, E. D., ed., ***Academic Press***, Orlando, USA, 89-90 (1985).

169. Lee, S.J., Yu, A.C.C., Lo, C.C.H., Fan, M., "Optical properties of monodispersive FePt nanoparticle films", ***Physica Status Solidi A***, 201: 3031-3036 (2004).
170. Elender, G., Kuhher, M., Sackmann, E., "Functionalisation of Si/SiO₂ and glass surfaces with ultrathin dextran films and deposition of lipid bilayers", ***Biosensors and Bioelectronics***, 11: 565-577 (1996).
171. Demirel, G., Caglayan, M.O., Garipcan, B., Duman, M., Pişkin, E., "Oriented immobilization of IgG on hydroxylated Si(100) surfaces via protein-A by a multiple-step process based on a self-assembly approach", ***Journal of Materials Science***, 42: 9402-9408 (2007).
172. Hong, S., Lee, D., Zhang, H., Zhang, J.Q., Resvick, J.N., Khademhosseini, A., King, M.R., Langer, R., Karp, J.M., "Covalent immobilization of P-Selectin enhances cell rolling", ***Langmuir***, 23: 12261-12268 (2007).
173. Gao, L., Fang, Y., Wen, X., Li, Y., Hu, D., "Monomolecular layers of pyrene as a sensor to dicarboxylic Acids", ***Journal of Physical Chemistry B***, 108: 1207-1213 (2004).
174. Luzinov, I., Julthongpiput, D., Liebmann-Vinson, A., Cregger, T., Foster, M.D., Tsukruk, V.V., "Epoxy-terminated self-assembled monolayers: Molecular glues for polymer layers", ***Langmuir***, 16: 504-516 (2000).
175. Internet: "Prifysgol Aberystwyth Universitesi web sayfası", http://users.aber.ac.uk/ruw/teach/340/stm_intro.html (2009).
176. Wang, A., Tang, H., Cao, T., Salley, S.O., Simon, K.Y., "In vitro stability of organosilane self-assembled monolayers and multiplayers", ***Journal of Colloid and Interface Science***, 291: 438-447 (2005).
177. Yang, L., Li, Y., "AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium–tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7 ", ***Biosensors and Bioelectronics***, 20: 1407-1416 (2005).
178. Erdik, E., "Organik kimyada spektroskopik yöntemler", ***Gazi Kitabevi***, Ankara, 10-25 (1993).
179. Wachtveit, J., Nagale, T., Puell, B., "Ultrafast photoisomerization of azobenzene compounds", ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, 105: 283-288 (1997).

180. Norikane, Y., Kitamoto, K., Tamaoki, N., "Novel crystal structure, cis-trans isomerization, and host property of meta-substituted macrocyclic azobenzenes with the shortest Linkers", **Journal of Organic Chemistry**, 68: 8291-8304 (2003).
181. Lamarre, L., Sung, C.S.P., "Studies of physical aging and molecular motion by azochromophoric labels attached to the main chains of amorphous polymers", **Macromolecules**, 16: 1729-1736 (1983).
182. Rau, H., "Spektroskopische eigenschaften organischer azoverbindungen", **Angewandte Chemie**, 85: 248-258 (1973).
183. Rau, H., "Studies in organic chemistry: Photochromism, molecules and systems", Durr, H., Bonas-Laurent, H., eds., **Elsevier**, Amsterdam, 165-192 (1990).
184. Junge, D.M., McGrath, D.V., "Photoresponsive dendrimers", **Chemical Communications**, 9: 857-858 (1997).
185. Hafız, H.R., "New photosensitive ultrathin films fabricated by the Langmuir-Blodgett technique", **Smart Materials and Structures**, 13: 68-71 (2004).
186. Horie, M., Sakano, T., Osakada, K., Nakao, H., "A new azaferrocenophane with an azobenzene-containing ligand. Remote control of photoisomerization of the azobenzene group by redox of the iron center", **Organometallics**, 23: 18-20 (2004).
187. Yu, A., Bobrovsky, A.Y., Boiko, N.I., Shibaev, V.P., "Dual photochromism of copolymers containing two different types of photoisomerizable side groups", **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 138: 261-267 (2001).
188. Hagen, S., Kate, P., Peters, M.V., Hecht, S., Wolf, M., Tegeder, P., "Kinetic analysis of the photochemically and thermally induced isomerization of an azobenzene derivative on Au(111) probed by two-photon photoemission", **Applied Physics A: Materials Science & Processing**, 93: 253-260 (2008).
189. Hurdac, N., Ades, D., Belleney, J., Siove, A., Sauvet, G., "Photoresponsive new polysiloxanes with 4-substituted azobenzene side-groups. Synthesis, characterization and kinetics of the reversible trans-cis-trans isomerization", **Macromolecular Chemistry and Physics**, 208: 2600-2610 (2007).

190. Kumar, B., Suresh, K.A., "Kinetics of *trans-cis* isomerization in azobenzene dimers at an air-water interface", ***Physical Review E***, 80: 021601 (2009).
191. Zhang, X., Wen, Y., Li, Y., Li, G., Du, S., Haiming, G., Yang, L., Jiang, L., Gao, H., Song, Y., "Molecularly controlled modulation of conductance on azobenzene monolayer-modified silicon surfaces", ***Journal of Physical Chemistry C***, 112: 8288-8293 (2008).
192. Lee, K., Pan, F., Carroll, G.T., Turo, N.J., Koberstein, J.T., "Photolithographic technique for direct photochemical modification and chemical micropatterning of surfaces", ***Langmuir***, 20: 1812-1818 (2004).
193. Yang, D., Piech, M., Nelson, S.B., Gust, D., Vail, S., Garcia, A.A., Schneider, J., Park, C.D., Hayes, M.A., Picraux, S.T., "Photon control of liquid motion on reversibly photoresponsive surfaces", ***Langmuir***, 23: 10864-10872 (2007) .
194. Delorme, N., Bardeau, J.F., Bulou, A., Poncin-Epaillard, F., "Azobenzene-containing monolayer with photoswitchable wettability", ***Langmuir***, 21: 12278-12282 (2005).
195. Yager, K.G., Barrett, C.J., "Novel photo-switching using azobenzene functional materials", ***Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry***, 182: 250-261 (2006).
196. Shirota, Y., Moriwaki, K., Yoshikawa, S., Ujike, T., Nakano, H., "4-[Di(biphenyl-4-yl)amino]azobenzene and 4,4'-bis [bis(4'-tert-butylbiphenyl-4-yl)amino]azobenzene as a novel family of photochromic amorphous molecular materials", ***Journal of Materials Chemistry***, 8: 2579-2581 (1998).
197. Rau, H., Roettger, D., "Photochromic azobenzenes which are stable in the *trans* and *cis* forms", ***Molecular Crystals and Liquid Crystals and Liquid Crystals Science and Technology Section A-Molecular Crystals and Liquid Crystals***, 246: 143-146 (1994).
198. Rottger, D., Rau, H., "Photochemistry of azobenzenophanes with three-membered bridges", ***Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry***, 101: 205-214 (1996).
199. Li, W., Amirfazli, A., "A thermodynamic approach for determining the contact angle hysteresis for superhydrophobic surfaces", ***J. Colloid Interface Sci.***, 292: 195-201 (2005).

200. Van Oss, C.J., "Interfacial Forces in Aqueous Media", **Markel Dekker**, New York, USA, 114-119 (1994).
201. Erbil, H.Y., "Surface chemistry of solid and liquid interfaces", **Blackwell Publishing**, Malden, USA, 308-311 (2006).
202. Foglieni, B., Cremonesi, L., Travi, M., Ravani, A., Giambona, A., Rosatelli, M.C., Perra, C., Fortina, P., Ferrari, M., "Thalassemia microelectronic chip: A fast and accurate method for mutation detection", **Clinical Chemistry**, 50: 73-79 (2004).
203. Yershov, G., Barsky, V., Belgovskiy, A., Kirillov, E., Kreindlin, E., Ivanov, I., Parinov, S., Guschins, D., Drobishev, A., Dubiley, S., Mirzabekov, A., "DNA analysis and diagnostics on oligonucleotide microchips", **Proceeding of the National Academy of the United States of America**, 93: 4913-4918 (1996).
204. Drobyshev, A., Mologina, N., Shik, V., Pobedinskaya, D., Yershov, G., Mirzabekov, A., "Sequence analysis by hybridization with oligonucleotide microchip: identification of b-thalassemia mutations", **Gene**, 188: 45-52 (1997).
205. Zhang, Q., Subramanian, V., "DNA hybridization detection with organic thin film transistors: Toward fast and disposable DNA microarray chips", **Biosensors and Bioelectronics**, 22: 3182-3187(2007).
206. Hessner, M.J., Wang, X., Hulse, K., Meyer, L., Wu, Y., Nye, S., Guo., S. W., Ghosh, S., "Three color cDNA microarrays: quantitative assessment through the use of Fluorescein-labeled probes", **Nucleic Acids Research**, 31: 14-18 (2003).
207. Chena, W.Y., Hub, W.P., Suc, Y.D., Taylor, A., Jiang, S., Chang, G. L., "A multispot DNA chip fabricated with mixed ssDNA/oligo (ethylene glycol) self-assembled monolayers for detecting the effect of secondary structures on hybridization by SPR imaging", **Sensors and Actuators B: Chemical**, 125: 607-614 (2007).
208. Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, L.S., Matsudaira, P., Darnell, "Molecular Cell Biology", **W. H. Freeman and Company**, New York, USA, 101-140 (1998).
209. Liu, M., Asanuma, H., Komiyama, M., "Azobenzene-tethered T7 promoter for efficient photoregulation of transcription", **Journal of the American Chemical Society**, 128: 1009-1015 (2005).

210. Liang, X., Asanuma, H., Kashida, H., Takasu, A., Sakamoto, T., Kawai, G., Komiyama, M., "NMR study on the photoresponsive DNA tethering an azobenzene. Assignment of the absolute configuration of two diastereomers and structure determination of their duplexes in the trans-form", **Journal of the American Chemical Society**, 125: 16408-16415 (2003).
211. Hanga, T.C., Guiseppi-Elie, A., "Frequency dependent and surface characterization of DNA immobilization and hybridization", **Biosensors and Bioelectronics**, 19: 1537-1548 (2004).
212. Niu, S., Singh, G., Saraf, R.F., "Label-less fluorescence-based method to detect hybridization with applications to DNA micro-array", **Biosensors and Bioelectronics**, 23: 714-720 (2007).
213. Hana, J., Leea, H., Nguyenb, N.Y., Beaucagec, S.L., Puri, R.K., "Novel multiple 5V-amino-modified primer for DNA microarrays", **Genomics**, 86: 252-258 (2005).
214. Wei, F., Sun, B., Liao, W., Ouyang, J., Zhao, X.S., "Achieving differentiation of single-base mutations through hairpin oligonucleotide and electric potential control", **Biosensors and Bioelectronics**, 18: 1149-1155 (2003).
215. Babochkina, T., Mergenthaler, S., De Napoli, G., Hristoskova, S., Tercanli, S., Holzgreve, W., Hahn, S., "Numerous erythroblasts in maternal blood are impervious to fluorescent in situ hybridization analysis, a feature related to a dense compact nucleus with apoptotic character", **Haematologica**, 90: 740-745 (2005).
216. Ding, C., Chiu, R.W., Lau, T.K., "MS analysis of single-nucleotide differences in circulating nucleic acids: Application to noninvasive prenatal diagnosis", **Proceeding of the National Academy of the United States of America**, 20: 10762-10767 (2004).
217. Hristoskova, S., Holzgreve, W., Hahn, S., Rusterholz, C., "Human mature erythroblasts are resistant to apoptosis", **Experimental Cell Research**, 10: 1024-1032 (2007).
218. Mavrou, A., Kouvidi, E., Antsaklis, A., Souka, A., Kitsiou Tzeli, S., Kolialexi, A., "Identification of nucleated red blood cells in maternal circulation: A second step in screening for fetal aneuploidies and pregnancy complications", **Prenatal Diagnosis**, 27: 150-153 (2007).

219. Vrettou, C., Traeger-Synodinos, J., Tzetis, M., Malamis, G., Kanavakis, E., "Rapid screening of multiple β -globin gene mutations by real-time PCR on the LightCycler: Application to carrier screening and prenatal diagnosis of Thalassemia syndromes", **Clinical Chemistry**, 49: 769-776 (2003).
220. Kolialexi, A., Traeger-Synodinos, J.R., Papantoniou, N.E., Antsaklis, A., Mavrou, A., "Noninvasive prenatal diagnosis of beta-thalassemia using individual fetal erythroblasts isolated from maternal blood after enrichment", **Prenatal Diagnosis**, 27: 1228-1232 (2007).
221. Situma, C., Moehring, A.J., Noor, M.A.F., Soper, S.A., "Immobilized molecular beacons: A new strategy using UV-activated poly(methyl methacrylate) surfaces to provide large fluorescence sensitivities for reporting on molecular association events", **Analytical Biochemistry**, 363: 35-45 (2007).
222. Rubina, A.Y., Pankov, S.V., Dementieva, E.I., Penkov, D.N., Butygin, A.V., Vasiliskov, V.A., Chudinov, A.V., Mikheikin, A.L., Mikhailovich, V.M., Mirzabekov, A.D., "Hydrogel drop microchips with immobilized DNA: properties and methods for large-scale production", **Analytical Biochemistry**, 325: 92-106 (2004).
223. Zuo, X., Yang, X., Wang, K., Tan, W., Li, H., Zhou, L., Wen, J., Zhang, H., "Improving the performance of immobilized molecular beacons through cleavage", **Analytica Chimica Acta**, 567: 173-178 (2006).
224. Michel, W., Mai, T., Naiser, T., Ott, A., "Optical study of DNA surface hybridization reveals DNA surface density as a key parameter for microarray hybridization kinetics", **Biophysical Journal**, 92: 999-1004 (2007).
225. Ciardelli, F., Pieroni, O., "Molecular switches", Feringa, B.L., ed., **Wiley-VCH**, Weinheim, 399-345 (2001).
226. Lehn, J.M., "Supramolecular chemistry and self-assembly special feature: Toward complex matter: Supramolecular chemistry and self-organization", **Proceeding of the National Academy of the United States of America**, 99: 4763-4768 (2002).
227. Ballardini, R., Balzani, V., Credi, A., Gandolfi, M.T., Venturi, M., "Artificial molecular-level machines: Which energy to make them work?", **Accounts of Chemical Research**, 34: 445-455 (2001).
228. Dugave, C., Demange, L., "Cis-trans isomerization of organic molecules and biomolecules: Implications and applications", **Chemical Reviews**, 103: 2475-2532 (2003).

229. Higuchi, M., Minoura, N., Kinoshita, T., "Photocontrol of micellar structure of an azobenzene containing amphiphilic sequential polypeptide", **Chemistry Letters**, 23: 227-231 (1994).
230. Vollmer, M.S., Clark, T.D., Steinem, C., Ghadiri, M.R., "Photoswitchable hydrogen-bonding in self-organized cylindrical peptide systems", **Angewandte Chemie International Edition**, 38: 1598-1601 (1999).
231. Kumar, G.S., DePra, P., Zhang, K., Neckers, D.C., "Chelating copolymers containing photosensitive functionalities", **Macromolecules**, 17: 2463-2467(1984).
232. Bhatnagar, A., Mueller, J., Osborn, D.J., Martin, T.L., Wirtz, J., Mohanty, D.K., "Azoaromatic polyethers", **Polymer**, 36: 3019-3025 (1995).
233. Pouliquen, G., Tribet, C., "Light-triggered association of bovine serum albumin and azobenzene-modified poly(acrylic acid) in dilute and semidilute solutions", **Macromolecules**, 39: 373-383 (2005).
234. Willner, I., Rubin, S., "Control of the structure and functions of biomaterials by light", **Angewandte Chemie International Edition**, 35: 367-385 (1996).
235. Lee, W.S., Ueno, A., "Photocontrol of the catalytic Activity of a β -cyclodextrin bearing azobenzene and histidine moieties as a pendant group", **Macromolecular Rapid Communications**, 22: 448-450 (2001).
236. Internet: "Wikipedia web sayfasi", www.en.wikipedia.org/wiki/Cyanine (2009).
237. Internet: "Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc. web sayfasi", www.jacksonimmuno.com/technical/f-cy3-5.asp (2009).
238. Fouquea, B., Schaacka, B., Obeida, P., Combea, S., Getinb, S., Barritaultb, P., Chatonb, P., Chatelaina, F., "Multiple wavelength fluorescence enhancement on glass substrates for biochip and cell analyses", **Biosensors and Bioelectronics**, 20: 2335-2340 (2005).
239. Pearson, D., Downard, A.J., Muscroft-Taylor, A., Abell, A.D., "Reversible photoregulation of binding of α -chymotrypsin to a gold surface", **Journal of the American Chemical Society**, 129: 14862-4863 (2007).

240. Tüzmen, Ş., Schechter, A.N., "Genetic diseases of hemoglobin: Diagnostic methods for elucidating β -thalassemia mutations", **Blood Reviews**, 15: 19-29 (2001).
241. Thein, S.L., " β -thalassemia, Bailliere's Clinical Haematology", **The Haemoglobinopathies**, Editors: Higgs, D.R., Weatherall, D.J., 6 (1): 151-175 (1993).
242. Tadmouri, G.O., Başak, A.N., " β -thalassemia in Turkey; A review of the clinical epidemiological molecular and evolutionary aspects", **Hemoglobin**, 25: 227-239 (2001).
243. Tadmouri, G.O., " β -thalassemia in Turkey; Distribution, diversity, evolution and phenotype-genotype correlations", Doktora Tezi, Boğaziçi Üniversitesi, **Fen Bilimleri Enstitüsü**, 101-115 (1999).
244. Mönch, W., "Semiconductor surfaces and interfaces", **Springer-Verlag**, New York, USA, 169-272 (2001).
245. Fristch, J., Pavone, P., "Ab initio calculation of the structure, electronic states, and the phonon dispersion of the Si(100) surface", **Surface Science**, 344: 159-173 (1995).
246. Gay, S.C.A., Srivastava, G.P., "Pseudopotential studies of co-adsorption of group-V elements and Ge on Si(100) surfaces", **Surface Science**, 443: 253-264 (1999).
247. Kanai, Y., Cicero, G., Selloni, Car, R., Gali, G., "A theoretical study of biotin chemisorption on Si-SiC(001) surfaces", **Journal of Physical Chemistry B**, 109: 13656-13662 (2005).
248. Ignatev, I.S., Partal, F., Gonzales, J.J.L., "Intramolecular hydrogen bonding in silanediols", **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, 678: 249-256 (2004).
249. Sque, S.J., Jones, R., Briddon P.R., "Structure, electronics, and interaction of hydrogen and oxygen on diamond surfaces", **Physical Review B**, 73: 085313-085317 (2006).
250. Burn, G., "Solid State Physics", **Academic Press**, USA, 163-175 (1990).
251. Motto, R., Srivastava, G.P., Ferraz, A.C., "Methanol adsorption on silicon (001)", **Surface Science**, 575: 287-299 (2005).

252. Choudhary, D., Clancy, P., Bowler, D.R., "Adsorption of pentacene on a silicon surface", **Surface Science**, 578: 20-26 (2005).
253. Wong, A.K.Y., Krull, U.J., "Surface characterization of 3-glycidoxypropyltrimethoxysilane films on silicon-based substrates", **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 383: 187-200 (2005).
254. Chen, W.K., Cao, M.J., Liu, S.H., Lu, C.H., Xu, Y., Li, Y.Q., "A first-principles study of the chemi-adsorption of benzene on Au(100) surface", **Chemical Physics Letters**, 417: 414-418(2006).
255. Valcarcel, A., Clotet, A., Ricart, J.M., Delbecq, F., Sautet, P., "Comparative DFT study of the adsorption of 1,3-butadiene, 1-butene and 2-cis/trans-butenes on the Pt(111) and Pd(111) surfaces", **Surface Science**, 549: 121-133 (2004).
256. Kurita, N., Nebashi, S. Kojima, M., "Density functional molecular orbital calculations on the stability of hydrogen-bonded 4-hydroxyazobenzene dimmers", **Chemical Physics Letters**, 408: 197-204 (2005).
257. Satzger, H., Root, C., Renner, C., Behrendt, R., Moroder, L., Wachtveitl, J., Zinth, W., "Picosecond dynamics in water-soluble azobenzene-peptides", **Chemical Physics Letters**, 396: 191-197 (2004).
258. Henzl, J., Mehlhorn, M., Gawronski, H., Rieder, K., Morgenstern, K., "Reversible cis-trans isomerization of a single azobenzene molecule", **Angewandte Chemie International Edition**, 45: 603-606 (2006).

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : BİRLİK DEMİREL, Gökçen
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 13.07.1980, Nevşehir
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 0 (312) 202 14 97
 Faks : 0 (312) 202 22 79
 e-mail : gbirlik@gazi.edu.tr

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2004
Lisans	Gazi Üniversitesi/Kimya Bölümü	2003
Lise	Özel Atılım Lisesi	1998

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2008-2009	The Pennsylvania University (ABD)	Ziyaretçi Araştırmacı
2005-	Gazi Üniversitesi	Araş. Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce, Fransızca

Hobiler

Nanoteknoloji, bilgisayar teknolojisi, yüzme, müzik, kitap.

Yayınlar

18. **Demirel Birlik G.**, Çaykara T, Çakmak M., “Photocontrolling of DNA Hybridization onto a Photoswitching Surface”, **Journal of the American Chemical Society**, (Gönderildi), 2009
17. **Demirel Birlik G.**, Çaykara T, Çakmak M., “Molecular Design for Reversibly Photoresponsive Surfaces”, **ACS Applied Materials & Interfaces**, (Gönderildi), 2009
16. **Vakıflı A., Demirel Birlik G., and Çaykara T.**, “Swelling Characteristics of Poly(*N*-isopropylmethacrylamide-co-itaconic acid) Gels Prepared in Various Conditions”, **European Polymer Science**, (Gönderildi), 2009.
15. **Demirel Birlik G.**, Çakmak M., Çaykara T.,” Adsorption of 4-bromostyrene on the Si(001)-(1x2) Surface” , **Surface Science**, (Gönderildi), 2009.
14. **Demirel Birlik G.**, Çakmak M., Çaykara T.,” Adsorption of Ferrocene on the H-Terminated Si(100)-(2x2) surface: A Density Functional Study”, **Surface Science**, (Gönderildi), 2009.
13. Başer B., **Demirel Birlik G.**, Çaykara, T., “DNA Adsorption Using Comb-Type Grafted Hydrogels Consisting of Poly(*N,N*-dimethylacrylamide) and Chitosan”, **Journal of Biomaterials Science: Polymer Edition**, (Baskıda), 2009.
12. **Demirel Birlik G.**, Çaykara T., “DNA immobilization on polymer modified Si(100) surface by controlling pH”, **Applied Surface Science**, 255, 6571- 6576 (2009).
11. **Demirel Birlik G.**, Coşkun S., Kalkan M., Çaykara T.,” Preparation of a Novel Polymer-Modified Si Surface for DNA Immobilization”, **Macromolecular Bioscience**, 9 ,472-479, (2009).
10. Başer B., **Demirel Birlik G.**, Açık, L., Çaykara T. “Preparation of Comb-Type Grafted Hydrogels Composed of Poly(acrylamide) and Chitosan and Their Use for DNA Adsorption “, **Journal of Applied Polymer Science**, 111, 1862-1868 (2009).
9. **Demirel Birlik, G.**, Çaykara T. ‘Reentrant Phase Transition and Fast Responsive Behaviors of Poly(*N*-[3-(dimethylaminopropyl)]methacrylamide) Hydrogels Prepared in PEG Solutions, **Journal of Applied Polymer Science**, 113, 547-552, (2009).

8. **Demirel Birlik G.,** Çaykara, T., Demiray M., Gürü M.,” Swelling Behavior of Macroporous Poly(N-[3-(dimethylaminopropyl)]methacrylamide-co-acrylamide) Hydrogels” **Journal of Macromolecular Science Part A: Pure and Applied Chemistry**, 46, 1–7, (2009).
7. **Birlik G.,** Demirel G.,Çakmak M., Çaykara T.,” Chemisorption of 4-(4-Amino-Phenylazo) Benzoic Acid Molecule On The Si(001)- (4x2) Surface” **Surface Science**, 601, 3760-3764, (2007).
6. Demirel G., **Birlik G.,** Çakmak M., Ellialtıoglu Ş., Çaykara T., “Atomic and electronic structure of 3-aminopropyltrimethoxysilane on Si(111)- $\sqrt{3} \times \sqrt{3}$ R30°”, **Surface Science**, 601, 3740-3744, (2007).
5. Caykara T., **Birlik G.,** İzol D., “Reentrant phase transition and network parameters of hydrophobically modified poly[2-(diethylamino)ethylmethacrylate-co-N-vinyl-2-pyrrolidone/octadecylacrylate]] hydrogels” **Eur. Polym. J.** , 43, 514-521, (2007).
4. Caykara T., İzol D., **Birlik G.,** Akaoğlu B. “Adsorption of Surfactant by Hydrophobically Modified Poly[2-(diethylamino)ethylmethacrylate-co-N-vinyl-2-pyrrolidone/octadecyl acrylate]] Hydrogels and Effect of Surfactant Adsorption on the Volume Phase Transition” **J. Appl. Polym. Sci.**, 103, 3771-3775, (2007).
3. Çaykara, T., Şengül, G., **Birlik, G.,** ‘Preparation and Swelling Properties of Temperature-Sensitive Semi-Interpenetrating Polymer Networks Composed of Poly(N-tert-butylacrylamide-co-acrylamide) and Hydroxypropyl Cellulose’ **Macromol. Mater. Eng.**, 291, 1044 (2006).
2. Çaykara, T., **Birlik, G.,** ‘Synthesis and Network Parameters of Hydrophobic Poly[(N-3-(dimethylamino)propyl)methacrylamide-co-laurylacrylate] hydrogels’ **J. Appl. Polym. Sci.**, 101, 4159, (2006).
1. Çaykara, T., **Birlik, G.,** ‘Swelling and adsorption properties of hydrophobic poly [(N-3-(dimethylamino)propyl)methacrylamide-co-lauryl acrylate] hydrogels in aqueous solutions of surfactants” **Macromol. Mater. Eng.**, 290 (9), 869, (2005).