

**BİYOMOLEKÜLER TANI SİSTEMLERİ
İÇİN TAŞINABİLİR, GERÇEK ZAMANLI
VE ETİKETSİZ BİYOSENSOR
GELİŞTİRİLMESİ VE
KARAKTERİZASYONU**

**DEVELOPMENT AND
CHARACTERIZATION OF PORTABLE,
REAL-TIME & LABEL-FREE
BIOSENSORS FOR BIOMOLECULAR
RECOGNITION**

MUSTAFA OĞUZHAN ÇAĞLAYAN

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

KİMYA MÜHENDİSLİĞİ Anabilim Dalı İçin Öngördüğü

DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

2009

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda**
DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Tülin KUTSAL

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. Erhan BİŞKİN

Üye :.....
Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Handan YAVUZ

Üye :.....
Yrd. Doç. Dr. Sevil DİNÇER

ONAY

Bu tez/...../..... tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca kabul edilmiştir.

Prof.Dr. Erdem YAZGAN
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

BİYOMOLEKÜLER TANI SİSTEMLERİ İÇİN TAŞINABİLİR, GERÇEK ZAMANLI VE ETİKETSİZ BİYOSENSOR GELİŞTİRİLMESİ VE KARAKTERİZASYONU

Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN

ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, optik transdüserlere sahip, etiketsiz tanı yapabilen, taşınabilir ve gerçek zamanlı analiz imkanı sağlayan biyosensörlerin geliştirilmesi ve karakterizasyonudur. Bu kapsamda, tez çalışması 11 ayrı çalışma halinde gerçekleştirilmiştir. Tez çalışmalarında optik esaslı biyosensör geliştirilmesi için, uygun yüzey seçimi, ligand – analit çiftleri, bu ligandların yüzeye immobilizasyonu, tek yongada birden fazla analiz yapabilmek için gerekler ile farklı “sensör duyarlılığını artırma” yöntemleri denenmiştir. Birinci bölümde, SPR sensöründe kullanılabilecek alternatif substrat/metal film ve ışık kaynağı seçimi için, Fresnel yansıma eşitliklerinin MATLAB ® yardımı ile çözülmesi sonucu elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Hazırlanan model, farklı substrat kombinasyonları ile fonksiyonel yüzeyin modellenmesinde başarılı bir şekilde kullanılmıştır. Tezin 2. bölümünde, sensör yüzeylerinin modifikasyonu (substrat yüzeylerinin temizlenmesi ve kaplanması) ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı temizleme yöntemlerinin uygulandığı bu bölümde, temizlenen yüzeyler elipsometrik yöntemlerle karakterize edilmiştir.

Tezin 3. Bölümünde, akışlı sistemlerde mikro-akışkan kanal yaklaşımı yerine, görüntülemeli SPR kullanılarak, bir yonga üzerinde birden fazla analizin aynı anda gerçekleştirilebilmesi için mikro-desenleme yöntemi olarak Ink-Jet litografi çalışmaları yapılmıştır. Alternatif mikro-desenleme yöntemi olarak fotolitografi çalışmaları yapılmış ve fotolitografik desenlemelerin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir. Bu bölümde 50 µm büyüklüğünde desenler oluşturulmuştur. Ink-Jet litografi çok daha esnek çalışma imkanı sunmaktadır ancak, elde edilen desenlerin yüzeyde yayılması sonucu sınırlardaki belirsizlik, bu yöntemin tercih edilmemesine neden olmuştur. Çalışmanın bir sonraki bölümünde, fotolitografi ile elde edilen mikro-desenlenmiş SPR yongalarında alınan sinyal incelenerek, desenleme boyutunun etkisi incelenmiştir.

Tezin bundan sonraki bölümünde, immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi amacıyla, farklı çözücü ve etkileşim parametrelerinde kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakaların(SAM) formasyonu ile ilgili bir çalışma yapılmıştır. Taban malzeme olarak, pürüzlülüğü ve yüzey bozukluğu az olan Si yongalar seçilmiştir. Tek tabaka oluşumuna çözücü ve immobilizasyon parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Çözücü tipinin tek tabaka oluşumunda en büyük parametre olduğu görülmüştür.

Bir sonraki çalışmada, biyomolekül immobilizasyonu için, tabaka üstü tabaka (layer by layer) formasyonu ile kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar üzerine farklı fonksiyonellikte gruplar immobilize edilerek, bir IgG sensörün duyarlılığının artırılması amaçlanmıştır. Tabaka üstü tabaka formasyonu ile IgG molekülleri Protein A üzerinde yönlenmiş olarak immobilize edilmiş ve sinyal farkı gözlenmiştir.

Alternatif optik sensör yöntemi olan elipsometri kullanılarak, oligonükleotid proba sahip yüzeyin sensör performansı ise bir diğer çalışmada değerlendirilmiştir. Immobilizasyon sırasında kademeli tabaka üstü tabaka immobilizasyon tekniği kullanılmıştır. Oligonükleotid problemler ile 50 nM tayin sınırı elde edilmiş, nonspesifik bağlanma miktarının, en düşük derişimde alınan sinyale oranla 1/5 civarında olduğu bulunmuştur.

Tezin bir sonraki bölümünde, farklı bir alternatif denenmiştir. Elipsometrik sensör uygulamasında Au-nanopartikül kullanılarak, yüzeye immobilize edilen Au-nanopartikülün TIRE sensöründen alınan cevapta yapacağı muhtemel iyileştirme incelenmiştir. Immobilizasyon tekniği olarak çok kademeli immobilizasyon ile kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar kullanılmıştır. Au-nanopartiküle sahip yüzeyin lokalize plazmon rezonans etkisi ile daha yüksek bir hassasiyette sensör cevabı verdiği (yaklaşık % 450 daha yüksek) görülmüştür. Bu uygulama LPRe-TIRE (Localized Plasmon Resonance enhanced Total Internal reflection Ellipsometry) olarak adlandırılmıştır.

Bir sonraki çalışmada, mikro-desenlenmiş yüzeyde oligonükleotid prob taşıyan SPR yongası hazırlanmış ve performansı değerlendirilmiştir. Mikro desenlenmiş yüzeylerde eşlenik hibridizasyonu ile nonspesifik etkileşimler incelenmiştir. Sensör cevabının 20 dakika içerisinde alındığı ve nonspesifik sinyalin çok düşük olduğu görülmüştür.

Tezin son çalışmasında ise, iki optik sensör sisteminin (Yüzey plazmon rezonans, SPR ve içten tam yansımali elipsometri TIRE) bir arada kullanıldığı ve böylece sensör hassasiyetinin artırıldığı bir çalışma yapılmıştır. SPR ile güçlendirilmiş TIRE uygulaması (SPRe-TIRE) ile Cu^{2+} tayini için kullanılan yüzeyde bu kez immobilizasyon kendiliğinden düzenlenme yerine elektrokimyasal indirgeme ile gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, kompleks oluşturma reaksiyonu eş zamanlı olarak incelenmiş ve 10 nM Cu^{2+} algılama sınırına ulaşılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Yüzey plazmon rezonans (SPR), Ellipsometri, İçten tam yansımali elipsometri (TIRE), Oligonükleotid esaslı sensör, Kendiliğinden düzenlenen tabakalar (SAM), Lokalize plazmon rezonans

Danışman: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF PORTABLE, REAL-TIME & LABEL-FREE BIOSENSORS FOR BIOMOLECULAR RECOGNITION

Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN

ABSTRACT

The aim of the presented study is; to develop and characterize biosensors that enabling real time analysis, and provide label-free diagnosis and having optical transducer. The thesis includes 11 different studies were held in this scope. In these studies, several processes were investigated to develop optical based biosensors; including selection of a appropriate surface for substrates and of analyte-ligand pairs, immobilization techniques of these pairs and requirements to be able to do more than one analysis on a single chip, as well as, increment of sensor sensitivity. In the first part, for selecting the light source and alternative substrate/metal film used in SPR sensor; results which were obtained from the solution of Fresnel equations by MATLAB ® modeling have been evaluated. The prepared model has been successfully utilized to model the functional surface containing different substrate combinations. Optimization works have been carried out to modify the sensor surfaces (cleaning and coating of substrate surface) in the second part of the thesis. The cleaned surfaces were characterized by ellipsometric methods in the part where different cleaning methods were applied.

Third part of the thesis to perform multi analyze in one assay by using imaging SPR, Ink-Jet lithography techniques is one of the micropatterning techniques were utilized instead of microfluidic approach. For an alternative micro-patterning method, photolithography studies and optimization of photolithographic patterning were also done. In this part, patterns are formed 50 µm in size. Ink-Jet lithography provides way flexibility but, the uncertainty at the boundaries that come out with spreading of the patterns obtained on the surface, caused this method undesirable. In the following part of the study, the possible effects of patterning size to SPR signal was observed by examining the signals from the micro-patterned SPR chips obtained by photolithography.

In the next part of the thesis, in order to develop immobilization techniques, formation of self assembled monolayers in different solvents and with various interaction conditions was investigated. Si chips were selected due to having less surface foulness and roughness as substrate material. The effect of immobilization parameters and solvents on the single layer formation is examined. It was observed that the type of the solvent is the most important parameter in single layer formation process.

In the following study, for bimolecular immobilization, the goal is set to increase the IgG sensor sensitivity by immobilizing groups having different functionality on the self assembled monolayers by using layer by layer formation. With layer by layer formation, it is observed that IgG molecules are found to be directed on Protein A and this orientation was observed and proved with an increment in fluorescence signal.

Using ellipsometry as an alternative optical sensor method, the sensor performance of a surface having an oligonucleotide probe is examined in another study. During immobilization, stepwise layer by layer immobilization technique was used. It is found that the signal observed from nonspecific interaction is 1/5 of specific signal observed at minimal target concentration of 50 nM.

In the following part of the thesis, a different alternative method is studied. By using Au-nanoparticle in ellipsometric sensor application; the possible improvement brought by the response received from TIRE sensor having Au-nanoparticle immobilized on surface; is examined. As the immobilization technique, self assembled monolayer and layer by layer stepwise fictionalization techniques were used. It is observed that, with a localized surface resonance effect on Au-nanoparticle, gives a sensor response with a higher sensitivity (about 450% higher than without Au nanoparticles). This application was labeled as for the first time LPre-TIRE (Localized Plasmon Resonance enhanced Total Internal reflection Ellipsometry) in the related literature.

In the next study, SPR chip carrying oligonucleotide probe on a micro-patterned surface was prepared and its performance was evaluated. Nonspecific interactions

and conjugate hybridization on micro-patterned surfaces were also examined. It was observed that the sensor response is received in 20 minutes to a plateau and the nonspecific signal obtained is very low (i.e in detection limit).

In the last study of the thesis, two optical sensors are used together bringing by an increase in sensor sensitivity. In this case, instead of self assembly techniques, electrochemical reduction technique was used to form monolayers. SPR enhanced TIRE application (SPRe-TIRE) technique was also implemented in Cu^{2+} ion sensors. In this study, complex forming reaction was examined simultaneously and the 10nM Cu^{2+} detection limit was achieved.

Key words: Surface plasmon resonance (SPR), Ellipsometry, Total internal reflection ellipsometry (TIRE), oligonucleotide based sensors, Self assembled monolayers (SAMs), Localized plasmon resonance

Supervisor: Prof. Dr. Erhan BİŞKİN, Hacettepe University, Chemical Engineering Department

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	Sayfa
1 GİRİŞ	1
2 GENEL BİLGİLER	3
2.1 Biyosensörler	3
2.1.1 Biyosensör tipleri	4
2.2 Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR)	7
2.2.1 Yüzey plazmon dalgaları	8
2.2.2 SP dalgalarının dağılma karakteristikleri	8
2.2.3 Radyatif olmayan yüzey plazmon dalgalarının uyarılması ve tayini	11
2.2.4 SPR eğrilerinin karakterizasyonu	14
2.2.5 SPR modellemesi için ince film teorisi: Fresnel modeli	17
2.3 Elipsometri ve Reflektometri	19
2.3.1 Bir elektromanyetik dalga'nın tanımı	19
2.3.2 Maddenin elektromanyetik dalgalara etkisi	21
2.3.3. Polarize ışık	22
2.3.4. Reflektometri temelleri ve elipsometri modellemeleri	24
2.4 Elipsometri Teknikleri	30
2.4.1. Görüntülemeli elipsometre	30
2.4.2. İçten tam yansımali elipsometri (Total Internal Reflection Ellipsometry – TIRE) ve SPR ile güçlendirilmiş TIRE	30
2.5. SPR Yöntemi ve Elipsometri'nin Kullanım Alanları	33
2.5.1. Gıda ve su güvenliği	33
2.5.2 İmmün sistem uyumluluğu	34
2.5.3 Proteomik	34

2.5.4.	Küçük moleküllerin tayini	35
2.5.5	Yüksek çözünürlükte seçim	35
2.5.6	Analizin doğrulanması	35
2.5.7.	Spesifik olmayan etkileşimlerin belirlenmesi	36
2.5.8.	Yalnızca SPR'a yönelik uygulamalar	36
2.6.	Elipsometre ve SPR Sistemlerinin Avantajları	40
2.6.1	Elipsometrik sistemlerin avantajları	40
2.6.2.	SPR sistemlerinin avantajları	41
2.7	Sensör Yüzeylerinin Modifiye Edilmesi	42
2.7.1.	İmmobilizasyon yöntemleri	42
2.7.2	Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar	42
2.7.3.	Kendiliğinden düzenlenen tek tabakaların formasyonu	44
2.7.4	Alkentiollerin uygulanması	49
2.7.5	. Hidrojel ile immobilizasyon	49
2.7.6.	Silanlar	49
2.7.7	Polimer filmler	50
3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE SONUÇLAR	51
3.1	Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yongasında Yansıma Tahmini İçin Matematik Modelleme	53
3.1.1	Üç tabaka için Fresnel eşitliklerinin çözümü	53
3.1.2	Teorik hesaplamalar ve sonuçlar	56
3.1.3	Genel sonuçlar	67
3.2.	Sensör Yüzeylerinin Modifikasyonu	70
3.2.1.	Sıvı (yaş yöntemler)	70
3.2.2.	Kuru yöntemler	71
3.3.	Ink-jet litografi çalışmaları	76

3.3.1	Deneysel yöntemler ve sonuçlar	78
3.4.	Fotolitografi çalışmaları	83
3.5	Mikro-desenlemenin SPR sinyaline etkisi	87
3.6	Silikon (001) Yüzeyine Amino Sonlandırılmış, Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakaların Oluşturulması ve Düzenlenmesi	89
3.6.1	Deneysel çalışma	89
3.6.2	Sonuçlar ve tartışma	90
3.7	IgG'nin Hhidroksillenmiş Si (001) Yüzeyine Çoklu Basamaklı Kendiliğinden Düzenlenen Tabakalar Yaklaşımı ile Protein A Kullanılarak Yönlendirilmiş İmmobilizasyonu	97
3.7.1	Deneysel çalışma	98
3.7.2	Sonuçlar	99
3.8	Elipsometre esaslı DNA biyosensörü	109
3.8.1	Deneysel çalışma	109
3.8.2	Sonuçlar	110
3.9	Elipsometrik biyosensörden alınan cevabın artırılması için altın nanopartiküllerin kademeli yüzey formasyonu yoluyla sensör yongasında kullanılması	121
3.9.1	Deneysel çalışma	121
3.9.2	Sonuçlar	124
3.9.3	Tartışma ve sonuç	134
3.10	Mycobacterium tuberculosis kompleksinin mikro desenlenmiş SPR yongası ile tayini – Prob oligonükleotidlerin kendiliğinden düzenlenme ile immobilizasyonu	136
3.10.1	Deneysel çalışma	137
3.10.2	Sonuçlar ve tartışma	139
3.11.	İzoftalik asit modifiye edilmiş altın yüzeylerin yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş (SPRe) içten tam yansımali elipsometri (TIRE) uygulamaları (SPRe-TIRE)	150

3.11.1	Deneyisel çalışmalar	150
3.11.2.	Sonuçlar	151
4	YORUM	159
	KAYNAKLAR DİZİNİ	166
	EK – MATLAB RUTİNİ	179
	ÖZGEÇMİŞ	185

ŞEKİLLER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Şekil 2.1	Tipik bir biyosensörü oluşturan bileşenler	6
Şekil 2.2	(a) Yüzey yükü tarafından metal (ε_m)-dielektrik (ε_d) ara yüzünde oluşturulan elektrik alanı. E, gelen polarize ışığın elektrik alanı, E_{zd} ve E_{zm} ise sırasıyla dielektrik ve metaldeki ara yüzeye dik olan elektrik alan bileşkeridir. (b) Yüzey yükleri ile ilişkili elektrik alanının (E) ile gösterilen, ara yüzeydeki yük yoğunluğu değişimleri	9
Şekil 2.3	Kretschmann (a) ve Otto (b) konfigürasyonları	14
Şekil 2.4	Kretschmann konfigürasyonu	15
Şekil 2.5	Dielektrik-metal-dielektrik yüzeyinde gelen, geçen, yansıyan ışık demetleri	18
Şekil 2.6	Herhangi bir anda konumun fonksiyonu olarak elektrik alanının gösterimi	20
Şekil 2.7	Kompleks kırınım indisi $\bar{N}_2$ olan bir ortam ile hava ara yüzündeki düzleme paralel etkileşen ışık	21
Şekil 2.8	Aynı fazda ve frekansta olan iki lineer polarize ışık demeti lineer polarize ışık oluşturur	23
Şekil 2.9	Çeyrek dalga faz kayması olan ve aynı frekansta olan iki lineer polarize ışık demeti dairesel polarize ışık oluşturur	24
Şekil 2.10	Geliş düzlemine dik E_s ve geliş düzlemi ile aynı düzlemde E_p hareket eden elektrik alan dalgaları	25

Şekil 2.11	Havadan, TiO_2 gibi bir dielektrik ortama gelen ışık için (a) Fresnel yansıma katsayıları (b) Reflektans	27
Şekil 2.12	Havadan Ta (632,8 nm dalga boyunda $n=1,72$, $k=2,09$) gibi bir metal yüzeyine gelen ışın için geliş açısına karşı reflektans	27
Şekil 2.13	İki ara yüzeyden gerçekleşen kırınım ve yansıma	28
Şekil 2.14	Altın yüzeyler üzerine n-alkanetiyollerin kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakasının moleküler seviyedeki şematik gösterimi (Demirel, 2006)	48
Şekil 2.15.	Cam yüzey üzerine trialkilsilanların kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi	48
Şekil 3.1.1	EM spektrumda görünür bölgede kullanılan lazerler, diğer lazerler görünür renk skalası dışındadır (grafiğin sağ alt köşesi)	54
Şekil 3.1.2	Gelen ışığın tabaka ara yüzeylerinde kırılması ve yansıması	56
Şekil 3.1.3	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (532 nm lazer için)	59
Şekil 3.1.4	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (635 nm lazer için)	60
Şekil 3.1.5	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (690 nm dalga boylu lazer için)	61
Şekil 3.1.6	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (780 nm dalga boylu lazer için)	63

Şekil 3.1.7	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (908 nm dalga boylu lazer için)	64
Şekil 3.1.8	a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (980 nm dalga boylu lazer için)	66
Şekil 3.1.9	Farklı dalga boyundaki monokromatik ışık için bazı metal filmlerin n (a) ve k (b) değerlerindeki değişim	68
Şekil 3.2.1	a) MUA kaplı Au yüzey, b) Yöntem sl ile temizlenmiş (10 dakika) Au yüzey ve c) Yöntem kll ile temizlenmiş (100 W, 30 dakika) Au yüzey	74
Şekil 3.3.1	İnk-jet baskılamada dağıtım mekanizması	76
Şekil 3.3.2	İnk-jet baskılamada dağıtıcılar: (a) Piezoelektrik dağıtıcılar; (b) şırınga bobin enjeksiyon tipi dağıtıcılar	77
Şekil 3.3.3	İnk-jet litografi konfigürasyonu (1) Şablon CD üzerine baskı yapılacak yüzey yerleştirilir (2) Yazıcının CD baskı tepsisinde desenleme yapılır	78
Şekil 3.3.4	Hat desenli ink-jet litografi, MUA tek tabakasının 3D elipsometrik görüntüsü	79
Şekil 3.3.5	Noktacık (dot) desenli ink-jet litografi, MUA tek tabakasının 3D elipsometrik görüntüsü	80
Şekil 3.3.6	MUA baskılanmış yüzeyde daha yüksek büyütme ile alınan 2D elipsometrik görüntü. Damlacıkların dağılımları net olarak görülebilmektedir	81
Şekil 3.4.1	Fotolitografi sisteminin şematik gösterimi	83

Şekil 3.4.2	a) Au film üzerinde oluşturulan desenlerin elipsometrik 2D görüntüsü, b) 25 μm x 25 μm (nokta çapı x noktalar arası boşluk) noktaların 2,5 cm x 2,5 cm film baskısında görünümü ve hazırlanan şablonun % 12800 büyütülmüş bir bölgesi	84
Şekil 3.4.3	20 μm çaplı noktacıklardan oluşan fotolitografi desenin elipsometrik görüntüsü. Polimer film kalın olduğundan, elipsometrik olarak kalınlık belirlenememiştir. Sağda görülen skala kalınlıkların nitel karşılaştırılması için verilmiştir	85
Şekil 3.4.4	Fotolitografi ile elde edilmiş yüzeyde hatların keskinliği, görüntü alanı yaklaşık 200 μm x 200 μm 'dir	86
Şekil 3.5.1	Nontacık (dot) desenli SPR yüzeylerinde elde edilen MUA immobilizasyon sinyalinin karşılaştırılması (1mM MUA)	87
Şekil 3.6.1	İmmobilizasyon süresinin, yüzey kalınlığı ve temas açısı değerlerine etkisi	91
Şekil 3.6.2	50 μm x 50 μm alanda elipsometrik 3 boyutlu görüntü a) Hidroksillenmiş silikon yüzeyi b) 2 saat sonra TPDA/Si (001) yüzeyi c) 24 saat sonra TPDA/Si (001) yüzeyi	93
Şekil 3.6.3	TPDA derişiminin, yüzey kalınlığı ve temas açısına etkisi	94
Şekil 3.6.4	50 μm x 50 μm alana sahip yüzeyin 3D elipsometrik görüntüsü a) THF'te TPDA-Si (001) b) asetonda TPDA-Si (001) ve c) benzende TPDA-Si (001)	96

Şekil 3.7.1	Daldırma süresi ile yüzeydeki GPTS kalınlığının ve temas açısının değişimi (GPTS derişimi hacimce % 1,0)	100
Şekil 3.7.2	GPTS derişiminin, yüzeyde oluşan GPTS tabakası kalınlığı ve temas açısı değerlerine etkisi (daldırma süresi 1 saat)	101
Şekil 3.7.3	EDA-GPTS tabaka kalınlığına EDA ile reaksiyon süresinin etkisi. EDA derişimi hacimce %2	103
Şekil 3.7.4	Çeşitli yüzeylerin iki boyutlu elipsometrik görüntüleri a) GPTS-Si (001), EDA bağlanmamış yüzey b) EDA/3h-GPTS-Si(001) ve c) EDA/24h-GPTS-Si(001)	104
Şekil 3.7.5	Üç farklı yüzeye ait AFM görüntüleri, a) GPTS-Si (001), EDA bağlanmamış yüzey b) EDA/3h-GPTS-Si(001) ve c) EDA/24h-GPTS-Si(001)	105
Şekil 3.7.6	Çoklu tabaka oluşumunun şematik gösterimi	106
Şekil 3.7.7	4 yüzeye ait floresan mikroskobu görüntüleri a) IgG-EDA/3h-GPTS-Si(001) b) IgG-EDA/24h-GPTS-Si(001) c) IgG-protein A-EDA/3h-GPTS-Si(001) d) IgG-protein A-EDA/24h-GPTS-Si(001) yüzeyleri	107
Şekil 3.8.1	MPTS tabaka kalınlığı ve yüzey temas açısı değerlerinin %1'lik (v/v) MPTS immobilizasyonu sırasında zamanla değişimi	111
Şekil 3.8.2	Yüzeylere ait 2 boyutlu elipsometrik görüntüler a) MPTS/Si(001) yüzeyi 10 dakika sonra b) MPTS/Si(001) yüzeyi 1 saat sonra c) MPTS/Si(001) yüzeyi 24 saat sonra	112

Şekil 3.8.3	Yüzeylere ait AFM görüntüleri a) MPTS/Si(001) yüzeyi 10 dakika sonra b) MPTS(1h)/Si(001) yüzeyi 1 saat sonra ve c) MPTS(24h)/Si(001) yüzeyi 24 saat sonra	113
Şekil 3.8.4	MPTS derişiminin, MPTS immobilizasyonu ile kalınlık ve yüzey temas açısı değerlerine etkisi (immobilizasyon süresi 1 saat)	114
Şekil 3.8.5	ODN-MPTS-Si(001) yüzeyinin şematik gösterimi	116
Şekil 3.8.6	ODN prob immobilizasyonunda, immobilizasyon süresi ile ODN tabakası kalınlığının değışimi (ODN derişimi 1 μM 'dir)	117
Şekil 3.8.7	ODN derişiminin DNA tabakası kalınlığına etkisi, immobilizasyon süresi 1 saat	118
Şekil 3.8.8	ODN hibridizasyonu ile zamana bağılı olarak delta (Δ) parametresindeki değışim	119
Şekil 3.9.1	BK7/APTS/modifiye AuNPs/BSA çoklu tabakası ile (A) BK7/MPTS/MUA/BSA çoklu tabakalarının şematik gösterimi	124
Şekil 3.9.2	İmmobilizasyon süresinin APTS tabakası kalınlığına ve temas açısı değerlerine etkisi	125
Şekil 3.9.3	Hidroksillenmiş cam yüzeyin AFM görüntüsü (A), farklı derişimlerde APTS uygulanması ile elde edilen yüzeylerin AFM görüntüsü; % 0,5 v/v APTS (B), %1,0 v/v APTS (C), %2,0 v/v APTS (D), %8,0 v/v APTS (E)	126
Şekil 3.9.4	APTS derişiminin, kalınlık ve temas açısı değışimi cinsinden etkisi (etkileşim süresi 2 saat)	128
Şekil 3.9.5	40 nm boyutlarında AuNPs'in (A) AFM görüntüsü, (B) UV-Vis spektrumu, (C) zeta- boyut ölçer sonuçları	129

Şekil 3.9.6	Modifiye AuNPs/APTS/BK7 yüzeyinin AuNPs ile fonksiyonelleştirildikten sonraki 2 boyutlu elipsometrik görüntüsü (A) 3 saat sonra (B) 24 saat sonra	130
Şekil 3.9.7	BK7/APTS/modAuNPs/BSA ve BK7/MPTS/MUA/BSA yüzeylerinin elipsometrik sensör tepkileri (Δ 'daki bağıl değişim olarak)	131
Şekil 3.9.8	MUA moleküllerinin yüzey doluluğunun sensör tepkisine etkisi	133
Şekil 3.9.9	Farklı moleküller hazırlanarak oluşturulan kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakaların ve AuNPs modifikasyonu yapılmış tek tabakaların bağıl sensör tepkileri	134
Şekil 3.10.1	(a) Prob immobilizasyonu, (b) Bloklama amaçlı MCH immobilizasyonu ve (c) Hedef ODN ile etkileşim	139
Şekil 3.10.2	Prob immobilizasyonu için süre optimizasyonu (1 μ M MCH prob, pH 3,8 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, akış hızı 5 μ L/dakika, 1 spot için örnek, diğer spotlarda elde edilen değerler için ortalama $\leq 0,3^\circ$ 'lik bir standart sapma mevcuttur)	141
Şekil 3.10.3	probODN (1 μ M/ 60 dakika) ve MCH (1 mM/ 30 dakika) immobilize edilmiş 200 μ m çaplı spotların 3D elipsometrik görüntüsü	143
Şekil 3.10.4	Hedef derişimine bağılı olarak sensör cevabının değişimi	146
Şekil 3.10.5	Sensör tepkisinin doğrusallığı	148
Şekil 3.11.1	İzoftalik asit modifikasyonunun şematik gösterimi	151
Şekil 3.11.2	IPA-DAS indirgemesine ait voltamogram	152

Şekil 3.11.3	İndirgeme döngüleri ile IPA tabakası kalınlığındaki değişim	153
Şekil 3.11.4	IPA-DAS indirgenmesi ile yüzey morfolojisindeki değişiklik (2 boyutlu elipsometrik görüntü) a) 1, b) 2, c) 3 ve d) 5 döngü için	154
Şekil 3.11.5	Farklı pH'larda asetat tamponu içerisindeki Cu^{2+} çözeltisi ile elde edilen SPRe-TIRE sonuçları	155
Şekil 3.11.6	Farklı derişimlerdeki Cu^{2+} iyonu için SPRe-TIRE uygulamasından alınan sensör tepkileri (pH 4,5 asetat tamponu, oda sıcaklığı)	156
Şekil 3.11.7	Cu^{2+} derişimine karşılık dengede ulaşılan sensör tepkisi sonuçlarından elde edilen kalibrasyon grafiğı	157

ÇİZELGELER DİZİNİ

		<u>Sayfa</u>
Çizelge 2.1	Biyosensörlerde kullanılan transdüserler	4
Çizelge 2.2	SPR algılama geometrileri için farklı kaynak-analiz- algılayıcı yapılandırmaları	16
Çizelge 2.3	Farklı malzemeler için nüfuz derinliği (Tompkins, 1993)	22
Çizelge 2.4	İnorganik substratlar üzerine kendiliğinden düzenlenme ile oluşan tekli ve çoklu tabakalar.	45
Çizelge 3.2.1	Farklı yöntemlerle temizleme ile tabaka kalınlığındaki değişim	73
Çizelge 3.6.1	Farklı çözücülerde hazırlanmış TPDA ile elde edilen yüzeylere ait kalınlık ve temas açısı değerleri	95
Çizelge 3.8.1	MPTS tabakasının farklı çözücü tiplerinde Si(001) yüzeyinde elde edilen kalınlığı	115
Çizelge 3.9.1	BSA'nın BK7/APTS/modAuNPs ve BK7/MPTS/MUA yüzeylerindeki kalınlıkları ve yüzey doluluk değerleri	132
Çizelge 3.10.1	Çalışmada kullanılan ssODN hedef, prob ve eşlenik olmayan kontrol hedefi dizilimleri	138
Çizelge 3.10.2	Farklı sürelerde prob immobilizasyonu ile elde edilen sensör cevabı	142
Çizelge 3.10.3	prob ODN derişiminin yüzeydeki formasyona etkisi	143
Çizelge 3.10.4	MCH immobilizasyonunda kullanılan MCH/etanol çözelti derişiminin yüzey formasyonuna etkisi	144
Çizelge 3.10.5	Dengede alınan sensör cevapları	147

1. GİRİŞ

Sensör teknolojilerinde yaşanan gelişme, özellikle sağlık, çevre, gıda gibi yaşam bilimlerinde ortaya çıkan bir gerekliliğin sonucu olmuştur. Mikroorganizmaların dahil olduğu sorunların çözülmesinde, sorunun kaynağının hızlı bir şekilde belirlenmesi, örneğin, hastalık teşhisi konusunda büyük önem arz etmektedir. Hastalığa neden olan organizmanın belirlenmesi, hastalığın kontrolündeki en temel basamaktır. Günümüzde bu amaçla, kültür alma, sayım teknikleri, biyokimyasal testler, mikroskopi ve akışlı sitometri gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Ayrıca, immünolojik teknikler (immüno analizler, immünomanyetik ayırmalar vb.), hibridizasyon ve PCR esaslı nükleik asit probu kullanılan teknikler, kütle spektrometrisi, DNA mikroarray çalışmaları veya hazır kitle ve taşınabilir sistemler gibi, halen geliştirilen yeni yöntemler de mevcuttur. Ancak bu yöntemlerin çoğu zaman alıcı (kültür alma ve çoğaltma), pahalı (kütle spektrometrisi, DNA mikroarray'leri) veya bilinmesi gereken hücre sayısı yerine toplam bakteri miktarını veren (enzim bağlı immünosorbent analizleri) yöntemlerdir. Geçtiğimiz yıllarda, biyosensörlerin spesifik hedefin miktarına bağlı olarak sürekli veri elde edilmesi, hedef seçiciliğinin yüksek olması, düşük tepki süreleri, seri üretime uygunluk, numune hazırlama basamağının ortadan kaldırılması veya kolaylaştırılması ve örneğe en az zarar verilerek analizin yapılması gibi avantajlara sahip biyosensörlerin geliştirilmesi ve bunların duyarlı ve güvenilir tayin yöntemi olması için bir çok çalışma yapılmıştır.

Sensörler seçici kimyasal tanınmanın yapıldığı ve bağlanmanın ya da tanınmanın gerçekleştiği duyarlı bölge ve bir fizikokimyasal çevirici (transdüser) olmak üzere iki temel kısımdan oluşur. Gerçekleşen kimyasal tepkime, renk değişimi, floresans, ısı oluşumu, iletkenlik değişimi gibi bir dizi sinyal oluşturur. Çevirici ise bu sinyali alarak sinyali oluşturan etkenle orantılı olarak bir cevap gösterir. Adından da anlaşılacağı gibi, bir biyosensör, sinyal çeviriciye yakın bir biyolojik algılama elemanına (enzim, antibadi, mikroorganizma, DNA vb. gibi) sahiptir.

Biyosensör teknolojisindeki en önemli iki gelişme, optik kavramlarındaki gelişmeye bağlı olarak (örneğin sönümlü dalga “evanescent waves” kavramının geliştirilip

bunun plazmon rezonans ve floresans teknikleri ile birleştirilmesi) SPR ve elipsometri gibi optik tekniklerin hızla uygulanabilir olması ve pizeoelektrik olgusunun geliştirilmesi ile kuvars kristali mikrobals (QCM) ve yüzey akustik dalga sensörü (SAW) gibi kütle duyarlı sistemlerin oluşmasıdır. Bu sistemler içerisinde çevresel etkilere en az duyarlı olan çeviriciler, optik esaslı çeviricilerdir.

Bu nedenle, sunulan çalışmada, yüzey plazmon rezonansı (SPR) ve elipsometri esaslı sensörlerin geliştirilmesi, bu düşünce ile sensör duyarlılığı, immobilizasyon tekniklerindeki esneklik, spesifiklik ve birden fazla hedefin aynı yonga üzerinde analizi gibi “esas amaçlara” ulaşılması hedeflenmiştir.

Sunulan çalışma kapsamında, teorik bilgiler, yapılan araştırmalar ve sonuçları üç ana başlık altında toplanmaya çalışılmıştır. Bu ana başlıklar; “Genel Bilgiler”, “Deneyisel Çalışma ve Sonuçlar” ve “Yorum” olarak belirlenmiştir.

Genel bilgiler kısmında, tezin ana konusunu özetleyen ve tez çalışmaları sırasında kullanılan temel ve gerekli bilgiler verilmiştir.

Deneyisel çalışma ve sonuçlar başlığı altında ise, tez kapsamında gerçekleştirilen teorik ve deneyisel çalışmalar 11 alt başlık altında toplanmıştır. Her bir alt başlık, yapılan çalışmaya ait kısa özel bilgiler, deneyisel ya da teorik çalışma yöntemi ve sonuçları içermektedir. Alt başlıklarda, her bir çalışmaya ait sonuçlar ayrı ayrı tartışılmıştır.

Tezin son kısmında ise, tez çalışması kapsamında elde edilen tüm veriler toparlanmaya çalışılmış ve elde edilen çıktılar tartışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Biyosensörler

Bir biyosensör “biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş algılama elemanının (enzim, antibadi, mikroorganizma veya DNA) bir fizikokimyasal çeviriciye (transdüser) bağlı kompakt bir analitik cihaz” olarak tanımlanabilir (Turner *et al.*, 1987). Kimyasal bir tür ile etkileşim dolayısıyla algılayıcı tabakanın fizikokimyasal özellikleri (kütle, optik özellikler, direnç vb.) değişir ve bu değişimler bir çevirici tarafından algılanır. Elde edilen değişimler elektrik sinyaline dönüştürülür ve işlenir. Çevirici, optik (örneğin optik fiber), elektrokimyasal (örneğin iyon seçici elektrotlar), ısı değişimi ölçerler (örneğin kalorimetrik sensörler) veya piezoelektrik (örneğin akustik dalgalar) olabilir. Çizelge 2.1’de farklı çeviricilere örnekler verilmiştir. Tipik bir biyosensörün temel parçaları Şekil 2.1’de gösterilmiştir. Bir biyosensörün amacı ayrı veya sürekli olarak bir analitin veya bir analit grubunun etkileşimi ile orantılı sinyaller üretmektir (Turner *et al.*, 1987):

Biyosensör teknolojisinin hassas bir algılama yöntemi olarak kullanılmasının birçok avantajı vardır:

- İncelenen analit ile benzer moleküllerin arasındaki farkı, biyomoleküllerin spesifik tanıma yeteneği kullanılarak ayırılabilmesi,
- Tepki sürelerinin, genellikle sonuçlar gerçek zamanlı olacak şekilde yüksek olması,
- Çevirici ile seçici tayin yaparak bölgenin bir platformda birleştirilebilmesi kolaylığı. Bu durum, ilave kimyasal kullanmadan analiz yapma ve spot üzerinde analizi mümkün kılar.
- Analite en az zarar verilerek sürekli veri alınabilmesi. Biyolojik element farklı analizler için yeniden kullanılabilmesi ki bu diğer immunoanaliz yöntemlerine göre büyük avantaj sağlar.

Çizelge 2.1- Biyosensörlerde kullanılan transdüserler

Kategori	Prensip	Örnekler
Elektrokimyasal	a) Potansiyometrik: sabit bir akımda sistemin potansiyelindeki değişime dayanır	İyon seçici elektrotlar, iyon seçici alan etkili transistörler, LAPS
	b) Amperometrik: elektroaktif türlerin derişimine bağılı olarak akımdaki değişimleri inceler	Katı elektrolit gaz sensörleri, elektronik burunlar
Optik	Kütle veya derişime bağılı olarak ışık şiddetindeki veya polarizasyonundaki değişimleri ölçmek, ayrıca floresan veya renk verici moleküller de etiket olarak kullanılabilir	Optik fiberler, yüzey plazmon rezonansı, absorbands ve limünesans
Piezoelektrik	Kütle, yoğunluk, viskozite ve akustik eşleşme durumlarına hassas	QCM, Yüzey akustik dalga sensörleri
Isıl	Sıcaklıktaki farkları belirler	Kalorimetrik sensörler

2.1.1. Biyosensör tipleri

2.1.1.1. Elektrokimyasal sensörler

Potansiyometrik biyosensörler genellikle iyon seçici elektrotları esas alır. Bu cihazlar bir reaksiyon sırasında iyon derişimindeki değişimleri ölçer. Genellikle basit bir sensör sistemi, bir elektrodu çevreleyen enzim immobilize edilmiş membrandan oluşur ve prob bir pH ölçere bağılıdır. Membran yüzeyinde gerçekleşen reaksiyon hidrojen iyonları oluşturur veya soğurur. Bu durumda pH'ta kolayca okunabilecek değişimlere neden olur. Biyosensörlerde sıklıkla üç tip iyon seçici prob kullanılır: normal cam pH elektrotları, seçici gaz geçirgen membranla kaplanmış cam pH elektrotlar ve özel iyon iletken membrana sahip katı hal elektrotları. Yük ile orantılı olarak akım geçmesini sağlayan ve yüzeydeki yükü ölçmeye yarayan metal oksit yarı iletkenlerin de kullanılması mümkündür. Bu tür yarı iletken cihazların küçük olması, difüzyon sınırlamalarının ortadan kalkması

nedeniyle daha hızlı tepki sürelerine sahiptir. Ancak bu tür biyosensörlerin duyarlıkları, iyonik şiddet ve analize tabi tutulacak çözeltinin derişiminden çok etkilenmektedir.

Potansiyometrik sensörler bakteriyel analizler için kullanılmaktadır. DNA hibridizasyonunun incelenmesi de, akımın kontrol edilen gerilim altında incelenmesi ile belirlenir. Örneğin hibridizasyon, indirgeyici indikatörün artan akımı veya iletkenlik veya kapasitanstaki değişim ile belirlenebilir.

Işık adreslenebilir potansiyometrik sensörler (Light-adressable potantiometric sensors, LAPS) yarı iletken elektrolitik yalıtıcıya (electrolytic insulator semiconductor, EIS) ya sahip yarı iletken sistemleridir. EIS bölgesinden bir akım uygulandığında, yalıtım-yarı iletken ara yüzünde bir elektron boşluğu tabakası oluşturulur. Bu tabakanın kapasitansı elektrolitteki iyon derişimine bağlı olan yüzey gerilimi ile değişir. Kapasitansın belirlenmesi için yarı iletken ışık ile uyarılır ve oluşan akım ölçülür. Diğer sensörlerle karşılaştırıldığında LAPS bir kaç avantaja sahiptir: düzlemseldir, pH ve derişim ölçümü yapabilir ve kablolamaya ihtiyaç duyulmaz. Genellikle amperometrik biyosensör, iki elektrot arasında enzimatik yolla akım üretilmesi prensibine göre çalışır. Duyarlıkları potansiyometrik sensörlerinkine yakındır ve hızlı tepki verirler. Birçok amperometrik biyosensörde sorun çözünmüş oksijendir ve bunun üstesinden gelmek için ferrosen gibi ara elemanların kullanılması gerekir.

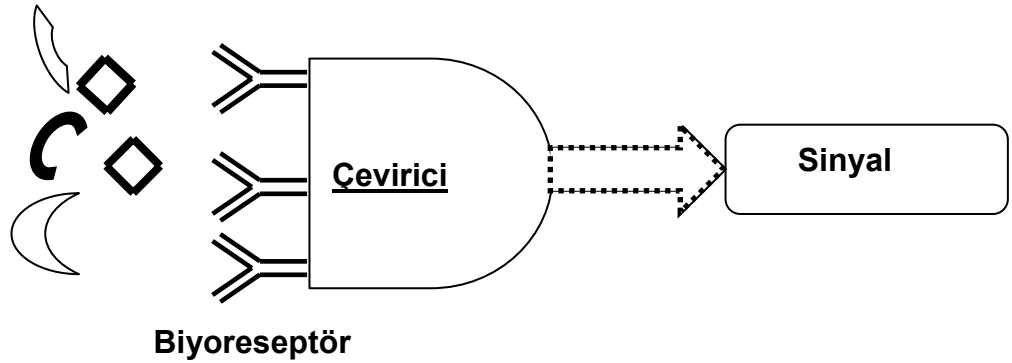
2.1.1.2 Optik sensörler

Optik biyosensörler genellikle optik fiberler veya yüzey plazmon rezonans (SPR) temelindedir. Ayrıca lüminesans, floresans ve absorbans temelli biyosensörler de kullanılmaktadır. Optik fiberler uzun, standart ve saf camdan imal edilmiş ve ışığı uzak mesafelere aktarabilir. Kullanım avantajları, ucuz olmaları, ince olması, diğer sinyallerle etkileşimin zayıf olması, güç kullanımının düşük olması, hafiflik ve esnekliktir. İlgilenilen etkileşim için yüksek spesifikliğe sahip olması ve hızlı sinyal vermesi açısından biyosensörlerde kullanımı idealdir. Çoğu fiber optik sistemler belirli patojenlerin tanısında antibadi kullanır. Farklı fiber optik uçlara farklı

antibadiler takılarak farklı bakteri türlerinin aynı anda tayin edilmesi de mümkündür.

Yüzey plazmon rezonans (SPR) tekniği yeni optik biyosensörlerin geliştirilmesinde etken olmuştur. SPR sinyalindeki değişim doğrudan metal film yüzeyine immobilize olan kütle ile orantılıdır. SPR gerçek zamanlı olarak ara yüzeydeki etkileşim sonucu kırınım indisindeki değişimi ölçer. SPR fiber optik prob lar, SPR düzlemsel prob sensörler, çok kanallı algılama cihazları ve SPR'nin anodik sıyırma voltametrisi ve kritik açı refraktometresi gibi diğer yöntemlerle kombinasyonları gibi SPR'nin farklı konfigürasyonları mevcuttur.

Hedef moleküller (analit)



Şekil 2.1- Tipik bir biyosensörü oluşturan bileşenler

2.1.1.3 Piezoelektrik bazlı akustik dalga cihazları

Akustik dalga cihazları 60 yıldan uzun bir süredir telekomünikasyon firmaları tarafından kullanılmaktadır. Özellikle mobil telefonlar için telekomünikasyon sektörü en önemli alıcı konumundadır. Bu cihazlar kütle, yoğunluk, viskozite değişimleri ve akustik eşleşme (copuling) durumlarına oldukça hassastır. Akustik dalga yüzey boyunca veya üzerinde ilerlerken hızı ve/veya genliği değişir. Hızdaki değişimler frekans ölçüm cihazı ile ölçülür ve fiziksel parametreyle ilişkilendirilir. Piezoelektrik akustik dalga sensörlerinde titreşen bir elektrik alan uygulanarak substrat içinde hareket edecek bir mekanik dalga oluşturulur ve ardından bu dalga yeniden elektrik alana dönüştürülerek ölçüm yapılır. Kuvars, kütle-frekans çeviricisi

olduğundan bu amaçla kullanmaya uygundur. Bunun bir örneği olan sensör, kalınlık-kesme gerilimi modunda çalışır ve genelde kuvars kristal mikrobals (Quartz crystal microbalance, QCM) veya yığın akustik dalga (Bulk acoustic wave, BAW) sensörü olarak adlandırılır. Lityum, tantalit, lityum niyobat, silisyum karbür ve galyum arsenit gibi başka piezoelektrik substratlar da vardır (Deisingh, 2003).

2.2. Yüzey Plazmon Rezonansı (Surface Plasmon Resonance, SPR)

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), ışık ile maddenin etkileşimi ile ortaya çıkan ilginç bir optik özelliktir (Sambles *et al.*, 1991). Günümüzde bu olguya dayanan yöntemler, yüzeylerin ve yüzeyler arası etkileşimlerin tahribatsız bir şekilde incelenmesi için oldukça duyarlı optik izleme yöntemleri olarak kullanılmaktadır. SPR olgusu, metal dielektrik ara yüzünde beklenmedik bir şekilde güçlü ve oldukça lokalize, sönümlü (evanescent) elektromanyetik alanların oluşması ile ortaya çıkar. Bu tür alan kaynakları, ara yüzeydeki malzemelerin dielektrik özelliklerindeki küçük değişimlere oldukça yüksek duyarlık gösterir. Bu alanların lokalize bir yapıda olması ise malzemedeki küçük, tipik olarak optik dalga boyunun 1/1000'i ölçülerindeki bölgelerde değişikliklerin belirlenmesine ve ölçülmesine olanak sağlar (Barnes ve Sambles, 1987). SPR esaslı yöntemler ile yapılan analizlerin hassas ve bölgesel olabilmesi, son yirmi yıl içerisinde bu yöntemle olan ilgiyi artırmıştır. Çoğu fiziksel (Margheri *et al.*, 1991), kimyasal (Jory *et al.*, 1995) ve biyomoleküler (Ulrich *et al.*, 1996) etkileşimde, etkileşimin kinetiği ve ara yüzeyde oluşan yapısal değişiklikleri gerçek-zamanlı olarak incelemeye uygun bir yöntemdir. Farklı yapılandırma kullanılarak fizik, kimya ve biyoloji alanlarında metal yüzeylerine biriktirilmiş ultra ince filmlerin analizi için kullanılabilir (Phelps ve Taylor, 1996). Tipik uygulamalar arasında Langmuir-Blodgett filmleri (Agbor *et al.*, 1997), kendiliğinden düzenlenen organik tek tabakalar (Bain *et al.*, 1989) ve biyopolimerler (Linda *et al.*, 1999) sayılabilir.

SPR sensör teknolojisindeki gelişmeler, yeni uygulamaların ve SPR'nin algılama kabiliyetinin artırılması, gerek laboratuvar ortamında gerekse sahada, daha duyarlı, hızlı ve maliyeti düşük analizlerin yapılmasını sağlayacaktır.

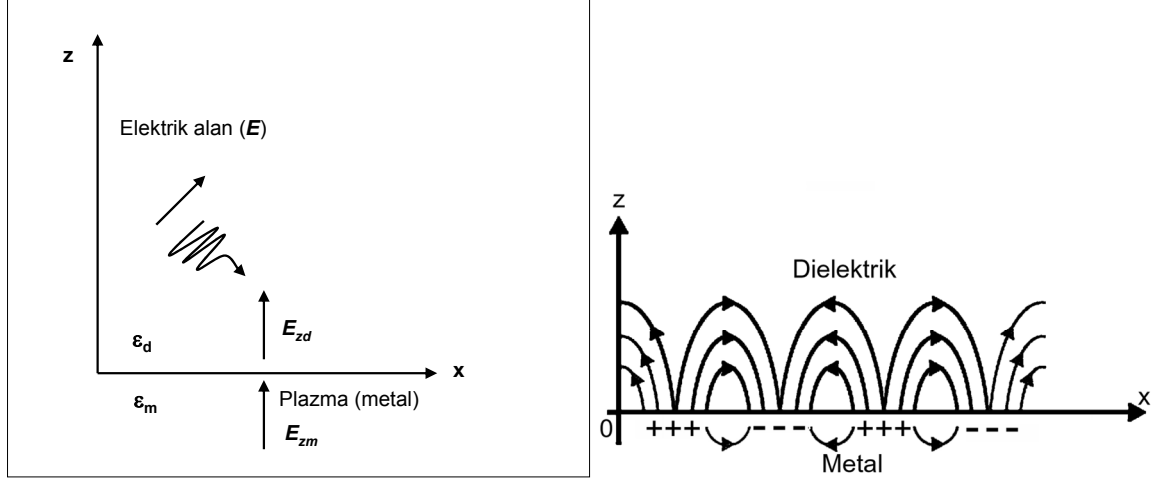
2.2.1. Yüzey plazmon dalgaları

“Plazmon” terimi yük yoğunluğu dalgalanmalarının kuantumunu belirtir. Bu kavramın, Maxwell’in elektromanyetik dalga kuramındaki plazma formülünden türetildiği düşünülmektedir. Bu teori, metalin sözde (pseudo) serbest elektronlarını yüksek yoğunlukta gaz veya sıvı (plazma) olarak ele alır (Raether, 1977). Bu tür elektronlar topluca uyarılmaya maruz bırakıldıklarında, genelde plazma salınımları olarak adlandırılan, uzunlamasına ilerleyen dalgalar oluşturan yük yoğunluğu dalga salınımlarına neden olur (Richard, 1958). Bu uzunlamasına ilerleyen dalgaların, oluşması sağlanır ve yüzey boyunca bir sıvı gibi ilerlemesi gerçekleşirse, yüzey plazmon dalgaları (SP dalgaları) olarak adlandırılır (Ritchie, 1973).

2.2.2. SP dalgalarının dağılma karakteristikleri

Yüzey plazmon dalgalarının fiziği ve yayılma karakteristikleri birçok araştırmacı tarafından geniş kapsamlı olarak çalışılmıştır (Boardman, 1982). Bu dalgaların dağılma karakteristikleri SPR temelli deneysel araştırmalar için çok önemlidir. Yarı sonsuz ve bir dış elektrik alan ile dengede olan bir metal-dielektrik ara yüzeyi düşünülürse (Şekil 2.2), bu iki ortamın dielektrik sabitleri ϵ_m ve ϵ_d olarak alınabilir. Dış alan, ara yüzeye dik olan bileşeni sıfırdan farklı ise yüzey yüklerini uyarır. E_{zm} ve E_{zd} sırasıyla sınırın metal ve dielektrik bölgesinde uygulanan elektrik alanının dik bileşeni ise, etkileştirilen (indüklenen) yükün büyüklüğü aşağıdaki eşitlikle verilebilir:

$$\sigma = E_{zm} - E_{zd} \quad (2.1)$$



Şekil 2.2 - (a) Yüzey yükü tarafından metal (ϵ_m)-dielektrik (ϵ_d) ara yüzünde oluşturulan elektrik alanı. E , gelen polarize ışığın elektrik alanı, E_{zd} ve E_{zm} ise sırasıyla dielektrik ve metaldeki ara yüzeye dik olan elektrik alan bileşekleridir. (b) Yüzey yükleri ile ilişkili elektrik alanının (E) ile gösterilen, ara yüzeydeki yük yoğunluğu değişimleri.

İndüklenmiş alan ω açısal frekansı ile salınırsa ve ara yüzey boyunca K_x dalga vektörü ile ilerlerse, indüklenmiş yük yoğunluğu $\sigma(x,t)$ içerisindeki karşılık gelen salınımlar, ara yüzey boyunca Şekil 2.2 (b)'de gösterildiği gibi yüzey plazmon dalgası şeklinde ilerler. Bu ilerleme aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir:

$$\sigma(x,t) = \sigma \exp i(K_x x - \omega t) \quad (2.2)$$

İndüklenmiş yük yoğunluğu salınımları, ara yüzeyi çevreleyen uzayda yayılan, kendilerine ait ikincil elektromanyetik alanları yaratırlar. Bu alanların metal (E_{zm}) ve dielektrik (E_{zd}) bölgelerindeki dik bileşenleri aşağıdaki eşitlikle verilir:

$$E_{zm} = \text{const.} \exp i(K_x x - \omega t) \exp i(K_{zm} z) \quad (2.3a)$$

$$E_{zd} = \text{const.} \exp i(K_x x - \omega t) \exp i(K_{zd} z) \quad (2.3b)$$

Burada K_{zm} ve K_{zd} sırasıyla metal ve dielektrikteki sınıra dik dalga vektörleridir ve aşağıdaki eşitliklerle birbirleri arasında bir ilişki vardır:

$$K_{zm} = [\epsilon_m (\omega / c)^2 - K_x^2]^{1/2} \quad (2.4)$$

$$K_{zd} = [\varepsilon_d(\omega/c)^2 - K_x^2]^{1/2} \quad (2.5)$$

$$\varepsilon_d K_{zm} + \varepsilon_m K_{zd} = 0 \quad (2.6)$$

Burada ε_d ve ε_m sırasıyla dielektrik ve metaldeki dielektrik sabitleri, c ışık hızı ve ω açısal frekanstır. Eşitlik 2.4, Eşitlik 2.5 ve Eşitlik 2.6 birleştirildiğinde dağılım ilişkisi elde edilir:

$$K_x = (\omega/c)(\varepsilon_d \varepsilon_m / (\varepsilon_d + \varepsilon_m))^{1/2} \quad (2.7)$$

Genel olarak $\varepsilon_m(\omega)$ kompleks bir sayıdır ve Eşitlik 2.7'de K_x hem gerçekte hem de imajiner bölümden oluşur:

$$K_x = K_r + iK_i \quad (2.8)$$

Burada K_r ve K_i sırasıyla vektörün gerçekte ve imajiner bölümüdür. İki ortamın dielektrik fonksiyonu $\varepsilon_d = \varepsilon_d' + i\varepsilon_d''$ ve $\varepsilon_m = \varepsilon_m' + i\varepsilon_m''$ olarak verilirse K_{sp} için gerçekte ve imajiner kısımlar aşağıdaki gibi yazılabilir:

$$\text{Re}(K_{sp}) = K_r = (\omega/c)(\varepsilon_d' \varepsilon_m' / (\varepsilon_d' + \varepsilon_m'))^{1/2} \quad (2.9)$$

$$\text{Im}(K_{sp}) = K_i = (\omega/c)(\varepsilon_m'' / (2\varepsilon_m'^2))(\varepsilon_d' \varepsilon_m' / (\varepsilon_d' + \varepsilon_m'))^{3/2} \quad (2.10)$$

$K_{r,s}$ yüzey plazmon dalgasının düzlemsel ilerlemesini gösterirken (Eşitlik 2.2), imajiner kısım $K_{i,s}$ ısı harcanma nedeniyle enerji kaybına bağlı olarak dalga ilerlemesinde uzaklığa bağlı azalmayı gösterir. SPR olayının deneysel çalışmalarda kullanılması, büyük oranda, Eşitlik 2.9'da görülen ε_d 'nin reel veya imajiner kısımlarındaki küçük değişimlerin $(\omega/c)(\varepsilon_d' \varepsilon_m' / (\varepsilon_d' + \varepsilon_m'))^{1/2}$ katsayısıyla büyütülerek K_r 'deki değişimin elde edilmesidir. Eşitlik 2.3'te K_z (K_{zm} ve K_{zd} 'ye eşit) ve K_x reelse, ilerleyen ikincil elektromanyetik alan aktarım enerjisi ara yüzey sınırından radyasyonla uzaklaşır. Bundan kaynaklanan yük yoğunlukları radyatif (radyasyonla yayılan) yüzey plazmon dalgaları olarak isimlendirilir. Bu tür dalgalar $v_{ph} = (\omega/K_x) > c$ hızıyla yayılır. Eğer K_z imajiner olursa ve K_x reel ise, Eşitlik 2.3'te belirtilen elektromanyetik alanlar, ara yüzeyin her iki tarafında da sönümlü (evanescent) hale gelir ve ara yüzey boyunca ilerlemeleri "yüzey sınırlı" olur. Bu

tür dalgalar radyatif olmayan yüzey plazmon rezonansı dalgası olarak adlandırılır. Bu dalgalar, ara yüzeyde $v_{ph} < c$ hızıyla yol alırlar. Tüm SPR uygulamalarında radyatif olmayan yüzey plazmon dalgaları kullanılır. Radyatif olmayan dalgaları radyatif olanlardan ayırmak için K_x yerine K_{sp} ifadesi kullanılmaktadır. K_{zm} ve K_{zd} dalga vektörleri, ara yüzey için seçilen malzeme seçimine bağlı olarak imajiner olabilir. Eşitlik 2.4 ve eşitlik 2.5'te görüldüğü gibi K_x dalga vektörü aynı anda $K_x > (\varepsilon_m^{1/2})(\omega/c)$ durumlarını karşıladığında, her iki ortamda imajiner duruma gelir. Eşitlik 2.7'de $K_x > (\varepsilon_m^{1/2})(\omega/c)$ durumunun $(\varepsilon_m/(\varepsilon_d + \varepsilon_m))^{1/2} > 1$ olması gerektiği ortaya çıkmaktadır. Bu durum yalnızca ε_d ve ε_m zıt işaretlere sahipse gerçekleşir. Yüzey yük yoğunluklarının yalnızca metal-dielektrik ara yüzeyinde, metal bir p-polarize elektrik alana maruz bırakıldığında uyarılabileceği durumu buradan ortaya çıkmaktadır.

2.2.3. Radyatif olmayan yüzey plazmon dalgalarının uyarılması ve tayini

Yüzey plazmon dalgaları, ilişik elektrik alanların faz hızı plazma dalgasının hızına eşit olacak şekilde dış yüzeyden ara yüzeye gelen elektronlar veya ışınlar ile uyarılır. Eşdeğer olarak, elektronlar veya ışınlar tarafından aktarılan momentum ($\hbar K_x$) ve enerji ($\hbar\omega$), SP dalgalarının yayılım (saçılım) ilişkisindeki $\omega(K_x)$ ilişkisine denk geldiğinde, plazma dalgaları uyarılır. Genelde plazmonların sönümündeki azalma, plazma salınımlarının yükseltilmesini artırır.

Yüzey plazmon dalgalarının yayılma sabiti (K_{sp}), ara yüzeyin hemen yakınındaki dielektrik içerisinde yayılan optik dalga'nın maksimum yayılma sabitinden $((\varepsilon_d^{1/2})(\omega/c))$ daha yüksektir. Momentumun korunumu, metal dielektrik ara yüzüne gelen optik dalga ile SP dalgalarının uyarılması konusunda uygulanamaz. Bu nedenle fotonların enerjisinin ara yüzeyde eşleşmesi (coupling) için, gelen optik dalga momentumunun SP dalgasınıninkine uyacak şekilde artırılması gerekir.

Bu eşleme işlemini başarmak için dolaylı momentum artırma yöntemleri kullanılır. Prizma eşleyiciler kullanılarak zayıflatılmış içten tam yansıma (ATR) yöntemi, optik

dalga yönlendiriciler ve saçılım desenli yüzeyde saçılım yöntemi, mevcut yöntemlerden üç tanesidir.

Bir ara yüzeyde tam yansımaya uğrayan ışık, ikinci ortamda, ara yüzün düzlemine paralel olarak ilerleyebilen bir sönümlü elektromanyetik alan yaratır. Bu elektromanyetik alanın diğer ortamdaki ilerlemesi çok düşüktür. Bu tür bir alan, gelen ışık ile aynı frekansta salınır ve ara yüz düzlemine dik olan düzlemde şiddeti üssel olarak azalır. Geliş açısı θ_i , kritik açının üzerinde (θ_c) olduğunda, gelen ışık ikinci ortam tarafından tutulan ara yüz düzlemi boyunca daha yüksek momentuma sahip olur. Ara yüze paralel olarak gelen ışığa ait dalga boyu vektörü K_{ph} aşağıdaki gibi verilir:

$$K_{ph} = (\varepsilon_g / \varepsilon_d)^{1/2} (\omega / c) \sin(\theta_i) \quad (2.11)$$

$\theta_i > \theta_c$ için $K_{ph}, (\varepsilon_g / \varepsilon_d)^{1/2} (\omega / c) \geq K_{ph} > (\varepsilon_g / \varepsilon_d)^{1/2} (\omega / c) \sin(\theta_c)$ aralığında değiştirilebilir.

Metal dielektrik ara yüzü ($\varepsilon_m / \varepsilon_d$) tam yansımanın olduğu ara yüze oldukça yaklaştırılabilirse, ikinci ortamda ilerleyen sönümlü dalganın hızı $v_{ph} = (\omega / K_{ph})$ elektrik ve manyetik alanların ara yüzde sürekli olma durumu olan sınır koşullarını karşılayan, aktif ara yüzeydeki metal içerisinde benzer alanları tetikleyecektir. Bu tür bir sönümlü dalganın varlığı, aktif ara yüzün her iki yanında dengedeki yüzey yük yoğunluk salınımlarını ω açısal frekansı ile uyarır. K_{ph} , bu frekansta salınım yapan, yüzey yük dalga vektörü K_{sp} , K_{ph} ile uyuşacak şekilde ayarlandığında, yüzey sınırındaki elektrik alanı, gelen ışığın enerjisinin harcanması ile güçlenecektir. Bu uyarma işlemi ile birlikte K_{ph} 'ın K_{sp} ile eşitlenmesi işlemi “Yüzey plazmon rezonansı” (Surface plasmon resonance, SPR) olarak adlandırılır.

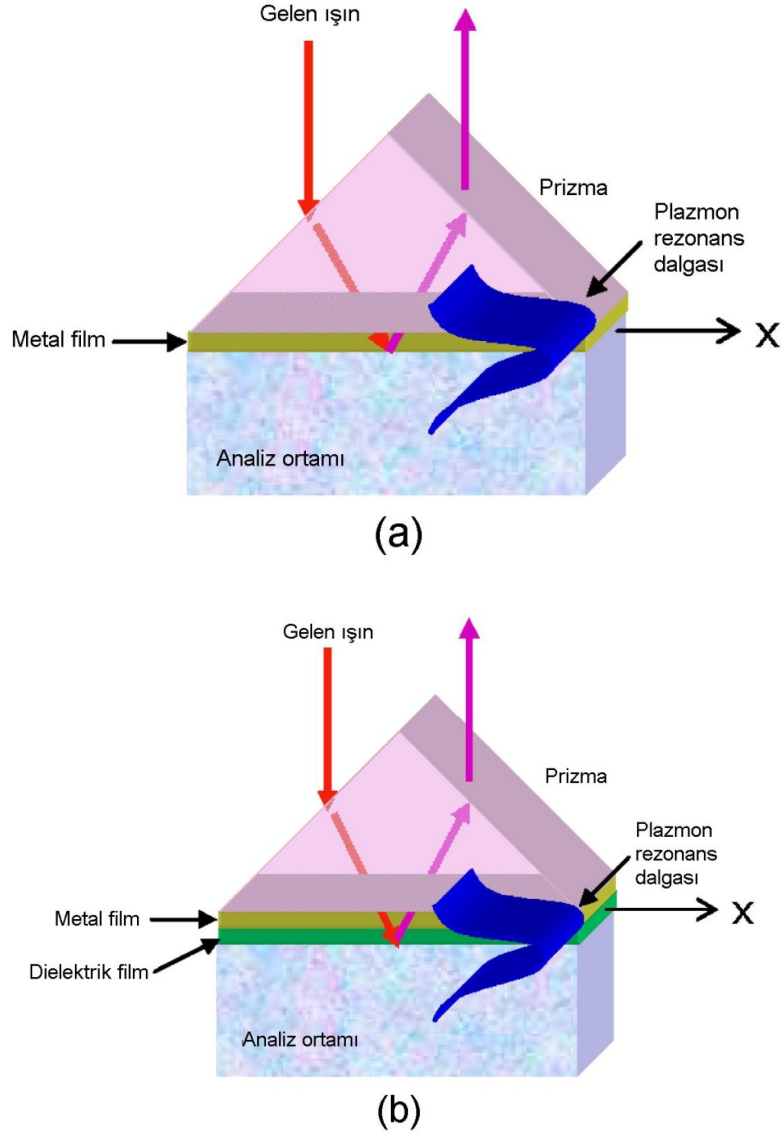
İçten tam yansıma yoluyla birincil sönümlü elektromanyetik alanların oluşturulması için prizmalar, fiberler ve düzlemsel dalga yönlendiriciler gibi optik cihazlar kullanılır. Metal/dielektrik ara yüzünün ($\varepsilon_m / \varepsilon_d$) içten tam yansıma olan yüzeye oldukça yakın olması gerekliliği, aktif ara yüzeyde hem metal hem de dielektrik ortamın ince olması zorunluluğunu ortaya çıkarır. Metal/dielektrik ara yüzünde

yüzey plazmon dalgalarının ışık yoluyla uyarılması için popüler olan iki uyarma yöntemi mevcuttur. Sonlu metal kalınlığının kullanıldığı düzenek Kretschmann konfigürasyonu olarak adlandırılırken (Ritchie, 1957), sonlu dielektrik kalınlığının kullanıldığı yapılandırma Otto konfigürasyonu olarak adlandırılır (Otto, 1968; Kretschmann ve Raether, 1968; Şekil 2.3 ve Şekil 2.4). Kanallı eşleyicilerde, gelen ışık saçılarak yüzeyden uzaklaşan farklı yönlere giden ışın demetleri oluşturur ve bu ışınların her birinin farklı K-vektörüne sahip ışınlar SP rezonansını sağlar.

Dalga yönlendirici yüzey kullanılarak, Kretschmann konfigürasyonunda olduğu gibi, metal yüzeyindeki SPR uyarılabilir. Düzlemsel (dikdörtgen) veya dairesel (optik fiberler) dalga yönlendiriciler SPR uygulamalarında kullanılır.

Reflektometri, elipsometri ve floresans emisyonu, SPR uyarımının belirlenmesi ve karakterizasyonu için kullanılan en popüler tekniklerdir. Reflektometri tekniği, ATR koşullarındaki yansıyan ışığın şiddetinin ölçülmesine dayanır. Elipsometrik teknikte ise, yansıyan ışık polarizasyonundaki değişim (Δ ve ψ elipsometrik açıları ile belirtilen) SPR uyarımının belirlenmesi ve miktarının ölçülmesi için kullanılır.

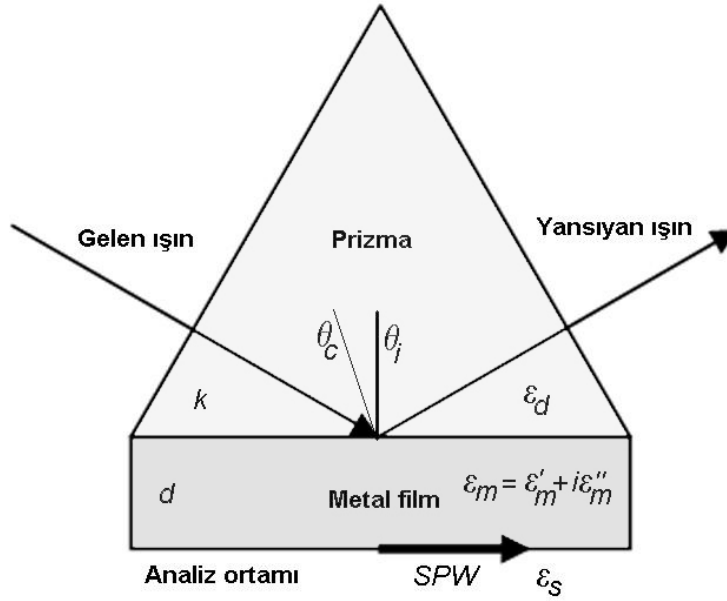
Floresans yöntemi, SPR uyarımının belirlenmesi için emisyon tekniğinin kullanılması temeline dayanır ve SP modları tarafından oluşturulan yüzeye bağlı güçlenmiş elektrik alanının avantajını kullanır. Etiketlenmiş moleküller aktif yüzeye immobilize olduklarında elde edilecek floresans, yerel elektrik alan ile orantılı olur. Yayılan ışığın şiddeti SPR uyarısının miktarını gösterir. Bu yöntemler arasında, uygulama kolaylığı olması açısından yansıma tekniği (ATR) en uygun olanıdır.



Şekil 2.3 – Kretschmann (a) ve Otto (b) konfigürasyonları

2.2.4 SPR eğrilerinin karakterizasyonu

SPR'nin optik olarak uyarılması sonucu karakterizasyonu genelde “yansımalar eğrileri” (Sambles *et al.*, 1991) kullanılarak yapılır. Bu tür bir yansımalar eğrisi SPR spektrumunu oluşturur. Eşitlik 2.11’de görüldüğü gibi K_{ph} hem gelen ışığın dalga boyunun hem de açısının bir fonksiyonudur. Monokromatik bir ışığın geliş açısına göre SPR spektrumu çizildiğinde “açı taramalı SPR spektrumu” elde edilir. Benzer şekilde, sabit bir geliş açısında dalga boyunun fonksiyonu olarak çizilen SPR spektrumu ise “dalga boyu taramalı SPR spektrumu” olarak adlandırılır.



Şekil 2.4- Kretschmann konfigürasyonu

SPR spektrumu, yansıma eğrisindeki 3 parametre ile karakterize edilir: K_{min} 'in yeri (K_{sp} 'ye denk gelir), R_{min} 'in değeri ve yarı tepe yüksekliğindeki genişlik " $\Delta\kappa$ ". K_{ph} değeri SP dalgaları ışığın geliş açısı ile rezonans elde edilecek şekilde ayarlandığında, K_{min} 'e karşılık gelen θ_{sp} "Plazmon açısı", "Rezonans açısı" veya "SPR açısı" olarak adlandırılır. İdeal bir rezonans eğrisi için R_{min} ve $\Delta\kappa$ 'nın sıfıra yakın olması gerekir ki bu durumda eğri neredeyse sonsuza yakın diktir. Rezonans eğrisinin karakteristik değişkenleri (K_{min} , R_{min} ve $\Delta\kappa$) uyarılan plazmon dalgasının yayılma karakteristiğini, belirli bir malzeme kombinasyonu ve kullanılan ışığın dalga boyu için tam olarak ifade eder.

Bir SPR sistemi, SPR'yi uyarmak için bir optik düzenek, uyarılan optik dalganın parametrelerin ölçülmesi için bir çevirici ve veri işleme için elektronik sistemden oluşur. Bu tür bir bütünleşik SPR sistemi "SPR sensör" veya "SPR spektrometre" olarak adlandırılır. SPR sensörün duyarlılığı, kararlılığı ve çözünürlüğü SPR sistemini oluşturan bileşenlere bağlıdır. Kullanılan SPR konfigürasyonlarında değişen bileşenler (optoelektronik cihazlar: ışık kaynakları, detektörler; optik cihazlar: dalga boyu ayarlama cihazları, küresel ve silindirik lensler, polarizasyon filtreleri, prizmalar, dalga yönlendiriciler vb.; mekanik bileşenler: döner tablalar vb.; bilgisayar ve yazılım paketleri gibi) Çizelge 2.2'de verilmiştir (Homola *et al.*, 1999).

Çizelge 2.2- SPR algılama geometrileri için farklı kaynak-analiz-algılayıcı yapılandırmaları

Kaynak yapısı		Analiz yapısı				Algılayıcı yapısı					
Kaynak	Dalga	Işık geometrisi		çoklama	Yapılandırma	Işık tarama	Algılayıcı	Çıktı			
Mono-kromatik lazerler	Küresel dalga	Prizma tip			Otto	SPR	CCD dizisi				
Quasi-monokromatik LED		Dalga yönlendirici tip	Düzlemsel				LRSPR	Doğrusal fotodiyot dizisi			
Poli-kromatik tungsten lambası								Geçirgen	Yansıtma	CPWR	Fotodiyot/güç ölçer/foto eşleyici tüp
Yarıklı tip	Kretschmann	CLR	PWR	Döner tabla	Görsel yaklaşım						
						Eğri uydurma ve interpolasyon için bilgisayar yazılımı					

Yüzey plazmon rezonansı (SPR), farklı disiplinlerde kullanıma uygun, geniş uygulama alanı bulan eşsiz bir yüzey analiz yöntemidir. Bu yöntem, sensör yüzeyi yakınındaki dielektrik fonksiyon değişikliğinin gözlenmesi için kullanılır. Bu nedenle, yüzeyin yakınında dielektrik fonksiyonu değiştirebilen bir fiziksel, kimyasal veya biyolojik olay, etkin bir şekilde belirlenebilir (Lavers ve Wilkinson, 1994). İnce metal filmlerin optik özelliklerinin belirlenmesi (Robertson ve Fullerton,

1989), kimyasal tayin (Mastubara *et al.*, 1988), immünoanaliz (Kunz *et al.*, 1996), biyoanaliz (Liedberg *et al.*, 1985), absorpsiyon (Kano ve Kawata, 1994) adsorpsiyon (Klomenskii *et al.*, 1997), gaz tayini (Nylander *et al.*, 1982), optik sabit ölçümleri (Homola *et al.*, 1997), ince film karakterizasyonu (Rothenhausler *et al.*, 1988), optik modülasyon (Jung *et al.*, 1994), bistabilite (Zhang *et al.*, 1993), filtreler (Kajenski, 1997) ve benzeri uygulamalarda, bir çok farklı alanda uygulama mevcuttur. Ayrıca SPR tekniğinin yeni alanlarda kullanımı oldukça muhtemeldir. Algılama metodunun yapılandırmasına bağlı olarak, SPR uygulamaları iki sınıfa ayrılabilir:

- 1) Üçüncü ortamın kırılma indisinin değişmesi ile SPR açısındaki değişimin ikincil modülasyonu ile,
- 2) Sabit üçüncü ortam ve sabit SPR açısı ile.

Algılama yöntemine göre ise dört grupta incelenebilir:

- 1) SPR açısı modülasyonu,
- 2) Dalga boyu modülasyonu,
- 3) Genlik (şiddet) modülasyonu,
- 4) Faz modülasyonu.

2.2.5 SPR modellemesi için ince film teorisi: Fresnel modeli

SPR cihazı, iki dielektrik ortam arasına sıkışmış iki ara yüze sahip bir sistemden oluşur. Bu tür iki ara yüzeye sahip bir sistemin reflektivitesi, birinci ve ikinci ara yüzeyden yansıyan ışık ile ara yüzeylerde gerçekleşen çoklu yansıma genliklerinin toplamına eşittir. İnce filmlerde Fresnel eşitlikleri veya Fresnel yansıma katsayıları kullanılarak SPR karakteristiği elde edilir. Üç tabakalı bir dielektrik-metal-dielektrik bileşiminde konfigürasyonlar için Fresnel modelinden elde edilen yansıma fonksiyonu (R_F)'nın analitik formu Eşitlik 2.12'de verildiği gibidir:

$$R_F = \frac{(r_{12} + r_{23} \exp(-2kd))}{1 + r_{12}r_{23} \exp(-2kd)} \quad (2.12)$$

Burada r_{12} ve r_{23} sırasıyla dielektrik (ϵ_d) - metal (ϵ_m) ve metal (ϵ_m) - dielektrik (ϵ_s) ara yüzeyinin Fresnel yansıma katsayıları, k , cihazın referans eksenine paralel çözümlenmiş uyarılan ışık dalga vektörünün bileşeni ve d , metal tabakasının kalınlığıdır.

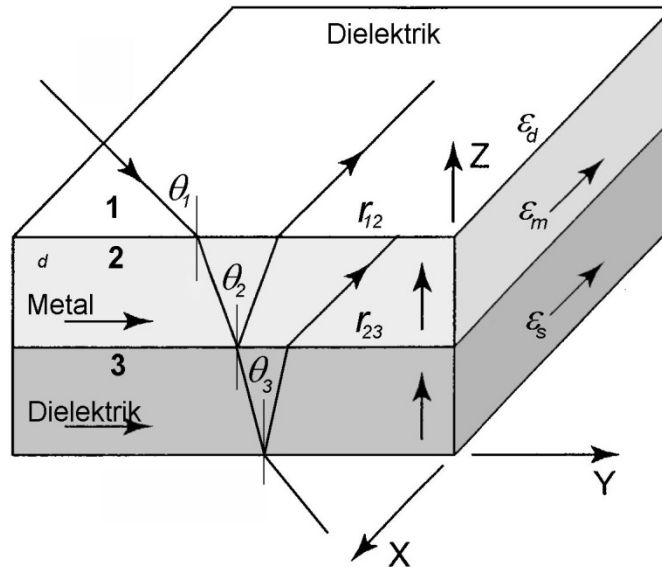
Üç tabakalı sistemde r_{12} , r_{23} ve k değeri, gelen ışığın açısıyla aşağıdaki gibi değişir:

$$r_{12} = \frac{(\epsilon_m)^{1/2} \cos(\theta_1) - (\epsilon_d)^{1/2} \cos(\theta_2)}{(\epsilon_m)^{1/2} \cos(\theta_1) + (\epsilon_d)^{1/2} \cos(\theta_2)} \quad (2.13)$$

$$r_{23} = \frac{(\epsilon_s)^{1/2} \cos(\theta_2) - (\epsilon_m)^{1/2} \cos(\theta_3)}{(\epsilon_s)^{1/2} \cos(\theta_2) + (\epsilon_m)^{1/2} \cos(\theta_3)} \quad (2.14)$$

$$k = -i \left[\frac{\omega}{c} \right] \left[\epsilon_m - \epsilon_d \sin^2(\theta_1) \right]^{1/2} \quad (2.15)$$

Burada c ışığın vakumdaki hızı, ω gelen ışığın açısal frekansı, θ_1 , θ_2 ve θ_3 Şekil 2.5'te gösterilen açılardır.



Şekil 2.5 - Dielektrik-metal-dielektrik yüzeyinde gelen, geçen, yansıyan ışık demetleri

2.3 Elipsometri ve Reflektometri

Kalınlık gibi çok küçük özelliklerin ölçülmesi, bazı durumlarda geleneksel yöntemlerle gerçekleştirilemez. Bu durumlarda, bazı problar (elektronlar, iyonlar, fotonlar vb.) kullanılarak, malzemede ölçülmek istenen özeliğin prob özelliklerini nasıl değiştirdiğine bakılır. Spektroskopik (veya tek dalga boylu) elipsometri ve reflektometride prob olarak; UV, görünür veya IR bölgedeki ışık demeti veya elektromanyetik dalga kullanılır.

2.3.1 Bir elektromanyetik dalganın tanımı

Yayıma düzlemine dik, ışık ve elektrik arasında zıt yönlü bir titreşim Maxwell eşitlikleri olarak bilinen 4 denklikle ifade edilmektedir (Jackson, 1962).

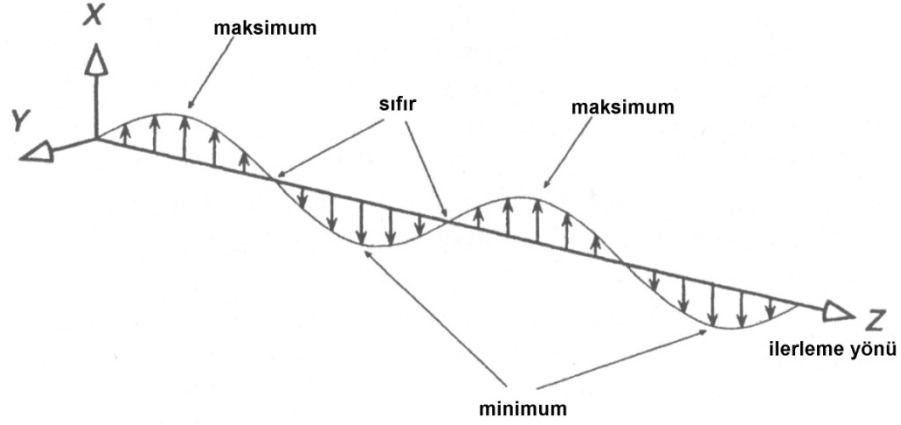
Elektromanyetik dalga karşılıklı elektrik alan vektörü ve manyetik alan vektöründen oluşan ve her ikisinin genliği zaman ve konumun bir fonksiyonu olarak değişen dalgadır. Elektrik vektörü ile manyetik vektör birbirlerine diktir ve her ikisi de ışığın yayılma yönüne diktir. Bu iki vektör tam anlamıyla birbirinden bağımsız değildir. Elektrik alan vektörünün özellikleri manyetik alan vektörünün özelliklerini; manyetik alan vektörünün özellikleri ise elektrik alan vektörünün özelliklerini belirler.

Elektromanyetik düzlem dalgası için eşitlik, birkaç şekilde ifade edilebilir ve amacı elektrik alanı, zamanın ve konumun bir fonksiyonu olarak tanımlamaktır. Tek bir yönde yayılma olduğunda, elektrik alan aşağıdaki eşitlikle ifade edilir:

$$E(z,t) = E_o \sin\left(-\frac{2\pi}{\lambda}(z - vt) + \xi\right) \quad (2.16)$$

Burada E , herhangi bir anda ve yerde elektrik alanın şiddeti, E_o dalganın maksimum alan gücü veya genliğini, z alınan yolu, t zamanı, v ışığın hızını, λ dalga boyunu ve ξ rastgele seçilmiş faz açısını göstermektedir. Şekil 2.6'da dikey yönde elektrik alan ile hareket eden bu tür bir dalga gösterilmiştir. Buradaki çizimde sabit zamanda, konuma göre elektrik alanın fonksiyonu gösterilmiştir.

Elektrik alanın maksimum, minimum ve sıfır olduğu yerler, polarizasyonla ilgili açıklamalarda kullanılmak üzere belirtilmiştir.



Şekil 2.6- Herhangi bir anda konumun fonksiyonu olarak elektrik alanının gösterimi.

Eğer, sinüs fonksiyonundan daha genel olan bir dairesel fonksiyon ve üç boyut (vektör) notasyonu kullanılırsa, dalga eşitliği için bir çözüm, Maxwell eşitliği kullanılarak sağlanır.

$$\bar{E}(\bar{r}, t) = \bar{E}_0 \exp\left(-\frac{j2\pi\bar{N}\bar{q}\cdot\bar{r}}{\lambda}\right) \exp(-j\omega t) \quad (2.17)$$

Burada $\bar{r}$ vektörün konumu, $\bar{q}$ dalganın yayılım yönündeki birim vektör, $\bar{N}$ kompleks kırınım indisi, ω açısal frekans ve j imajiner sayı ($\sqrt{-1}$) dir.

Yüksek açısal frekans nedeniyle elektrik alanın genliği doğrudan ölçülemez. Bunun yerine ışımanın enerji akısı ölçülür. Yayılan dalganın doğrultusuna dik birim alanda, aktarılan enerji miktarı dalganın şiddeti (I) olarak gösterilir ve dalganın genliğinin karesi ile orantılıdır:

$$I \propto E_0^2 \quad (2.18)$$

Reflektometride dalganın şiddeti kullanılırken, elipsometride dalganın genliği kullanılır.

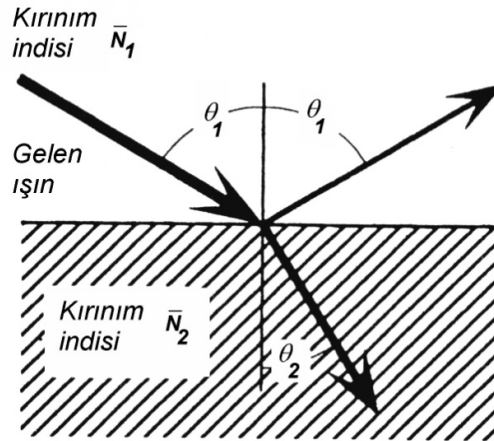
2.3.2 Maddenin elektromanyetik dalgalara etkisi

Bir ışın (düzlemsel dalga) hava ile bir başka madde arasındaki ara yüzeye geldiğinde, dalga genellikle yavaşlar, yön değiştirir ve bazı durumlarda soğrulmaya başlar. Işığın bir kısmı geldiği ortama (hava) geri yansır ve ikinci ortama giremez (Şekil 2.7).

Optik olarak incelediğimizde ikinci ortam kompleks kırınım indisi, $\bar{N}_2$ ve kalınlığı ile karakterize edilir. Genel olarak kompleks kırınım indisi reel bir sayı imajiner bir sayının bileşimidir ve aşağıdaki gibi ifade edilir:

$$\bar{N} = n - jk \quad (2.19)$$

Burada n kırınım indisi, k sönümlenme katsayısı ve j imajiner sayıdır.



Şekil 2.7- Kompleks kırınım indisi $\bar{N}_2$ olan bir ortam ile hava ara yüzündeki düzleme paralel etkileşen ışık

Cam gibi bir dielektrik malzemede n , uzaydaki ışık hızının, malzemedeki ışık hızına oranı olarak tanımlanır:

$$n = \frac{c}{v} \quad (2.20)$$

Örneğin silisyum nitritte $n=2$ 'dir ve ışığın burada boşluktakinin yarı hızında hareket ettiği anlamına gelir. Sönümleme katsayısı k ise, ışığın şiddetinin malzemeden geçerken nasıl bir hızla azaldığının bir ölçüsüdür.

Sönümleme katsayısı k , absorpsiyon katsayısına aşağıdaki eşitlik ile bağlıdır:

$$k = \frac{\lambda}{4\pi} \alpha \quad (2.21)$$

Kırınım indisi ve sönümleme katsayısı dalga boyunun bir fonksiyonudur. Çizelge 2.3'te bazı maddeler için, verilen dalga boylarında sönümleme katsayıları ve nüfuz derinliği hakkında örnekler verilmiştir:

Çizelge 2.3 – Farklı malzemeler için nüfuz derinliği (Tompkins, 1993)

Madde	Dalga boyu (λ)	Sönümleme katsayısı (k)	Nüfuz derinliği (nm)
Tekli Si kristalleri	632,8	0,016	3100
Tekli Si kristalleri	300,9	4,09	5,8
Tungsten kristalleri	632,8	2,63	19,1
Alüminyum kristalleri	632,8	6,2	7,3

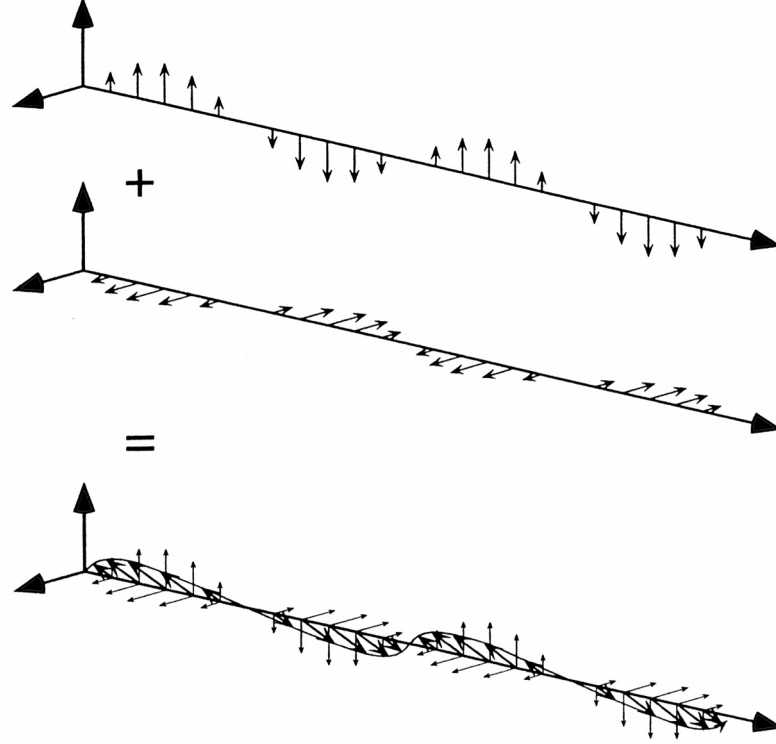
2.3.3. Polarize ışık

Bir foton ışık kaynağından çıktığında ona ait elektrik alanı belirli bir yönde oluşur. İkinci fotonun elektrik alanı daha farklı bir yönde olmaktadır. Genellikle, fotonlar yayıldıkça bütün yönlerde elektrik alanları ile birlikte ilerler. Bu durumda “polarize olmayan ışık” elde edilir. Işın demetindeki tüm fotonlar belirli yönde olacak şekilde düzenlenirse “polarize ışık” elde edilir. Bunu yapmanın en genel yolu ışığı sadece istenilen yönde elektrik alanının geçebileceği bir optik elemanın içerisinden geçirmektir. Bir diğer yöntem ise doğrudan polarize ışık yayan bir ışık kaynağı kullanmaktır.

2.3.3.1. Doğrusal polarize ışık

Şekil 2.8'de aynı frekansta, aynı genlikte ve aynı yönde giden iki ışın demeti için elektrik alan şiddeti gösterilmiştir. Işınlardan biri yatay diğeri ise dikey yönde polarize edilmiştir. Her iki dalganın da maksimum, minimum ve sıfır noktaları

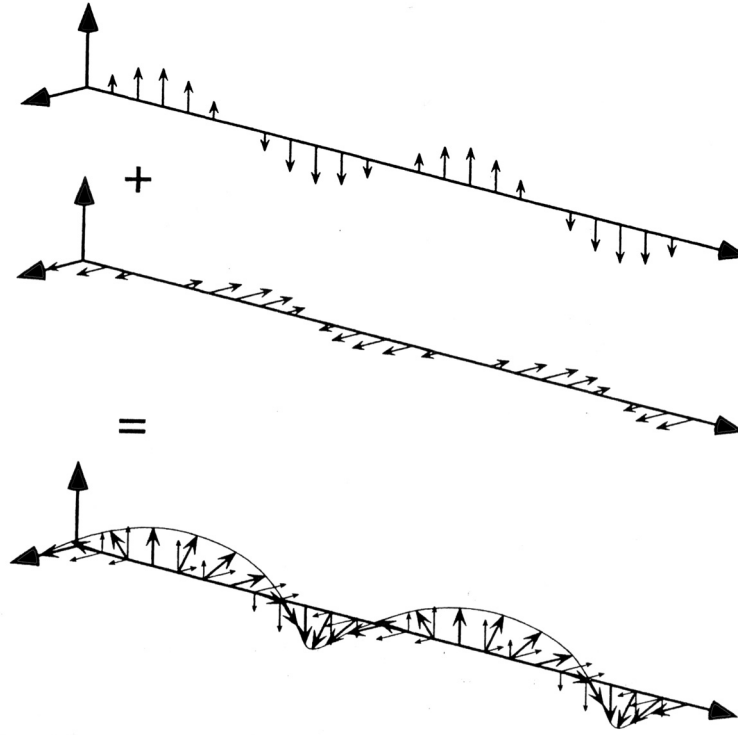
çakışabilecek durumdadır ve bu durumdaki dalgalar “aynı fazda” olarak nitelendirilir. Bu iki dalga üst üste bindirilirse elde edilen dalga, düzleme 45° açı ile polarize edilmiş yeni bir polarize edilmiş ışık olur. İki doğrusal polarize dalganın bileşimi ile yeni bir doğrusal polarize dalga meydana gelir.



Şekil 2.8- Aynı fazda ve frekansta olan iki lineer polarize ışık demeti lineer polarize ışık oluşturur.

2.3.3.2. Eliptik olarak polarize edilmiş ışık

Bir dik ve diğeri yatay polarize edilmiş iki ışın demeti Şekil 2.9’da gösterilmiştir. Burada iki ışının arasındaki maksimum, minimum ve sıfır noktaları birbirinden 90° faz farkı yaratacak şekilde kaydırılmıştır. İki dalga birleştirildiğinde, dalga bileşkesi bir daire çizerek hareket eder. Bu durumda “daireysel polarize” ışık elde edilir. Faz farkı 90° ’den farklı olursa veya genlikler eşit olmazsa, dalga uçları eliptik olarak hareket ediyormuş gibi gözükür. Bu durumda “eliptik olarak polarize edilmiş ışık” elde edilir. Kısaca, aynı frekansa sahip iki doğrusal polarize ışık demeti, “faz farkı” olacak şekilde üst üste bindirilirse, sonuçta “eliptik olarak polarize edilmiş ışık” elde edilir.



Şekil 2.9 - Çeyrek dalga faz kayması olan ve aynı frekansta olan iki lineer polarize ışık demeti dairesel polarize ışık oluşturur.

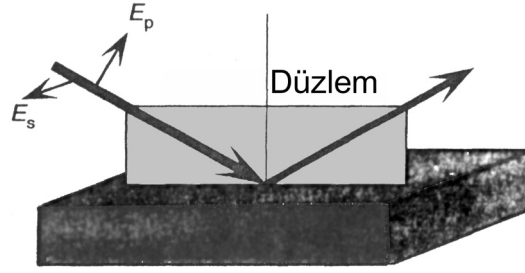
Elipsometrede, *eliptik olarak polarize edilmiş ışık kullanılır*. Eliptik olarak polarize ışık, lineer olarak polarize edilmiş bir ışığın belirli koşullarda bir yüzeyden yansması ile elde edilir. Eliptikleşme miktarı yüzeye ilişkilidir (optik sabitler, yüzeyde filmlerin olması vb.). Optik bileşenler yansıma sonucu ne kadar eliptiklik oluştuğunu belirler ve bu durumda filmlerin özellikleri (optik sabitler, filmlerin kalınlığı vb.) belirlenebilir.

2.3.4. Reflektometri temelleri ve elipsometri modelleri

2.3.4.1. Yansıma düzlemleri

Gerek reflektometri, gerekse elipsometri, ilgilenilen yüzeyden ışığın yansıtılması prensibi ile çalışır. Yansıma denklemlerini yazmak üzere bir referans düzlem belirlenmesi gerekir.

Şekil 2.10'da, gelen ışığın bir yüzeyden yansıması gösterilmiştir. Yüzeye dik olan düzlem, gelen ve yansıyan ışıkla aynı düzlemedir ve geliş düzlemi olarak adlandırılır. Geliş açısı, yüzeyin normali ile gelen ışığın yaptığı açıdır. Şekil 2.10'da geliş düzlemine dik E_s ve geliş düzlemi ile aynı düzlemde E_p hareket eden elektrik alan dalgaları gösterilmiştir.



Şekil 2.10 - Geliş düzlemine dik E_s ve geliş düzlemi ile aynı düzlemde E_p hareket eden elektrik alan dalgaları

Bu dalgalar p-dalgası ve s-dalgası olarak adlandırılır. “s” ve “p” indisleri Almanca “senkrecht” ve “parallel” kelimelerinin ilk harfleridir.

2.3.4.2. Her iki polarizasyon düzlemi için Fresnel yansımaya eşitlikleri

Reflektans ($\mathfrak{R}$) yansıyan ışığın şiddetinin, gelen ışığın şiddetine oranıdır. Bu tüm reflektans ölçümü cihazlarında ölçülen büyüklüktür. Şiddet, dalganın genliğinin karesi ile orantılıdır. Reflektans ile birlikte, gelen dalganın genliği ile yansıyan dalgaların genlikleri oranı da incelenir. Tek bir ara yüzey olduğunda bu denklemlerin çıkarılması nispeten kolaydır. Tek bir ara yüzey incelendiğinde, elde edilen oran Fresnel yansımaya katsayısı olarak adlandırılır ve s-dalgaları ve p-dalgaları için birbirinden farklı ifade edilir. 1 ve 2 numaralı ortamlar için Fresnel yansımaya katsayıları aşağıdaki gibidir:

$$r_{12}^p = \frac{\bar{N}_2 \cos \theta_1 - \bar{N}_1 \cos \theta_2}{\bar{N}_2 \cos \theta_1 + \bar{N}_1 \cos \theta_2} \quad (2.22)$$

$$r_{12}^s = \frac{\bar{N}_1 \cos \theta_1 - \bar{N}_2 \cos \theta_2}{\bar{N}_1 \cos \theta_1 + \bar{N}_2 \cos \theta_2} \quad (2.23)$$

Üst indisler p ve s-dalgalarını, alt indisler ise ara yüz ile ayrılan iki ortamı ifade eder.

2.3.4.3. Brewster açısı

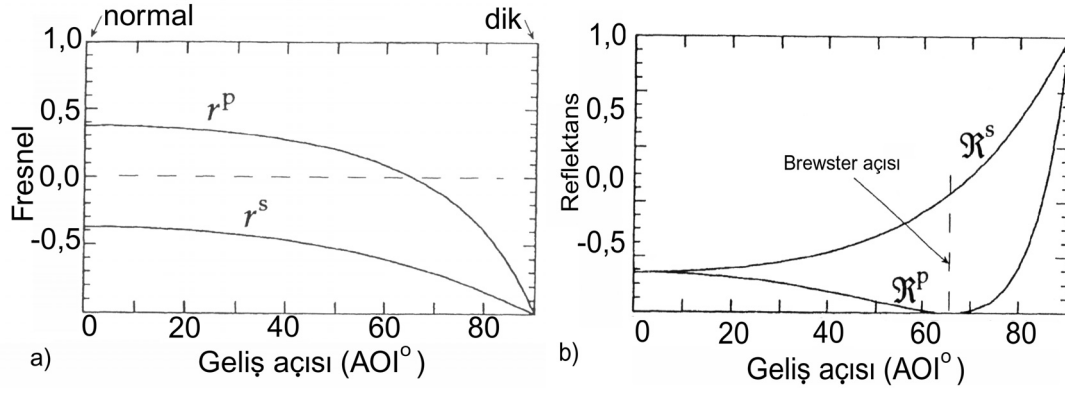
Havadan bir dielektrik ortama gelen ışın durumunda $k=0$ olacağından Fresnel eşitliklerindeki tüm terimler gerçekte sayı olur. Şekil 2.11 a)'da TiO_2 'nin ($n=2.2$) 632,8 nm dalga boyunda, geliş açısının bir fonksiyonu olarak Fresnel katsayılarının değişimi gösterilmiştir. Normal geliş açısından r^p ve r^s farklı işaretle olur ancak büyüklükleri aynıdır. Tek bir ara yüzey durumunda, refrektans, Fresnel yansıma katsayısının karesine eşit olur. Şekil 2.11 b)'de geliş açısının fonksiyonu olarak refrektans gösterilmiştir. Normal geliş açısında, kosinüs terimlerinin hepsi +1'e eşit olur ve:

$$r_{12}^p = \frac{n_2 - 1}{n_2 + 1} \quad (2.24)$$

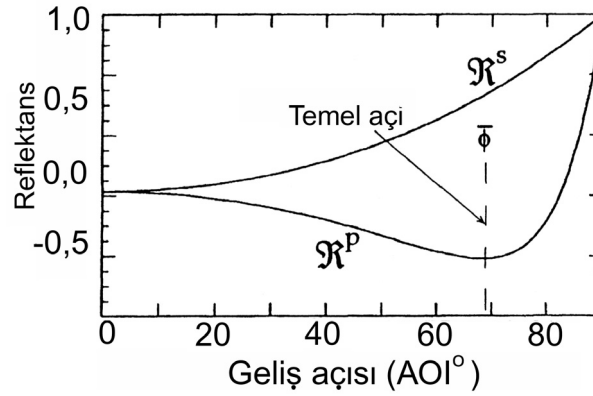
$$r_{12}^s = \frac{1 - n_2}{1 + n_2} \quad (2.25)$$

$$\mathfrak{R}^p = \mathfrak{R}^s = \left(\frac{n_2 - 1}{n_2 + 1} \right)^2 \quad (2.26)$$

r^p 'nin sıfıra eşit olduğu geliş açısında, $\mathfrak{R}^p$ 'de sıfıra eşittir ve yansıyan ışığın tümü geliş düzlemine dik polarize olarak yansır. Bu açı Brewster açısı olarak tanımlanır (Şekil 2.11). Bu durum 1800'lü yılların başlarında David Brewster (1831) tarafından keşfedilmiştir. Bu açı "polarizasyon açısı" bezen de "temel açı" olarak ifade edilir. Ortamın dielektrik olmadığı durumda, k 'nın sıfıra eşit olmaması söz konusudur (metal ve yarı iletkenlerde). Şekil 2.12'de $\mathfrak{R}^p$ 'nin sıfır olmadığı; ancak, temel açıda bir minimumdan geçtiği görülmektedir.



Şekil 2.11- Havadan, TiO_2 gibi bir dielektrik ortama gelen ışık için (a) Fresnel yansımaya katsayıları (b) Reflektans

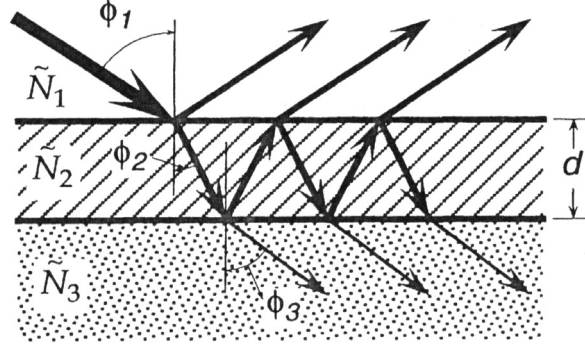


Şekil 2.12 - Havadan Ta (632,8 nm dalga boyunda $n=1,72$, $k=2,09$) gibi bir metal yüzeyine gelen ışın için geliş açısına karşı reflektans.

Elipsometrik ölçümlerden yüksek duyarlılıkta ve doğru sonuç alınması için temel açıda veya yakınında çalışmak gereklidir.

2.3.4.4. Filmlerden yansımaya

Birden fazla ara yüzün olduğu durumda, ilk ara yüzden geçen ışın ihmal edilemez. Şekil 2.13'te, birinci ve ikinci ara yüzden yansıyan ışık gösterilmiştir. Yansımaya ve geçiş, kısmi dalgaların sonsuz serisinden oluşur.



Şekil 2.13 - iki ara yüzeyden gerçekleşen kırınım ve yansımaya

Gelen ışığın, sonuçta yansıyan ışığın genliğine oranı “toplam yansımaya katsayısı” olarak adlandırılır ve tekli ara yüzey için Fresnel yansımaya katsayısının benzeridir. Tek bir film (iki ara yüzey) için:

$$R^p = \frac{r_{12}^p + r_{23}^p \exp(-j2\beta)}{1 + r_{12}^p r_{23}^p \exp(-j2\beta)} \quad (2.27)$$

$$R^s = \frac{r_{12}^s + r_{23}^s \exp(-j2\beta)}{1 + r_{12}^s r_{23}^s \exp(-j2\beta)} \quad (2.28)$$

Burada;

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) \bar{N}_2 \cos \theta_2 \quad (2.29)$$

$k \neq 0$ olduğunda Fresnel katsayıları, $\bar{N}_2$ ve $\cos \theta_2$ (ve dolayısıyla β) kompleks sayılar olur. $k=0$ olduğunda bu sayılar reel sayılardır. Çoklu filmler için Eşitlik 2.27 ve 2.28'in sağ tarafı bütün filmlerden yansıyan ışık için toplam yansımaya katsayısının bulunması amacıyla iterasyonla belirlenebilir (Tompkins, 1993). İterasyon yapılmadığı durumda bazı matris temelli çözümler uygulanabilir (Press *et al.*, 1988).

2.3.4.5 Elipsometre ve reflektometreye ait tanımlar

Reflektans, çıkan dalganın şiddetinin gelen dalganın şiddetine oranı olarak tanımlanır. Eşitlik 2.27 ve 2.28’da verilen dalgaların genlikleridir ve reflektans, toplam yansıma katsayılarının karesidir:

$$\mathfrak{R}^p = |R^p|^2 \quad (2.30)$$

$$\mathfrak{R}^s = |R^s|^2 \quad (2.31)$$

Film olmadığı durumda, tek bir ara yüz için toplam yansıma katsayıları Fresnel yansıma katsayıları olur. Reflektans ölçümleri genelde normal geliş açısında veya bu açığa yakın gerçekleştirilir ve kosinüslü terimler 1’e eşit olur, bu durumda p-dalgaları ile s-dalgaları arasında fark yoktur.

2.3.4.6. Delta (Δ) ve Psi (ψ)

Şekil 2.10’da p-dalgaları ve s-dalgaları gösterilmiştir ve aynı fazda olmaları gerekli değildir. Her biri yansıma uğradığında faz kayması gerçekleşir. p-dalgaları ve s-dalgaları arasında yansımadan önceki (δ_1) ve yansımadan sonraki (δ_2) faz farkları alınırsa, delta (Δ) parametresi aşağıdaki gibi ifade edilebilir:

$$\Delta = \delta_1 - \delta_2 \quad (2.32)$$

Δ , yansıma sonucu oluşan faz kaymasıdır ve değeri -180° ile $+180^\circ$ arasında (veya alternatif olarak 0° ile 360° arasında) değişir.

Faz kaymasına ek olarak, yansıma sonucu p-dalgası ve s-dalgasının şiddetinde bir azalma gerçekleşir. Psi (ψ) aşağıdaki şekilde ifade edilen ve bu azalmayı gösteren bir terimdir:

$$\tan \psi = \frac{|R^p|}{|R^s|} \quad (2.33)$$

ψ , tanjantı toplam yansıma katsayılarının büyüklüklerinin oranı olan bir açıdır ve 0° ile 90° arasında değişir.

2.3.4.7. Elipsometrinin temel eşitliği

Psi (ψ) toplam yansıma katsayılarının büyüklüklerinin oranı olduğundan ve gerçekte bir sayı olduğundan, toplam yansıma katsayılarının kompleks oranlarını belirlemek için bir kompleks sayı tanımlanmıştır, ρ :

$$\rho = \frac{R^p}{R^s} \quad (2.34)$$

Elipsometri için temel eşitlik:

$$\rho = \tan\psi e^{i\Delta} \text{ veya } \tan\psi e^{i\Delta} = \frac{R^p}{R^s} \quad (2.35)$$

ψ ve Δ (bazen $\cos\Delta$) elipsometre tarafından ölçülen değerlerdir. Kalınlık ve optik sabitler ise elde edilen ψ ve Δ değerlerinin modellenmesi sonucu hesaplanan değerlerdir.

2.4. Elipsometri Teknikleri

2.4.1. Görüntülemeli elipsometre

Görüntülemeli elipsometre (imaging ellipsometry, IE) eliptik polarize ışığın film yüzeyinden yansıdıktan sonra polarizasyon durumundaki sapmanın ölçüldüğü elipsometrik ölçümlere benzerdir ve katı bir yüzeye (silikon, altın gibi) immobilize edilmiş ince organik filmlerin ve organik tek tabakaların adsorpsiyonunun incelenmesi için yeterli hassasiyete sahiptir (Bae *et al.*, 2004).

2.4.2. İçten tam yansımali elipsometri (Total Internal Reflection Ellipsometry – TIRE) ve SPR ile güçlendirilmiş TIRE

İçten tam yansımali elipsometri kırınım indisi daha yüksek olan bir ortamdan daha düşük bir ortama gelen ışının, ara yüzeyde içten tam yansıması ile oluşur. Bu

yansıma belirli bir açıdan sonra gerçekleşir ve bu açı kritik açı (ϕ_c) olarak adlandırılır:

$$\phi_c = \frac{n_2}{n_1} \quad (2.36)$$

Ancak tam yansıma sırasında gelen ışığın elektrik alanı ikinci ortamın içerisine sızar ve bu dalga SPR'da olduğu gibi sönümlü dalga olarak adlandırılır. İçten tam yansıma ile ilgili olan bu sönümlü dalga, ara yüzeydeki tabakaların incelenmesi için kullanılabilir. Ayrıca, kızılötesi ışık kullanıldığında azaltılmış içten tam yansıma (attenuated total internal reflection ATR) tekniği ile birleştirilerek ATR elipsometri uygulaması yapılması mümkündür (Poksinski ve Arwin, 2003).

Bu sönümlü dalga/alan gönderilen ışığın dalga boyunun yarısı kadar bir mesafede iç ortama nüfuz eder. Genellikle bir kaç yüz nanometreye tekabül eden bu nüfuz derinliği birkaç ilave organik tabakanın incelenmesini mümkün kılar.

ATR prizmasına immobilize edilen ışık geçirgen tabakalar ve ışığın geliş ortamından farklı bir malzeme kullanıldığında tabakaların adsorpsiyon/desorpsiyon kinetikleri incelenebilir. Ayrıca TIRE-Elipsometre düzenlemesinde ince bir metal film de kullanılırsa, SPR ile artırılmış TIRE-Elipsometre uygulaması sağlanmış olur (Liedberg *et al.*, 1995). SPR koşulu için genelde Au gibi metaller kullanılırken SPR ile artırılmış TIRE uygulamasında farklı metaller de kullanılabilir.

Poksinski ve Arwin (2003), TIRE uygulaması ile süte maruz kalan çelik yüzeylerin incelenmesi ile ilgili bir çalışma gerçekleştirmiştir. Farklı metallerin ince film halinde yüzeye kaplanması ile kap içindeki sıvının kap çeperlerine yaptığı etki oldukça hassas bir şekilde incelenmiştir. Ayrıca kullanılan açıda, deltadaki değişimin Au filmde daha yüksek olduğu bulunarak SPR etkileşimi de doğrulanmıştır.

Elipsometrik uygulamada SPR'ın uyarılması için içten tam yansımali elipsometrede kullanılması gereken açı aşağıdaki eşitlik ile hesaplanabilir:

$$\theta = \arcsin \left[\frac{1}{N_1} \sqrt{\frac{\varepsilon_m N_2^2}{\varepsilon_m + N_2^2}} \right] \quad (2.37)$$

Burada N_1 ve N_2 geliş ortamı ile biyolojik ortamın kırınım indisini, ε_m ise kullanılan metalin dielektrik sabitini göstermektedir (Wetphal ve Bommann, 2002).

Elipsometredeki delta değişiminin SPR ile artırılması ile Whetstpal ve Bornmann (2002) $\cos\Delta = 0,1$ / nm'lik bir duyarlık elde etmişlerdir. Algılama sınırı, kullandıkları konfigürasyon için yaklaşık 10 pg/mm^2 'dir.

Dalga boyu modülasyonlu elipsometre sisteminde SPR ile güçlendirilmiş TIRE uygulamasında, ince altın metal film üzerine protein tek tabakalarının adsorpsiyonunun incelendiği çalışmada, sensör hassasiyetinin arttığı görülmüştür (Poskinski ve Arwin, 2004).

Elipsometrik sensör sistemlerinin algılama sınırı hakkında bazı temel problemler ortaya çıkmaktadır. Öncelikle çalışmaların çoğunda yığın fazdaki derişim ile ilgilenilirken, sensör algılaması yüzeydeki derişim ile ilgilidir. Elipsometrik sensörler $0,001^\circ$ veya daha iyi bir Δ ve ψ çözünürlüğüne sahiptir. Bu değer boş silikon yüzeyinde biriken bir organik film için $0,0003 \text{ nm}$ kalınlık değerine denk gelir. Örneğin Brewster açısında veya sözde Brewster açısı yakınında hassas bir ölçüm yapılmak istendiğinde, cihazdaki titreşimler nedeniyle, oluşacak açı kayması gürültüye neden olarak algılama sınırını yükseltecektir. Ancak en büyük sorun, istenmeyen moleküllerin bağlanması ile oluşan spesifik olmayan bağlanmadır. Sıvı sistemlerde algılama sınırı $0,01 \text{ ng/mL}$ - $0,1 \text{ ng/mL}$ arasında iken gaz sensörlerinde 10 ppm civarındadır (Arwin, 2001).

Elipsometrenin bir diğer uygulama avantajı ise, tabakaların ışık geçirgen olarak kabul edildiği durumda birim yüzey alana adsorplanan kütle Γ ($\mu\text{g/cm}^2$) de Feijter bağıntısı ile hesaplanabilir:

$$\Gamma = \frac{d(n - n_o)}{dn/dc} \quad (2.38)$$

Burada n_o dış ortamın kırınım indisi, n ve d sırasıyla ölçülen ortamın kırınım indisi ve kalınlığı ve dn/dc derişime bağlı olarak kırınım indisindeki değişmedir (Arwin, 2000).

Ayrıca bir proteinin yüzey derişimi aşığıdaki basitleştirilmiş eşitlikle hesaplanabilir (Γ (ng/mm²)); $\Gamma = K \times df$. Burada K= 1,36 g/mL (proteinlerinin yoğunluğu) df (nm) filmin kalınlığıdır (Elwig, 1998).

2.5. SPR Yöntemi ve Elipsometri'nin Kullanım Alanları

SPR'ın biyosensör amaçlı ilk kullanımı 1982-1983 yıllarında Liedberg ve ark. tarafından IgG'nin Au sensör yüzeyine seçici bağlanması ve IgG'nin tayini ile gerçekleşmiştir (Nylander *et al.*, 1982; Liedberg *et al.*, 1983). Elipsometri ise, genellikle ince film araştırmalarında kullanılmış olup, elipsometre ile biyomoleküler etkileşimlerin incelenmesi ile ilgili az sayıda çalışma mevcuttur (Arwin, 1997).

SPR'ın diğer sensörlere göre avantajı flöresan veya radyoizotop etiketleme olmaksızın biyomoleküler etkileşimlerin incelenebilmesidir. Bu yaklaşım, her bir biyomoleküler etkileşim basamağında, derişimin, kinetik sabitlerin ve özgüllüğün gerçek zamanlı olarak belirlenmesine de olanak tanır. SPR tekniğı ile antijen-antibadi etkileşimleri, peptid/protein-protein etkileşimleri, DNA hibridizasyonu, polimerlerin biyo-uyumluluk çalışmaları, biyomolekül-hücre reseptör etkileşimleri ve DNA/reseptör-ligand etkileşimleri analiz edilebilir (Pothak ve Savelkoul, 1997)

2.5.1. Gıda ve su güvenliğı

Tahıl ürünlerinde, sebze ve meyvelerde, et, süt ve balık üretiminde kullanılan ürünlerdeki belirli maddelerin kontrolü üreticiler, gıda endüstrisi, mevzuat hazırlayanlar ve tüketiciler için önemlidir. Düşük seviyelerdeki bu maddelerin kontrolü analitik olarak gerçekleştirilir. Örneğın; gıda katkı maddesi, bir besine, besinin kalitesini artırmak için katılan bitkiler veya vitaminler gibi katkılardır. Bu katkı maddelerinin doğru miktarlarda katılıp katılmadığı gıda endüstrisi ve tüketici için kontrol edilmesi ve bilinmesi gereken bir konudur.

Yine gıdaların içindeki patojenlerin, toksinlerin, ilaç kalıntılarının ve katkı maddelerinin belirlenmesi önemli bir konudur. Bu maddelerin uygun analiz teknikleri ile hızlı analiz edilmesi ve doğru sonuçların elde edilmesi önemlidir. Yüzey plazmon esaslı kitler hazırlanarak, süt, reçel, meyve suyu, bal, un ürünleri, et ve et ürünleri ile ilgili analizler standart protokoller uygulanarak yapılabilir. Hızlı

analiz, düşük miktarda numune kullanılması ve sınır seviyelerdeki eser maddeleri tayin etmeye yeterli hassasiyeti ile SPR ve elipsometri'nin gıda analizlerinde, diğer immünoanalizler veya mikrobiyolojik analizler yerine kullanılması mümkündür (Leonard *et al.*, 2003).

2.5.2 İmmün sistem uyumluluğu

Protein ilaçları, hayvan modellerinde ve klinik denemelerde test edildiğinde amaç, güvenliğin ve etkinliğin belirlenmesidir. Proteinlerin tedavi amacıyla kullanılmasında hedef, immün tepkinin artırılmasıdır. Protein bazlı ilaca karşı ortaya çıkan antitadiler, ilacın biyolojik aktivitesini artırabilir. SPR ve elipsometri temelli sensörler ile, tedavi amaçlı kullanılacak antitadilerin veya diğer proteinlerin karakterizasyonu da hızlı ve doğru bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Leonard *et al.*, 2003).

2.5.3 Proteomik

SPR ve elipsometri esaslı biyosensörlerin proteomik araştırmalarında kullanıldığı üç temel konu mevcuttur: (i) tepkenlerin karakterizasyonu ve seçilmesi; (ii) diğer tekniklerle belirlenen veya tahmin edilen bağlanma spesifikliğinin belirlenmesi/doğrulanması; (iii) yeni bağlanma çiftlerinin bulunması.

SPR sensörler, tepkenlerin seçilmesi, protein veya protein komplekslerinin belirlenmesi veya yakalanmasında kullanılacak olan aptamer ve antitadilerin seçilmesi ve karakterizasyonu basamağında kullanıma uygundur (Karlsson, 2004).

Ayrıca, bağlanma seçiciliğinin doğrulanması çalışmalarında SPR kullanılabilir. Bu kapsamda proteinler, ilaç matrisine tutturularak incelenmektedirler. Yeni bağlanma çiftlerinin belirlenmesi aşamasında ise eş zamanlı olarak bağlanmayı izleyebilme ve seçim yöntemi ile farklı çiftlerin yüzeye bağlanma afinitesinin belirlenmesi amacıyla, SPR biyosensörler kullanılmaktadır (Karlsson, 2004).

SPR sensörleri ile elipsometrik sensörler özellikle ilaç seçiminde, hedef moleküller ile biyofarmakotik ürünlerin etkileşimlerinin karakterizasyonunda kullanılır. SPR biyosensörleri molekülün fonksiyonelliği ile ilişkili olan moleküllerin bağlanma aktivitesinin doğrudan gözlemlenebileceği bir sensördür. Ligand-reseptör etkileşimlerinin kinetik ve termodinamik parametrelerini belirlemek birçok analiz sisteminin hazırlanmasında önemli bilgi sağlar.

2.5.4. Küçük moleküllerin tayini

SPR ve elipsometri esaslı detektörlerin duyarlılığı, analitin optik dielektrik sabitlerine (ve kırılma indisine) bağlı olduğundan özellikle proteinler ve oligonükleotidlerde kırılma indisi de kütleli birikime bağlı olduğundan, bu türlerin analizi için özellikle uygundur. Genellikle 500 Da'dan küçük moleküllerin tayini de başarıyla gerçekleştirilebilir (Georgiadis *et al.*, 2000).

2.5.5 Yüksek çözünürlükte seçim

SPR ve elipsometri teknolojisinde etiketlemeye ihtiyaç duyulmaması, küçük moleküllerin seçiminde de bu yöntemi uygun hale getirmektedir. Bazı ticari SPR sistemlerinde 96 kuyucuklu standart analiz sistemleri kullanılmakta ve tipik olarak bir cihazla 100-400 analiz/gün yapılabilmektedir (Elkind *et al.*, 1999). Bu analiz miktarı, seçim analizleri için uygun bir değerdir. Denge esaslı analizlere oranla, SPR'ın ve elipsometrinin kompleks oluşumuna dair kinetik bilgi verebilmesi de, benzer afinitelere ancak farklı kinetik yollara sahip iki molekülün seçiminde kullanılabilecek bir avantajdır. Ayrıca çözücü etkileşimlerinin eş zamanlı olarak izlenebilmesi, çözücü seçimini de kolaylaştırmaktadır (Wang *et al.*, 2004).

2.5.6 Analizin doğrulanması

Normal laboratuvar koşullarında kullanılan denge bazlı rutin analizlerin, SPR ve elipsometri analizlerine göre daha duyarlı olduğu düşünülse de tayin sınırı ve

algılama açısından bu sensörler geleneksel analiz yöntemlerinden daha duyarlıdır. Ayrıca spesifik olmayan bağlanmaları belirleyebilecek farklı problemlerin aynı SPR veya elipsometri sisteminde kullanılabilmesi için daha doğru analiz gerçekleştirebilmekte, hatta rutin yöntemler doğrulanabilmektedir (Kowazumi *et al.*, 2002).

2.5.7. Spesifik olmayan etkileşimlerin belirlenmesi

Spesifik olmayan etkileşimler, spesifik etkileşimlerin belirlendiği şekilde belirlenir. Seçim sırasında birincil etkileşim için seçilen çiftler ile diğer çiftlerin etkileşimleri tek bir sensör üzerinde aynı şartlarda incelendiğinde spesifiklik ve spesifik olmayan durum hakkında bilgi elde edilebilir (Jiang *et al.*, 2005).

2.5.8. Yalnızca SPR'a yönelik uygulamalar

2.5.8.1 Oligonükleotid esaslı uygulamalar

Tiyol modifiye edilmiş oligonükleotid problemlerin altın yüzeyine doğrudan immobilize edilmesiyle SPR sensör uygulamaları hakkında yayınlar mevcuttur (Wang *et al.*, 2004). Wang ve ark. (2004), tiyol modifiye edilmiş sentetik oligonükleotidleri doğrudan ve biyotinlenmiş oligonükleotidleri streptavidin kaplanmış dekstran sensör yüzeyine immobilize ederek iki farklı SPR sistemleri (Spreeta ve Biacore) ile karşılaştırma yapmışlardır. Seçicilik, duyarlık, tekrarlanabilirlik ve analiz zamanı açısından doğrudan immobilizasyon yönteminin etkin bir yol olduğu gösterilmiştir.

Daha karmaşık etkileşim sistemlerinin SPR ile incelenip incelenmeyeceği hakkında yapılan bir çalışmada protein-oligonükleotid etkileşimi incelenmiştir (Tsai, 2004). Çeşitli bağlanma basamakları ve dinamik konformasyonel değişimlerin gerçekleştiği bu tür etkileşimlerde, SPR yüzeyinde bağlanma hızının çözeltideki bağlanma hızından bir kaç kat daha yavaş olduğu görülmüştür. Yine de SPR biyosensör ile protein-DNA etkileşiminde tek baz farkının belirlenebilmesi gibi moleküler tanımlarda hassas bir yöntem olabileceği görülmüştür (Tsai, 2004)

Genetik modifiye organizmaların tayini için immobilize prob ile komplementer eşleşiminin etkileşiminin incelendiği bir çalışmada; GMO düzenleyici transekspresyon genomuna 35S başlatıcı ve NOS sonlandırıcı sekansı eklenmiş mutasyonu tanımaya yönelik araştırmalar yapılmıştır (Mariotti *et al.*, 2002)

Mutasyon belirlemeye yönelik olarak, Spreeta SPR sensörünün kullanıldığı bir başka çalışmada ise; TP53 mutasyonunun 26 mer'lik komplementer, non-komplementer ve tek baz mutasyon tanısı gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada tek baz mutasyonunun SPR sensör ile belirlenebildiği rapor edilmiştir (Jiang *et al.*, 2005).

Oligonükleotid problemlerin kullanıldığı SPR sistemleri *E.Coli*, *Salmonella yphimurium* ve *S.Entertidis* gibi bakterilerin spesifik DNA sekansları, PCR (Polymerase Chain Reaction) ürünü kullanılarak uygulanabilmektedir (Miyachi *et al.*, 2000).

2.5.8.2. SPR hassasiyetini artırmaya yönelik uygulamalar

SPR, optik sabitlerin değişimine duyarlı olduğundan, izotropik dielektrik sabitindeki küçük değişimler SPR ile belirlenebilir. Örneğin; iletken bir polimerin SPR yüzeyine immobilizasyonu, kütleli birikimden çok iletkenlik değişimine bağlı bir sinyal üretir ve bu çok küçük değişimlerin algılanmasını mümkün kılar (Georgiadis *et al.*, 2000).

SPR sensör tepkisinin artırılması ile ilgili çeşitli çalışmalar mevcuttur. Örneğin iki diyet lazerin kullanılması ile iki ayrı dalga boyunda elde edilen rezonans farklarından yola çıkılarak sukroz kalibrasyonunda $\Delta n=5 \times 10^{-6}$ mertebesinde bir mutlak duyarlılık elde edilmiştir (Zybin *et al.*, 2005).

Kuvars kristal mikrobals (QCM) yöntemine alternatif olan SPR, tekrarlanabilirliği yüksek ve sıcaklık dalgalanmalarına ve mekanik düzensizliklere QCM'e oranla daha az duyarlıdır. Algılama sınırının artırılması SPR sensörlerinde asıl amaçlardan birisidir. Sistem tepkisini ve dolayısıyla algılama sınırını artırma stratejilerinden ilki, tanı moleküllerinin geniş bir matris içerisine immobilize edilmesi ile serbest kalan tanı molekülü sayısını arttırmak ve immobilizasyon prosedürlerini optimize etmektir. İkinci strateji, plazmon tabakasını modifiye etmek yoluyla sensör algılama sınırının artırılmasıdır. Örneğin Ag/Au ikili metal tabakasının kullanılması ile daha keskin bir rezonans piki elde edilir (bu daha duyarlı SPR anlamına gelir).

Bu şekilde hem Ag ile elde edilen hassasiyet, hem de Au ile elde edilen kararlılık bir çipte sağlanmış olur. Üçüncü strateji ise, yüzey plazmon rezonansını veya rezonanstaki kaymayı belirlemek için farklı algılama yöntemleri uygulamak ve veri analizinde farklı yaklaşımlar kullanmaktır. Örneğin, rezonans pikinin yakınlarında ışıpta oluşan faz kaymasının incelenmesi, elipsometrik uygulamanın bir benzeri olup sensör duyarlılığının yüksek olmasını sağlar. En basit faz temelli yaklaşım, mikroskopi uygulamalarına benzer karanlık alan uygulamasıdır. Bu işlem SPR görüntülemeye yüksek kontrast sağlar. İkinci bir faz temelli yaklaşım ise bir referans ışınla SPR ışını arasındaki faz farkının ölçülmesi ile faz farkı davranışının gözlenmesidir. Sıcaklık dalgalanmaları ölçümlere etki etmediği sürece beklenen tayin sınırı 4×10^{-8} RIU'tir (Elkind *et al.*, 1999).

Açı modülasyonlu SPR'da açığa bağlı refrektans kritik açıdan, rezonans açısından daha yüksek değerlere kadar olan geniş bir açı aralığında ölçülür ve oldukça geniş bir kırılma indisi aralığını kapsar. Açı modülasyonunun Fresnel eşitliğine uygulanması ile organik tabakanın kalınlığı ve optik özellikleri hesaplanabilir. Açı modülasyonu prizmanın veya ışık kaynağının açısının değiştirilmesi ile sağlanabilir. Mekanik hareket nedeniyle ölçüm noktasından sapma, diyot dizileri ile önlenir. Ancak diyot dizisi yerine iki hücreli fotodetektör kullanımı, SPR çözünürlüğünü artırır. Ancak bu kez açı sınırlaması ile karşılaşılır.

Çoğu SPR cihazında paralel monokromatik ışın kullanılır. Ölçüm yapılacak açı rezonans açısından biraz daha düşük olan bir açığa kaydırılır, böylece analiz sırasında daha yüksek açılara kayan SPR minimumu sonucu, ışık şiddeti oransal olarak değişir. Işık şiddetindeki değişim dizi halinde ya da matris şeklindeki ışık duyarlı elemanlar ile ölçülerek, her bir spota karşılık gelen şiddet değişimleri belirlenir.

Açı modülasyonu tekniğinde farklı ve geliştirmeye uygun bazı uygulamalar da mevcuttur. Örneğin bir piezoelektrik hareket ettirici yardımıyla geliş açısının küçük aralıklarda modüle edilmesi ile rezonans bölgesinin sağında ve solunda şiddet değişimleri hızlıca alınır. Dalga boyu modülasyonunda ise monokromatik filtreler ve polikromatik ışık kaynağı kullanılır. Yüksek maliyetli olan bu sistemin duyarlılığı yüksek olsa da büyüklük açısından açı modülasyonlu SPR'lerden daha kaba bir

yapıya sahiptir. Ancak ayarlanabilir akusto-optik filtreler kullanılarak, gelen ışığın dalga boyunun ayarlandığı sistemler mevcuttur.

Açı modülasyonlu sistemlerde SPR minimumunun bulunması için prizma ve detektörün hareket ettirilmesi gerekir. Ancak sabit açıda ölçüm daha basit cihazların yapılabilmesini sağlar ve ölçüm hızını artırır. Teorik veri ile sabit açı ile ölçme yapabilen bir SPR kullanarak yapılan çalışmada rezonans açısından daha düşük bir açıda ölçüm almak yeterli duyarlılıkta sonuçlar vermiştir. Ancak, SPR açısından daha yüksek bir açı seçilerek, sabit açıda ölçme yapıldığında dalga formunun polaritesi değişiklik gösterir ve R_{min} 'e benzer sonuçlar elde edilemez (Nakagawa *et al.*, 2005).

Spesifik olmayan etkileşimlerin incelenmesi için en uygun yöntem kendisinden referans hücrelerine sahip yongalardır. Kanal ayrımlı referansta, referans kanalı ile deney kanalı arasında olabilecek farklar ölçüm sonuçlarında hataya neden olabilir. Aynı yonga üzerinde iki farklı alan kullanılıp, bunlar uygun bir şekilde fonksiyonelleştirilirse, alanlardan biri analiz için kullanılırken diğeri referans alan olarak kullanılabilir. Boozer ve ark. (2003) altın kaplı slaydın bir kısmına Ta_2O_5 tabakası kaplayarak dalga boyu modülasyonlu sistemde iki ayrı SPR dibi elde etmiş ve farklı maskeleyme teknikleri kullanarak bu bölgeleri farklı şekilde fonksiyonelleştirerek, biri referans diğeri analiz hücresi olan iki hücre elde etmişlerdir (Boozer *et al.*, 2003).

2.5.8.3 Çoklu analiz sistemleri (array)

SPR ile görüntüleme tekniği ile aynı anda birden fazla spota immobilize edilmiş oligonükleotid problemlerde hibridizasyon başarı ile gerçekleştirilmiş ve 2nM'lık alt sınırdaki eşleşmeler bulunabilmiştir (Nelson *et al.*, 2001)

Thiel ve ark. (1997) çoklu array sistemlerinde selektif olmayan bağlanmayı belirlemek için uyguladıkları, sensör yüzeyinin ısıtılması ile zayıf bağlanmaların uzaklaştırılması işlemi oligonükleotid sensörler için oldukça kullanışlı bir hata indirgeme yöntemi olmuştur.

4 kanallı bir SPR sisteminde, benzo(o)piren ve 2-hidroksibifenilin seçimli analizi başarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu SPR tekniğinin küçük moleküllerin tayininde kullanılabileceğini göstermiştir (Kowazumi *et al.*, 2005).

Protein esaslı sensörlerde, antijen-antibadi etkileşimlerini gerçek zamanlı ölçen çok kanallı SPR esaslı sensörler, modifiye antibadilerin karakterizasyonu için kullanılmıştır (Alftan, 1998). Örneğin fare IgG'si için otomatik bir analiz sistemi, kompakt bir SPR sistemi olan Spreeta (R) kullanılarak gerçekleştirilmiş ve $1,8 \times 10^{-7}$ RIU'lık bir gürültü seviyesi elde edilmiştir (Chinowsky *et al.*, 2003). Biotin/avidin-antibadi (21 pg/mm² tayin sınırı) analizi (Wheelan *et al.*, 2002), kiretain-kinaz MB (CK-MB), dinitrofenol glisin analizi ve trinitro toluen analizi (Elkind *et al.*, 1999), altına bağlanan polipeptide, protein A bağlanması ve bunların alkentiyol kullanılarak oluşturulan analiz sistemi ile karşılaştırılması (Woodbury, 1998) gibi antibadi-protein uygulama örnekleri de mevcuttur.

Küçük ve taşınabilir SPR sensörlerinde (Spreeta ®) bakteri tayini ile ilgili örnekler mevcuttur. Bu çalışmalarda oligonükleotid probalar kullanılmıştır. Çalışılan bakteri türlerine *Escherichia coli* (Spangler *et al.*, 2001), *Listeria monocytogues* (Leonard *et al.*, 2004), *Pseudomonas aeruginosa* (Jenkins *et al.*, 2004), *Salmonella typhimurium* (Oh *et al.*, 2004), *Legionella penumephi* (Oh *et al.*, 2003) verilebilir. Bu sensörlerde çok kanallı sistemler kullanılmasına rağmen, kanallar tek analiz kanalı ve tek referans kanalı olarak ayrılmışlardır.

2.6. Elipsometre ve SPR Sistemlerinin Avantajları

2.6.1 Elipsometrik sistemlerin avantajları

Biyolojik uygulamalarda elipsometrenin birçok avantajı vardır. En önemli avantajı floresan veya radyoimmünolojik ölçümlerdeki gibi bir etikete ihtiyaç yoktur. Katı/sıvı ara yüzeyinde yüzey seçiciliği korunarak (proteinlerde olduğu gibi) nanometre altı çözünürlükte kalınlık değişimi incelenebilir. Ayrıca *in-situ* ölçüm, bağlanma kinetiklerinin belirlenmesine yeterli, neredeyse eş zamanlı hale yakın veri elde edilmesini sağlar. *Ex-situ* ölçümlerde sorun, biyomoleküllerin

denatürasyonu ve yıkama esnasında yüzeye bağlı moleküllerin desorpsiyonudur. Bu işlemde hata payı oldukça yüksektir. *In-situ* çalışmalarda ise denge yerine bağlanma kinetikleri de incelenerek etkileşim hakkında daha ayrıntılı bilgi elde edilebilir. Ancak, bu noktada sorun, difüzyon sınırlamaları nedeniyle ölçülen hızının kütle aktarım hızına bağlı olmasıdır (Arwin, 2000).

2.6.2. SPR sistemlerinin avantajları

Diğer etkileşim teknolojilerine oranla, moleküler etkileşimin karakterize edilmesi konusunda SPR biyosensörler önemli avantajlara sahiptirler (Rich ve Myszka, 2000).

- Etiket kullanımı gerekmemesi nedeniyle neredeyse bütün biyomoleküler sistemlerin incelenmesinde kullanılabilir.
- SPR cihazları ile bağlanma reaksiyonları gerçek zamanlı olarak karakterize edilebilir ve bu nedenle bağlanma sırasında hızlı ve kantitatif bilgi elde edilir.
- Dengedeki oluşan kompleks miktarı, bağlanmamış kimyasal ortamdan uzaklaştırılmadan ve reaksiyon dengesine zarar verilmeden ölçülebilir.
- İmmobilize edilen ligandın kararlılığı yüzeyin bağlanma kapasitesi ve zemin sinyali kararlılığı kontrol edilerek izlenebilir.
- SPR teknolojisi, seçim ve etkileşimleri incelemek için biyofiziksel bir araç olarak kalitatif amaçlı da kullanılabilir.
- Aynı anda farklı yüzeylerde oluşan etkileşim incelenerek farklı ligandlar ve kontrol yüzeylerine karşı etkileşim doğrudan değerlendirilebilir.
- Otomatik cihazlar kullanıcının zaman harcamadan, tekrarlanabilir deneyler yapmasını sağlar.
- Tipik analizlerde kullanılması gereken madde miktarı düşüktür (örneğin tek bir yüzey hazırlamak için yaklaşık 1 µg protein ligandı gerekir).
- Deneyler, DMSO gibi, sulu tampon sistemlerde düşük çözünürlüğe sahip bileşiklerle çalışırken gereken organik çözücüler içeren tamponlar kullanılarak gerçekleştirilebilir.

2.7. Sensör Yüzeylerinin Modifiye Edilmesi

2.7.1. İmmobilizasyon yöntemleri

SPR esaslı immünoanaliz sisteminin seçiciliği, metal film yüzeyine immobilize edilen biyolojik tanı elemanı ile sağlanır (antibadi veya antijen). Tanı elemanlarının yüzeye başarılı bir şekilde immobilize edilmesi oldukça önemlidir. Özellikle doğrudan metal yüzeyine immobilize edilen bazı proteinlerin formlarını kaybederek denatüre oldukları ve fonksiyonelliklerini yitirdikleri bilinmektedir (Geades *et al.*, 1994). Ayrıca, antibadilerin bağlanma yönelimi ile bağlanma etkinliği, erişebilirlik veya sterik engellemeler nedeniyle kontrol edilemeyebilir (Lu *et al.*, 1996). İmmünoanaliz sistemleri için çeşitli immobilizasyon teknikleri mevcuttur.

2.7.2 Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar

Küçük moleküllerin doğrudan düzenlenmesi sonucu büyük moleküllerin meydana gelmesi (örneğin; protein sentezi) ya da substrat molekülleri üzerine atomların veya moleküllerin adsorpsiyonu kendiliğinden düzenlenmeye dayanmaktadır. Bu işlemde, moleküller kendi aralarında etkileşimde bulunurlar. Zayıf ve tersinir olan bu etkileşimler belli bir denge kurulana kadar devam etmektedir (Poole ve Owens, 2003).

Kendiliğinden düzenlenme işleminin avantajlarını ve prensiplerini en iyi tanımlayan model sistemler “kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar”dır (Wilber, 1999). Eski bir kendiliğinden düzenlenme yöntemi olan Langmuir-Blodgett tekniği, geçmişte optik kaplamalarda, biyosensörlerde, antikorlarda ve enzimlerde kullanılmıştır. 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. Diğer yandan, metal yüzeyler üzerinde hazırlanan kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ise oldukça kararlı, kolay hazırlanabilen ve geniş kullanım alanlarına sahip malzemelerdir (Love, 2005; Wilber, 1999).

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ve çoklu tabakalar farklı metalik ve inorganik substratlar (örneğin, Ag, Au, Cu, Ge, Pt, Si, GaAs, SiO₂ gibi malzemeler) kullanılarak hazırlanabilir. Bu kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar, alkanetiyoller (R-SH), sülfidler (R-S-R'), disülfidler (R-S-S-R'), asitler (R-COOH), ve siloksanlar (R-SiOR₃) gibi ligandlar ya da moleküllerin yüzeyler üzerine bağlanmaları ile oluşurlar. Tiyollerin, sülfidlerin ve disülfidlerin yüzeyler üzerine bağlanması sülfür atomları yardımı ile olur. Bu gruplar altın yüzeyler üzerine RS-Au şeklinde tutunurlar (Smith, 2004).

Kendiliğinden düzenlenmenin anlaşılması ve buna bağlı olarak uygulamaları altın yüzeyler üzerine n-alkildisülfidlerin adsorpsiyonundan beri üzerinde önemle durulan bir konudur. Kendiliğinden düzenlenme ile oluşan tek tabakalar, birçok uygulama alanına sahiptirler. Bu uygulama alanlarına örnek olarak moleküler ve biyomoleküler tanıma, elektrot modifikasyonları, korozyondan koruma v.b. verilebilir. Yüksek derecede düzenlenmiş yapıların moleküler düzenlenme kavramı yeni değildir. Moleküler düzenlenmeye ait örnekler Biyoloji, Kimya ve Fizik gibi bilim dallarının içerisinde incelenmektedir (Love, 2005).

Kendiliğinden düzenlenme işleminin nasıl gerçekleştiği sorusu bilim adamlarının üzerinde yoğunlukla çalıştıkları bir konudur. Çünkü doğanın ve yaşamın nasıl devam ettiği bu sorunun cevabı içinde saklıdır. Bilim adamları doğayı taklit ederek bu işlemi açıklamaya çalışmaktadırlar. Kendiliğinden düzenlenme işlemi, substrat (katı yüzey) ile yüzey üzerine adsorbe olan molekül arasındaki kimyasal etkileşimlerle oluşmaktadır. Adsorbe olan moleküller ile yüzey arasındaki etkileşimin kuvveti ve tipi düzenlenmeyi etkiler. Fiziksel etkileşim entalpisi ($\Delta H < 41,8$ kJ, özellikle Van der Waals kuvvetleri) kimyasal bağlanma entalpisinden düşüktür ($\Delta H > 41,8$ kJ). Moleküllerin kendi aralarındaki ve moleküller ile yüzey arasındaki etkileşim kuvveti; hidrojen bağlarına, donör/akseptör veya iyon çiftlerine ve kovalent bağların düzenlenmesine bağlıdır. Kimyasal bağlanma bu nedenle fiziksel etkileşimden daha kararlı ve kuvvetlidir (Smith, 2004).

Kimyasal bağlanma olan sistemlerde; SiO₂ yüzeylerde trialkil, triklor ya da trialkoksisilan; Al₂O₃ ve Ag yüzeylerde karboksilik asitler ve altın yüzeyler de ise n-alkentiyoller yoğun olarak kullanılmaktadır.

Özellikle kendiliğinden düzenlenmiş tek tabaka (SAM) çalışmalarında iletken metal yüzeylere (Au, Ag v.b.) yüzey aktif maddeler ve elektronca zengin baş gruplara sahip (S, O, N v.b.) moleküller ile n-alkil zincirler kolaylıkla bağlanabilirler. Çizelge 2.4’de SAM çalışmalarında kullanılan inorganik substratlar ve bu yüzeylere bağlanan fonksiyonel gruplar gösterilmiştir.

Kimyasal bağlanmada; yüzeye bağlanacak moleküller ile metal yüzeyler arasındaki etkileşim oldukça kuvvetlidir. Bu sebeple etkileşim oldukça karardır. Bir kendiliğinden düzenlenen tek tabaka sistemi için son fonksiyonel grup, yüzeyin genel hidrofobik yapısını, tutma (adhesive) karakterini ve reaktivlik özelliğini etkilediğinden oldukça önemlidir.

2.7.3. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakaların formasyonu

Bu konu üzerine yapılan çalışmalar tek tabaka oluşumunun kontrolünü ve anlaşılmasını amaçlanmaktadır. Bunun nedeni; farklı moleküller ile oluşan yüzeylerin davranışlarının ve düzenlenmesinin farklılık göstermesidir.

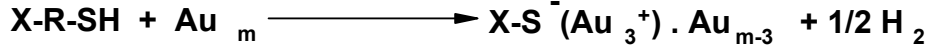
2.7.3.1. n-Alkantiyolatlar ile oluşan tek tabakalar

Altın yüzeyler üzerine n-alkantiyolatların kendiliğinden bağlanarak oluşturdukları tek tabakalar önemli bir araştırma konusudur. Altın yüzeyler üzerine iyi düzenlenmiş SAM’ler sülfür içeren (tiyol, sülfid ve disülfidler) maddeler kullanılarak kolaylıkla hazırlanabilir (Smith, 2004).

Çizelge 2.4- İnorganik substratlar üzerine kendiliğinden düzenlenme ile oluşan tekli ve çoklu tabakalar.

TEK TABAKALAR		
YÜZEY	LİGAND	BAĞLANMA
Au	RSH, ArSH (tiyoller)	RS-Au
Au	RSSR' (disülfidler)	RS-Au
Au	RSR' (sülfidler)	RS-Au
SiO ₂ , Cam	RSiCl ₃ , RSiOR ₃ '	Siloksan ağ
Si	[RCOO] ₂	R-Si
Si	RCH=CH ₂	R-CH ₂ CH ₂ -Si
GaAs	RSH	RS-GaAs
Ag	RSH, ArSH	RS-Ag
Cu	RSH, ArSH	RS-Cu
Metal oksitler	RCOOH	RCO ₂ -.....MO _n
Metal oksitler	RCONHOH	RCONHOH.....MO _n
Pt	RSH, ArSH	RCONHO-.....MO _n
Pt	RNC	RS-Pt
		RNC-Pt
ÇOKLU TABAKALAR		
YÜZEY	LİGAND	BAĞLANMA
SiO _x , Au, Ge	RPO ₃ ⁻ , Zr ⁺	İyonik çoklu tabakalar
Si/SiO ₂ , Au	Polielektrolitler,	İyonik çoklu tabakalar
SiO ₂	silikatlar	Siloksan ağ
Au, Cu, Ag	HO-R-SiCl ₃	Metal-ligand çoklu tabakalar
	RCOOH	
	HS-(CH ₂) _n COOH	

Alkantiyollerin ($X(CH_2)_nSH$) ve dialkildisülfidlerin ($X(CH_2)_nS-S(CH_2)_mY$) [gaz fazı veya sıvı fazdan] temiz bir altın yüzey üzerine kendiliğinden düzenlenerek tek tabaka oluşturmaları aşağıdaki olası reaksiyon mekanizması ile gösterilmektedir.



Yukarıda özetlenen mekanizma ve reaksiyon sonucunda gösterildiği gibi hidrojen gazı çıkışı tam olarak belirlenememiştir (Love, 2005).

Alkantiyoller kendiliğinden düzenlenen tek tabakalarda aşağıda belirtilen özelliklerinden dolayı sıklıkla kullanılırlar;

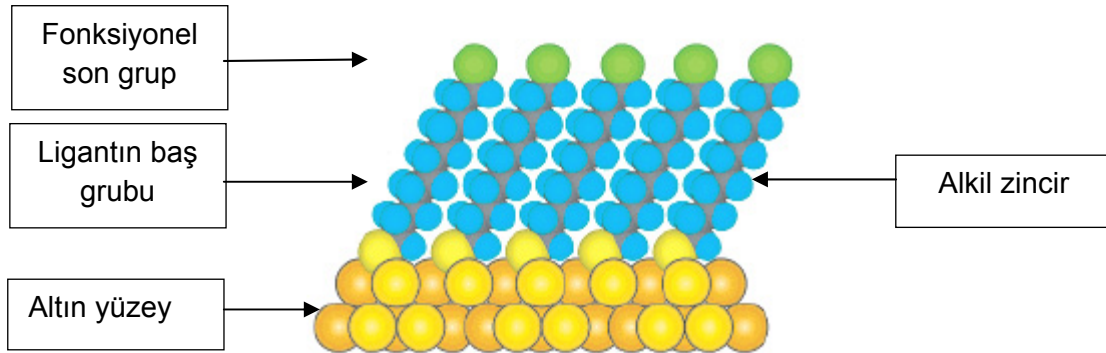
- i-) Disülfidlerden veya sülfidlerden çok daha iyi çözünürler,
- ii-) Birçok organik fonksiyonel gruplar ile uyumludurlar,
- iii-) Altın yüzeyler üzerine SAM hızları, disülfidlerden 1000 kat daha fazladır,
- iv-) Birçok tiyol ticari olarak elde edilebilmektedir,
- v-) Farklı fonksiyonel gruplar içeren karışık tek tabakalar iki farklı tiyolün yüzey üzerine ko-adsorpsiyonu ile hazırlanabilirler.

Bununla birlikte, altın yüzeyler üzerine alkanetiollerin kendiliğinden düzenlenmesinin iki önemli sınırlaması vardır. Bunlar;

- i-) Hazırlanan tek tabakalar 100 °C'un üzerinde kararsızdırlar,
- ii-) Altının Si kristaline difüzyon eğilimi vardır.

Düz ve parlatılmış silikon yüzeyler üzerine altın filmler genellikle elektron bombardımanı veya altının ısısal olarak buharlaştırılması sonucunda hazırlanabilirler. Aynı şekilde; bir cam, mika, titanyum ya da krom yüzeyler üzerine de altın filmler hazırlanabilir. Buharlaştırılarak hazırlanan altın filmlerin kalınlığı genellikle 5 ile 300 nm arasındadır. Substratın ışık geçirgenliği, elektrik iletkenliği ve yüzeyin ıslanabilirliği hazırlanan filmlerin kalınlıkları ile kontrol edilebilir. Yüzeyler üzerinde bulunan altın polikristalin yapıdadır ve yüzey pürüzlülüğü altın filmin kalınlığı ile artmaktadır (Love, 2005; Wilber, 1999).

Şekil 2.14'de gösterildiği gibi altın yüzeyler üzerine alkanetiyollerin kendiliğinden düzenlenmesi oldukça düzenli ve hemen hemen kristalin 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) (Love, 2005).



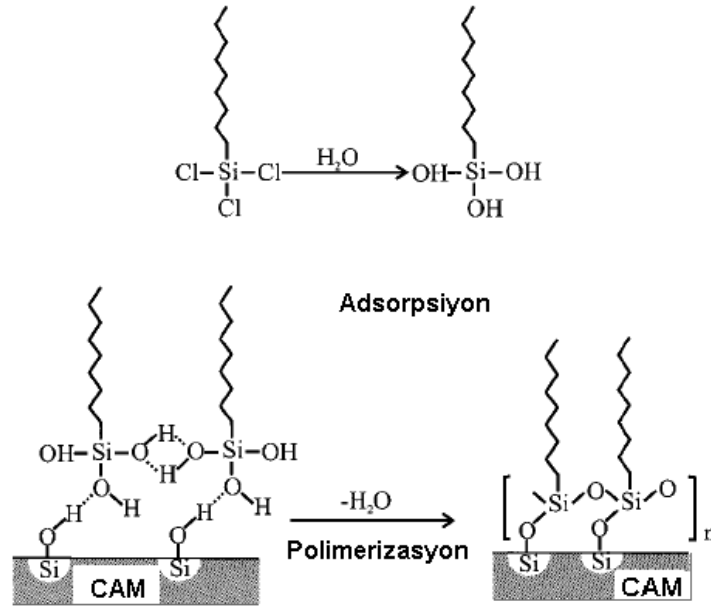
Şekil 2.14- Altın yüzeyler üzerine n-alkanetiyollerin kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakasının moleküler seviyedeki şematik gösterimi (Demirel, 2006).

2.7.3.2. SiO₂ yüzeyleri üzerine organosilanlar ile oluşturulan SAM'ler

SiO₂ yüzeyler üzerine organosilan moleküllerinin düzenlenmesi ile oluşan SAM'ler düzenlenmiş nano yapıların üretiminde önemli bir yere sahiptir. Organosilanlar genellikle, tetrahedral bir yapıya sahip olan silisyum (Si) atomunun üç yerine benzer fonksiyonel grupların (Alkoksi veya Klor) bağlanması ile oluşan yapılardır. Şekil 2.15'te cam yüzeyler üzerine trialkilsilanların kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi görülmektedir. Au-S etkileşimi çoğunlukla yük transferi ile gerçekleşirken SiO₂'de bu durum farklıdır. Burada SiO₂ yüzey üzerinde polisiloksan ile ince film kaplama ya da ıslak aşındırma ile -OH grupları oluşturulur. Bu işlemi takiben organosilan molekülleri yüzeye kovalent olarak bağlanır. Bu şekilde elde edilen tek tabakalar Au-S'den çok daha kararlıdır ve kimyasal grupların düzenlenmesi kendiliğinden gerçekleşir. Silikon oksit yüzeyler üzerine organik moleküllerden oluşturulan tek tabakalar mikroeletromekanik sistemler (MEMS) (Maboudian, 1998), mikroakışkanlar (Ho ve Tai 1998) ve biyoçip

düzenlenmesi (Southern *et al.*, 1994) gibi birçok teknolojiye önemli bir yere sahiptir. 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 (Major, 2001; Klaus *et al.*, 1997; Zhu ve Major, 1999). Daha sonra oksit yüzey (SiO₂) ile silanların Si-OH'ları arasında bir kondenzasyon reaksiyonunun meydana gelerek çapraz bağlı yüzey düzenlenmesinin gerçekleştiği söylenilebilir. Ancak, bu mekanizma tam olarak açık değildir. SiO₂ yüzeyler üzerine kendiliğinden oluşan tek tabakaların popülaritelerine rağmen su miktarı, sıcaklık ve substratdaki -OH gruplarının yoğunluğu gibi faktörler SAM'i olumsuz yönde etkiler (Major, 2001).



Şekil 2.15. Cam yüzey üzerine trialkilsilanların kendiliğinden düzenlenmesinin şematik gösterimi.

2.7.4 Alkentiollerin uygulanması

En uygun immobilizasyon yöntemi, biyolojik tanı elemanının metal film üzerine bir bağlantı tabakası yoluyla kovalent bağlanmasıdır. Bağlantı tabakası, yüzeyin bir sonraki adımda modifikasyonu için fonksiyonelleştirilmiş yapı sağlarken, protein ve diğer ligandların metal ile temasını engelleyecek bir bariyer oluşturur. Bu uzun zincirli ve uçları istenilen reaktif gruba sahip alkentiol moleküllerinin yüzeyde, kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (self assembled monolayers, SAM) oluşturmasıyla başılır. Alkentiollerin tiyol grubu altın yüzey ile kompleks oluşturur (Duschl *et al.*, 1996; Wink *et al.*, 1997). Kimyasal ve fiziksel olarak adsorplanmış alkentioller, alkentiolün çözücü içerisindeki nispi çözünürlüğü ile orantılı olan bir bağlanma kinetiği ile tek tabaka oluşturur (Peterlinkz *et al.*, 1996). Tanıma elemanı doğrudan, bu tek tabakalar üzerine bağlanabilir.

2.7.5. Hidrojel ile immobilizasyon

Karboksi-metillenmiş dekstran zincirlerinden (100-200 nm) oluşan bir hidrojel matris, üç boyutlu ve gözenekli bir bağlanma matrisi oluşturur. Metal yüzeye oranla immobilizasyon siteleri sayısı artar ve bu durumda sensör yüzeyinden alınan tepki de artar. Bu tür bir dekstran tabakasına, bilindik yöntemlerle çeşitli moleküller bağlamak mümkündür (Lafas ve Johnsson, 1990)

2.7.6. Silanlar

Alkentioller ile yapılan tek tabakalar, kontrollü koşullar altında oldukça kararlıdır. Ancak, bazı kimyasallar veya çevresel bazı etkilerle kararsızlaşması mümkündür (Geades *et al.*, 1994; Lu *et al.*, 1996). Bu durumda altın yüzeyine antibadilerin immobilizasyonunda organosilan bileşikleri kullanılabilir. Örneğin yüzey alfa-aminopropil trietoksisilan (alfa-APTES) ile fonksiyonelleştirilir ve ardından yüzeydeki amino grupları glutaraldehit ile antibadilerin immobilizasyonunda kullanılır (Sasaki *et al.*, 1998).

2.7.7 Polimer filmler

Proteinlerin denatüre olmasını önlemek ve immünoanaliz sırasında spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için altın yüzeyine polimer filmler uygulanabilir (Green *et al.*, 1997; Millat *et al.*, 1995). Polimer bağlayıcı tabakayı altın yüzeyine uygulamanın en başarılı yöntemlerinden birisi, ark boşalımı veya organik buhar plazması ile plazma polimerizasyon yöntemi uygulamaktır (Nakamura *et al.*, 1997; Weadburry *et al.*, 1998).

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE SONUÇLAR

Tez çalışmalarında optik esaslı biyosensör geliştirilmesi için, uygun yüzey seçimi, ligand – analit çiftleri, bu ligandların yüzeye immobilizasyonu, tek yongada birden fazla analiz yapabilmek için gerekler ile farklı “sensör duyarlılığını artırma” yöntemleri denenmiştir.

Çalışmalar ve sonuçları, tezin bundan sonraki kısmında bölümler halinde verilmiş olup; çalışmaya ait deneysel ayrıntılar ile sonuçlar aynı bölüm içerisinde sunulmuştur. Çalışmalar aşağıdaki sıra ile verilmiştir.

Bölüm 3.1’de, SPR sensöründe kullanılabilecek alternatif substrat/metal film ve ışık kaynağı seçimi için, Fresnel yansıma eşitliklerinin MATLAB ® yardımı ile çözülmesi sonucu elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır (Sayfa 53).

Bölüm 3.2’de, sensör yüzeylerinin modifikasyonu (substrat yüzeylerinin temizlenmesi ve kaplanması) ile ilgili optimizasyon çalışmaları yapılmıştır (Sayfa 70)

Bölüm 3.3’te, akışlı sistemlerde mikro-akışkan kanal yaklaşımı yerine, görüntülemeli SPR kullanılarak, bir yonga üzerinde birden fazla analizin aynı anda gerçekleştirilebilmesi için mikro-desenleme yöntemi olarak Ink-Jet litografi çalışmaları yapılmış ve bu çalışmalara ait sonuçlar verilmiştir (Sayfa 76)

Bölüm 3.4’te, alternatif mikro-desenleme yöntemi olarak fotolitografi çalışmaları yapılmış ve fotolitografik desenlemelerin optimizasyonu ile ilgili sonuçlar verilmiştir (Sayfa 83)

Bölüm 3.5’te, mikro-desenleme ile elde edilen SPR yongalarında elde edilen sinyal incelenerek, desenleme boyutunun etkisi incelenmiştir (Sayfa 87)

Bölüm 3.6’da, immobilizasyon tekniklerinin geliştirilmesi amacıyla, farklı çözücü ve etkileşim parametrelerinde kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakaların(SAM) formasyonu ile ilgili bir çalışma yapılmıştır (Sayfa 89)

Bölüm 3.7’de, biyomolekül immobilizasyonu için, tabaka üstü tabaka (layer by layer) formasyonu ile kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar üzerine farklı

fonksiyonellikte gruplar immobilize edilerek, bir IgG sensörün duyarlılığının artırılması amaçlı bir çalışma yapılmıştır (Sayfa 97).

Bölüm 3.8’de, alternatif optik sensör yöntemi olan elipsometri kullanılarak, oligonükleotid proba sahip yüzeyin sensör performansı değerlendirilmiştir. İmmobilizasyon sırasında kademeli tabaka üstü tabaka immobilizasyon tekniği kullanılmıştır (Sayfa 109).

Bölüm 3.9’da, farklı bir alternatif denenerek, elipsometrik sensör uygulamasında Au-nanopartikül kullanılarak, yüzeye immobilize edilen Au-nanopartikülün TIRE sensöründen alınan cevapta yapacağı muhtemel iyileştirme incelenmiştir. İmmobilizasyon tekniği olarak çok kademeli immobilizasyon ile kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar kullanılmıştır (Sayfa 121).

Bölüm 3.10’da, mikro-desenlenmiş yüzeyde oligonükleotid prob taşıyan SPR yongası hazırlanmış ve performansı değerlendirilmiştir (Sayfa 136).

Bölüm 3.11’de, iki optik sensör sisteminin (Yüzey plazmon rezonans, SPR ve içten tam yansımali elipsometri TIRE) bir arada kullanıldığı ve böylece sensör hassasiyetinin artırıldığı bir çalışma yapılmıştır. SPR ile güçlendirilmiş TIRE uygulaması (SPRe-TIRE) ile Cu^{2+} tayini için kullanılan yüzeyde bu kez immobilizasyon kendiliğinden düzenlenme yerine elektrokimyasal indirgeme ile gerçekleştirilmiştir (Sayfa 150).

3.1 Yüzey Plazmon Rezonans Sensör Yongasında Yansıma Tahmini İçin Matematik Modelleme

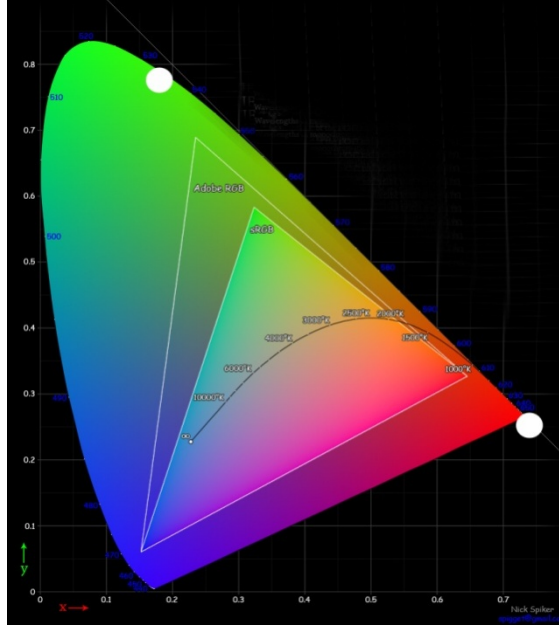
Fresnel'in yansıma eşitlikleri (Bölüm 2.2.5, Eşitlik 2.13 - Eşitlik 2.15), iterasyon ile çözüldüğünde düzenli kaplanmış ve optik olarak izotropik yüzeyler için beklenen SPR açısının, kullanılacak substrat cinsinin ve rezonansın oluşacağı metal özellik ve kalınlıklarının öngörülmesi mümkündür.

Çalışmanın bu bölümünde, Ek A'da verilen MATLAB rutini kullanılarak, kolay erişilebilen SF10 ve BK7 substratlar için, Ag ve Au kaplamalarındaki kalınlık değişiminin SPR açısına (bir başka deyişle grafiklerde Z eksenini olarak verilen yansıma oranına; 1= gelen ışığın tam yansıması; 0= gelen ışığın yansımaması) etkisi incelenmiştir. Elektromanyetik spektrumun (Şekil 3.1.1) farklı bölgelerinde ışık yapan lazer diyotlar temin edildiğinden, bu ışık kaynakları ile elde edilebilecek SPR eğrileri modelleme yolu ile hesaplanmıştır. Modelde farklı taban malzemelerin ve farklı metallerin kullanılması da mümkündür. Ayrıca yüzeydeki organik madde birikiminin düzenli olduğu durumlar için, analizde beklenen SPR kayması da tahmin edilebilmektedir. Bu bölümde verilen grafiklerde analiz ortamının kırılma indisi 25 °C'ta saf suyun kırılma indisi olarak alınmıştır ($n=1,3300$).

3.1.1 Üç tabaka için Fresnel eşitliklerinin çözümü

Cam prizma (çoklayıcı) γ , metal film μ ve dielektrik tabaka (sensör tabakası) ρ indisleri ile gösterildiğinde, gelen ışığın reflektansı (R) aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$R = \left| \frac{r_{\gamma\mu} + r_{\mu\rho} \exp 2ik_{\mu}d}{1 + r_{\gamma\mu}r_{\mu\rho} \exp 2ik_{\mu}d} \right|^2 \quad (3.1)$$



Şekil 3.1.1 – EM spektrumda görünür bölgede kullanılan lazerler, diğer lazerler görünür renk skalası dışındadır (grafiğin sağ alt köşesi)

Her bir tabakada ara yüzeye dik dalga vektörü bileşeni ise aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır;

$$k_j = \sqrt{\varepsilon_j \left(\frac{\omega}{c} \right)^2 - k_z^2}, \quad j = \gamma, \mu, \rho \text{ için} \quad (3.2)$$

Burada k_z , gelen ışığın ara yüzeye paralel dalga vektörü bileşenidir ve aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$k_z = \sqrt{\varepsilon_\gamma} \frac{\omega}{c} \sin \theta \quad (3.3)$$

Her bir ara yüzey için ayrı ayrı çözümlendiğinde, prizma – metal film tabakası ara yüzeyinden yansıma genliği Eşitlik 3.4’te, metal film – dielektrik tabakası ara yüzeyinden yansıma genliği ise Eşitlik 3.5’te verildiği gibi hesaplanır.

$$r_{\gamma\mu} = \frac{k_\gamma \varepsilon_\mu - k_\mu \varepsilon_\gamma}{k_\gamma \varepsilon_\mu + k_\mu \varepsilon_\gamma} \quad (3.4)$$

$$r_{\mu\rho} = \frac{k_{\mu}\varepsilon_{\rho} - k_{\rho}\varepsilon_{\mu}}{k_{\mu}\varepsilon_{\rho} + k_{\rho}\varepsilon_{\mu}} \quad (3.5)$$

Gelen ışığın açısal frekansı ω ise, d metal filmin kalınlığı, c ışığın vakumdaki hızı olmak üzere aşağıdaki bağıntıya göre hesaplanır ve gelen ışığın dalga boyunun bir fonksiyonudur.

$$\omega(\lambda) = \frac{2\pi c}{\lambda} \quad (3.6)$$

Dielektrik sabiti yerine kompleks kırılma indisi cinsinden R değerleri ise aşağıdaki gibi hesaplanır. Bir maddenin kompleks kırılma indisi $\tilde{N}$ aşağıdaki eşitlikle verilir: $\tilde{N} = n - ik$

$$(3.7)$$

Snell yasasının en genel formu Eşitlik 3.8'de belirtildiği gibidir ve kırılma fonksiyonunu gösterir.

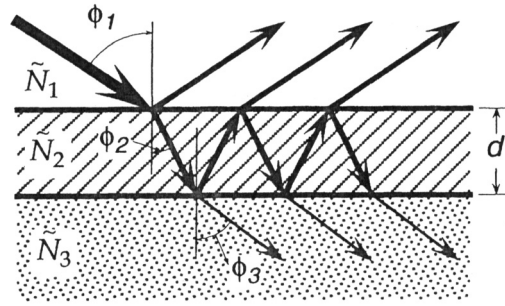
$$\tilde{N}_a \sin \phi_a = \tilde{N}_b \sin \phi_b \quad (3.8)$$

Yüzey plazmon rezonansının uyarılması için yalnızca p-polarize ışık dalgaları kullanıldığından, p-bileşeni için Frensel katsayısı Eşitlik 3.9'daki gibi yazılabilir:

$$r_{ab}^p = \frac{\tilde{N}_b \cos \phi_a - \tilde{N}_a \cos \phi_b}{\tilde{N}_b \cos \phi_a + \tilde{N}_a \cos \phi_b} \quad (3.9)$$

Çok tabakalı substrattan yansıyan ışık için toplam yansımaya katsayısı, Şekil 3.1.2'de görüldüğü gibi birden fazla yansımaya ve kırılma demetinin toplamıdır. Seri halinde yazılabilen ifade sonucu, tabakalardan bir faz faktörü ile geçen ışığın toplam yansımaya katsayısı Eşitlik 3.10'da verildiği gibi çözülebilir forma ulaşır (Tompkins ve McGahan, 1999).

$$R = \frac{r_{12} + r_{23} e^{-j2\beta}}{1 + r_{12} r_{23} e^{-j2\beta}} \quad (3.10)$$



Şekil 3.1.2 – Gelen ışığın tabaka ara yüzeylerinde kırılması ve yansıması.

Burada, $e^{-j2\beta}$ faz faktörüdür ve faz açısı veya film faz kalınlığı olarak bilinen β aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır:

$$\beta = 2\pi \left(\frac{d}{\lambda} \right) \tilde{N}_2 \cos \phi_2 \quad (3.11)$$

3.1.2 Teorik hesaplamalar ve sonuçlar

3.1.2.1 MATLAB® rutinin oluşturulması

MATLAB rutinde fiziksel katsayıların girilmesi ve hesaplanması; yansıma yüzeyindeki açılarının hesaplanması (Fresnel katsayılarının fonksiyonudur), Fresnel katsayılarının hesaplanması ve son olarak toplam yansıma katsayısının bulunması sonucu yansıyan ışık şiddetinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Ek A'da verilen MATLAB rutini için literatürden derlenmiş Au ve Ag (kullanılacak metal film) için dalga boyuna karşılık n ve k değerleri cinsinden kompleks kırılma indisi değerleri, rutinin ileriki aşamasında polinom denkleştirme (polynomial fitting) yolu ile farklı dalga boyunda n ve k sabitinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Tamamıyla kapalı (bir başka deyişle “implicit”) olan çözüm, MATLAB kullanılarak ve iterasyonda tek değişken değiştirilerek çözülebilmektedir. Rutin son olarak verileri matris formunda

ve grafiksel olarak sunmakta ve belirtilen adım genişliğine bağlı olarak istenilen hassasiyette, beklenen rezonans açısını (fonksiyonun minimumu olarak) ve bu açıdaki bağlı ışık yansıma şiddetini hesaplamaktadır. Sonuç ve tartışma kısmında verilen grafiklerde, tasarım amacı ile temin edilen diyot lazerlerin etkin dalga boyunda SF10 ve BK7 taban malzemede, Ag ve Au film için beklenen bağlı yansıma değişimleri, ışığın geliş açısının ve film kalınlığının bir fonksiyonu olarak verilmiştir. Monokromatör kullanmaksızın yapılan tasarımda tek dalga boylu lazerlerin kullanılması nedeniyle, yalnızca geliş açısının fonksiyonu olarak hesaplanan SPR eğrileri, aynı rutinin modifiye edilmesi halinde dalga boyunun fonksiyonu olarak da hesaplanabilir.

3.1.2.1 Kullanılan lazer dalga boyunun, SPR eğrilerine etkisi

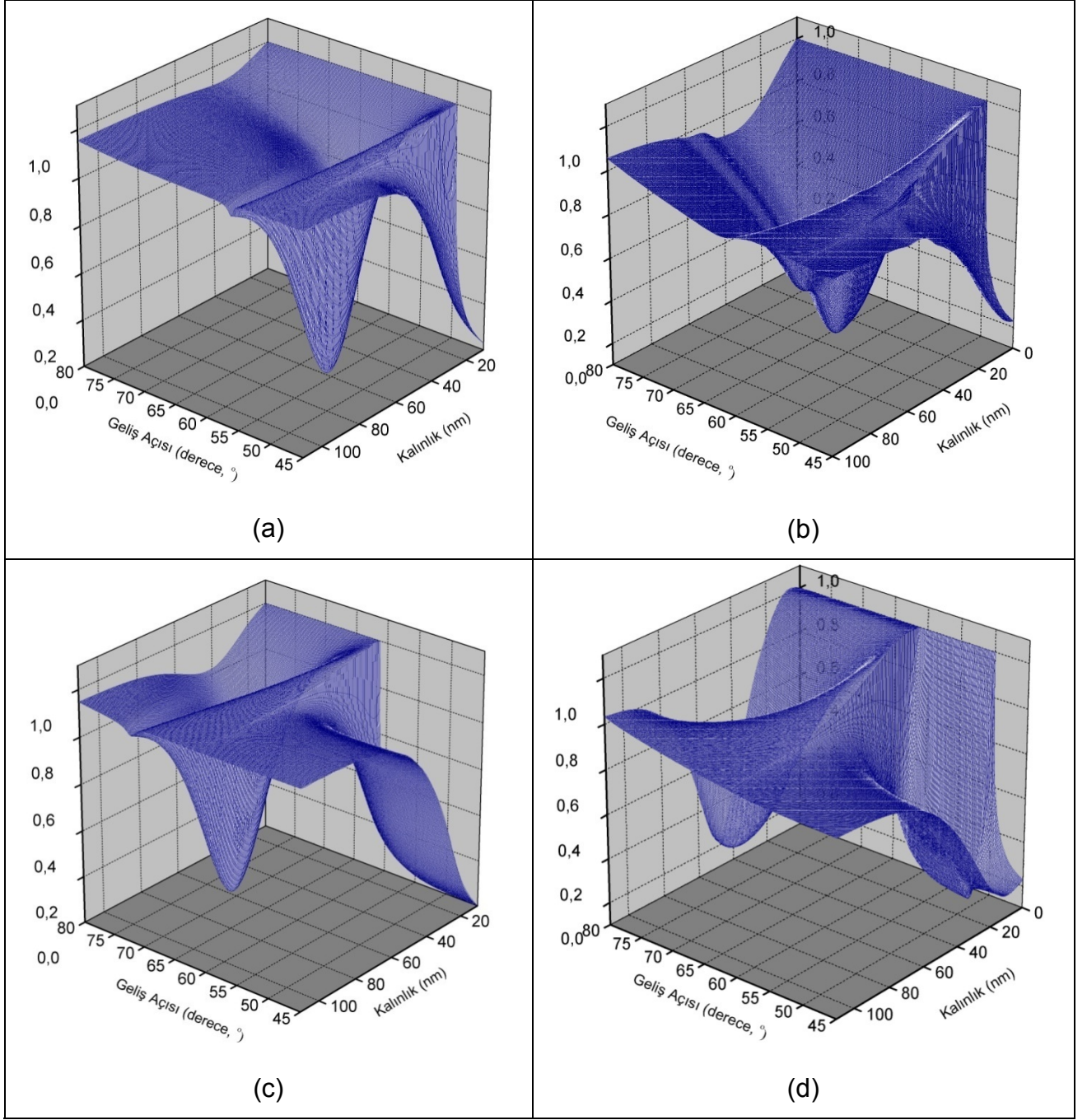
3.1.2.1.1 532 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

Şekil 3.1.3'te, sırasıyla SF10 substrat için Ag ve Au kaplı (a,b) ve BK7 substrat için Ag ve Au kaplı (c,d) yüzeylere ait SPR eğrileri verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, Ag film dar bir geliş açısında oldukça keskin bir SPR eğrisi vermektedir. SPR eğrisinin keskinliği, analizde inilebilecek alt sınırı da belirler. Ayrıca rezonans sonucu ışık şiddetinin aşırı derecede düşmesi (örneğin Şekil 3.1.3 a), özellikle ışık sensörü olarak CCD sensör kullanan sistemlerde bir avantajdır. Mevcut Nanofilm Nulling Elipsometre cihazında alınan SPR eğrileri SF10-Au film için birebir modelle örtüşmektedir. Modelde 32 nm Au film için $63,4^\circ$ geliş açısında alınan SPR çukuru, deneysel olarak 63° civarında görülmüştür. Ancak, elipsometri amacıyla kullanılan bir cihaz olduğundan ondalık hanesi kesin olarak gözlenememiştir. Verilerin sabit eğri gösteren kısmının bir eğriye uydurulması ile elde edilen ($R^2 > 0,99$) fonksiyonda minimum hesabı sonucu bulunan SPR çukuru $63,8^\circ$ olarak bulunmuştur. Teorik hesap ile bulunan verinin tamamen izotropik bir yüzeyi temsil ettiği ve kaplamaya ait bir kusur barındırmadığı unutulmamalıdır. Substrat ve filmde herhangi bir kusur bulunmaması durumunda, deneysel sonuçların model sonuçları ile mükemmel uyum sağladığı görülmüştür (Prabhu, 2000).

BK7 taban malzeme kullanıldığında her iki metal için SPR eğrilerinde dramatik değişikliklerin olduğu görülür. Grafiklerin sağ tarafında kalan ve köpekbalığı yüzgeci (shark fin) olarak adlandırılan kısım geliş açısının değiştirilebileceği aralık olan 45° ile 80° aralığında, daha yüksek geliş açılarına ulaşmış (tam yansıma bölgesi) ve SPR alınan açıyı oldukça daraltmıştır. Gümüş film için SPR'ın elde edildiği kalınlık (yaklaşık 60 nm Ag film) ve SPR eğrisinin keskinlikleri her iki substrat için yakın değerlerdedir. Ancak, altın film kaplı BK 7 substratta elde edilen SPR eğrisi, SF 10 taban malzemesinin aksine film kalınlığına daha az bağımlı olmuş ve minimum yansıma daha yüksek değerlere çıkmıştır. Ayrıca SPR'ın elde edildiği 80° 'lik geliş açısının gerek yüzeye düşen lazer ışınının saçılması olasılığı, gerekse görüntülemeli SPR uygulamasında yayılmış görüntü elde edilmesi nedeniyle uygun olmadığı unutulmamalıdır.

3.1.2.1.2 635 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

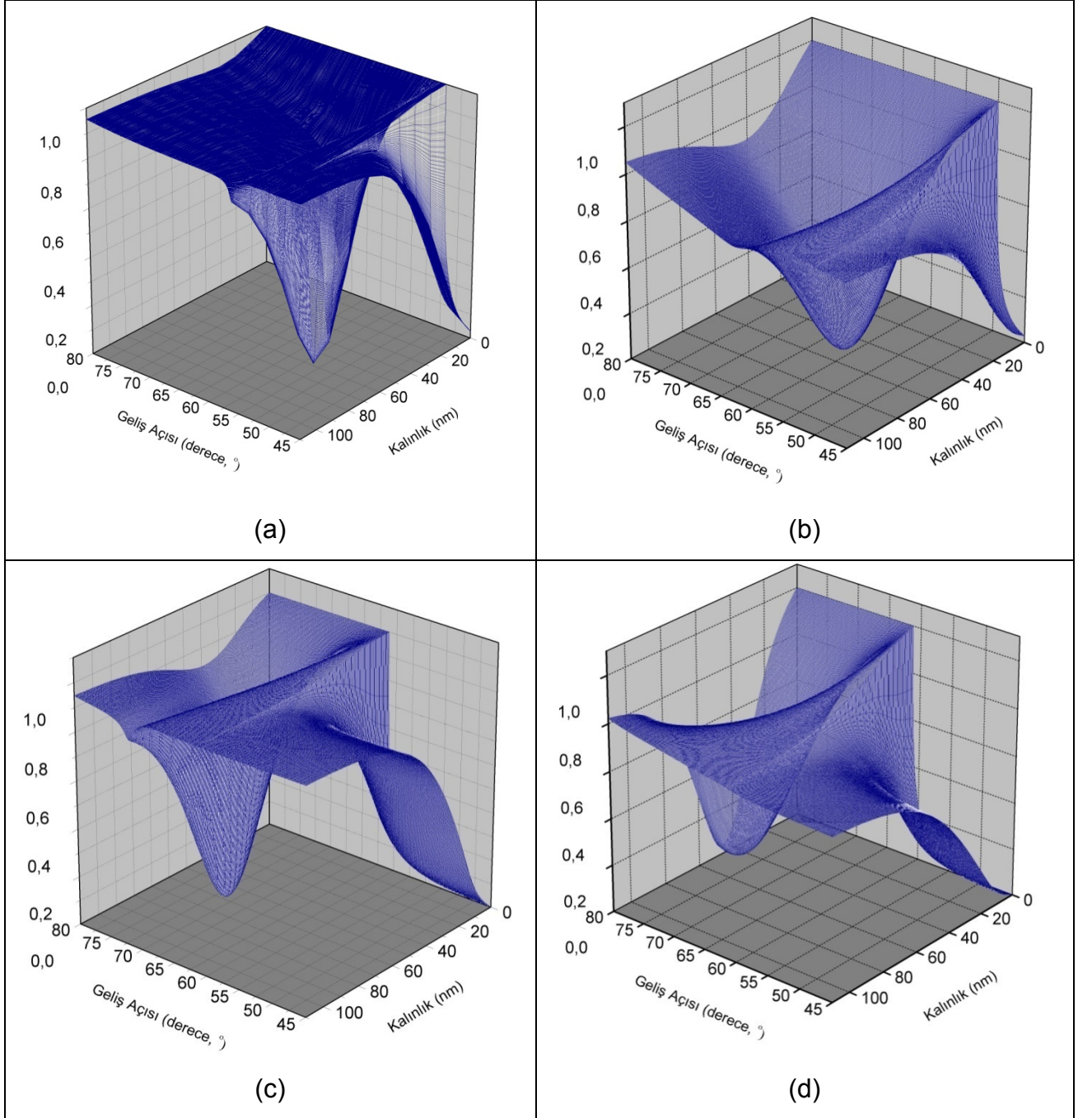
Birçok cihazda kullanılmakta olan 635 nm dalga boylu lazer diyotlar, güçlü ve ucuz olmaları nedeniyle tercih edilmektedir. Şekil 3.1.4'te, p-polarize ışık kaynağı olarak 635 nm dalga boyunun kullanılması ile hesaplanan SPR eğrileri verilmiştir. Şekil 3.1.4 a'da görüldüğü gibi bu dalga boyunda gümüş oldukça keskin (yaklaşık 50° geliş açısında, ve 80 nm ile 100 nm film kalınlığında) bir SPR eğrisi vermiştir. SPR'nin açığa bağımlılığının az olması, hassas analizlerin açı taraması yapılmadan gerçekleştirilebilmesini sağlarken; kalınlığa bağımlılığının az olması da, yeniden kullanımda aşınan yonga yüzeyinde bile tekrarlanabilir sonuçlar alınmasını sağlar.



Şekil 3.1.3 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (532 nm lazer için)

Dalga boyunun 532 nm'den 635 nm'ye çıkarılmasının en kayda değer sonucu, her iki metal için SPR elde edilecek film kalınlıklarının artmasıdır. SF10-Au film yapılandırması 532 nm sistemi ile karşılaştırıldığında; SPR eğrisinin film kalınlığına bağımlılığının azaldığı görülmektedir. Bu yapılandırmanın yonga üretiminde

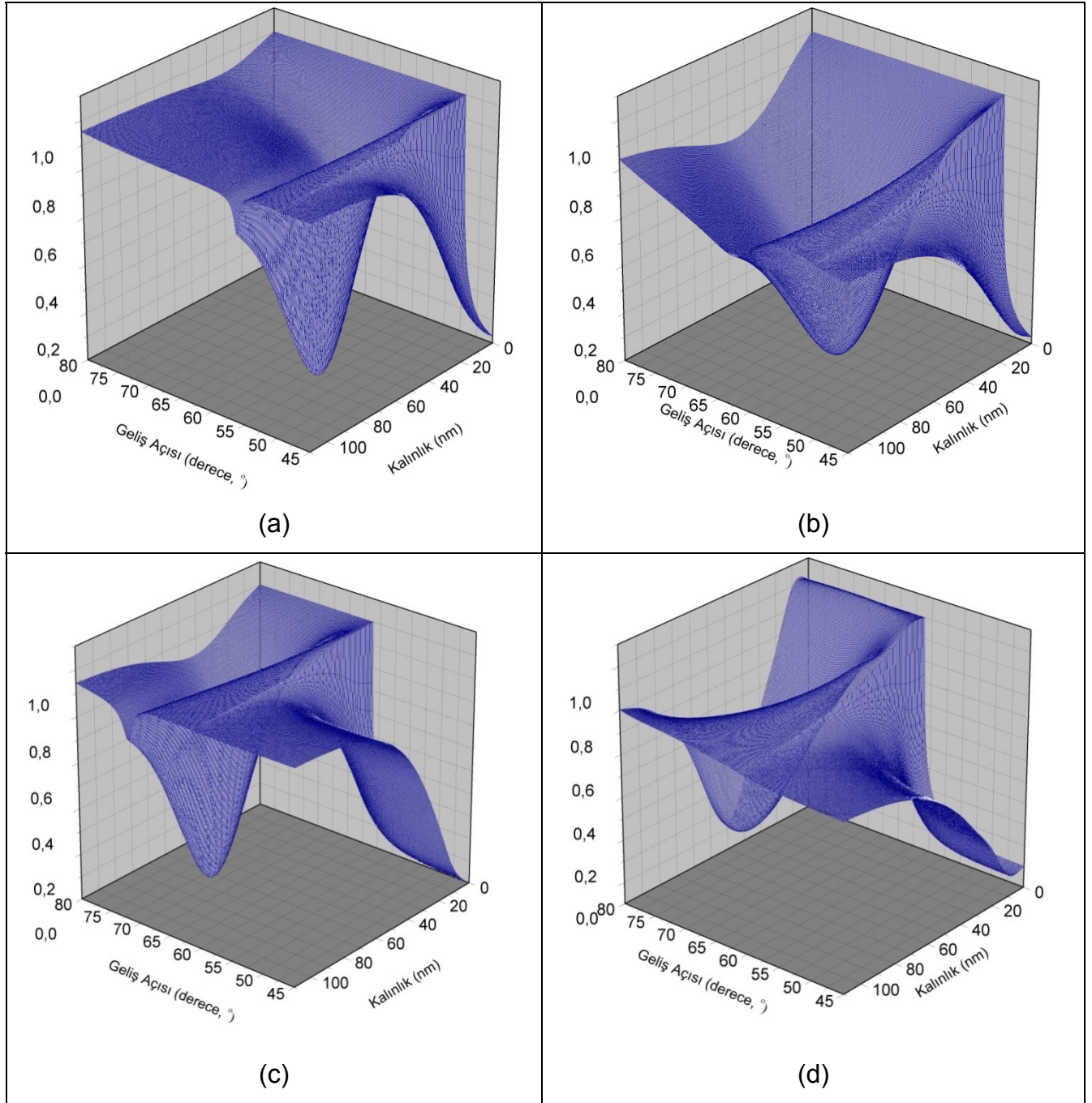
kullanılması açısından bir avantajdır. BK7 substrat kullanımı ile Au film ile makul açılarda SPR alınabilmektedir (70 ° ile 80 ° arası). Ancak, BK7 yapılandırmasında SPR çukurunun yansımaya değeri, Au film için % 40 civarında iken Ag için % 20'den düşüktür.



Şekil 3.1.4 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (635 nm lazer için)

3.1.2.1.3 690 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

Şekil 3.1.5'te, ışık kaynağı olarak 690 nm dalga boylu lazerin kullanıldığı hesaplamalara ait SPR eğrisi verilmiştir. Şekilde, sırasıyla SF10 substrat için Ag ve Au kaplı (a,b) ve BK7 substrat için Ag ve Au kaplı (c,d) yüzeylerin sonuçları görülmektedir.



Şekil 3.1.5 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (690 nm dalga boylu lazer için)

Bu dalga boyu için alınan SPR eğrileri, 635 nm eğrilerine oldukça benzemekle birlikte; her iki substrat grubu için de SPR'ın kalınlığa bağımlılığında bir azalma ve SPR çukurunun elde edildiği film kalınlığının 100 nm civarına yaklaşma görülmüştür. SF 10 substrat için, SPR elde edilen dalga boyunun Ag film için 45 ° - 50 ° ve Au film için 50 ° - 55 ° aralığına düşmüş olması gözle önemli farklılıklar arasındadır. SPR eğrilerinin keskinliklerinde belirgin bir değişiklik olmamıştır.

3.1.2.1.4 780 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

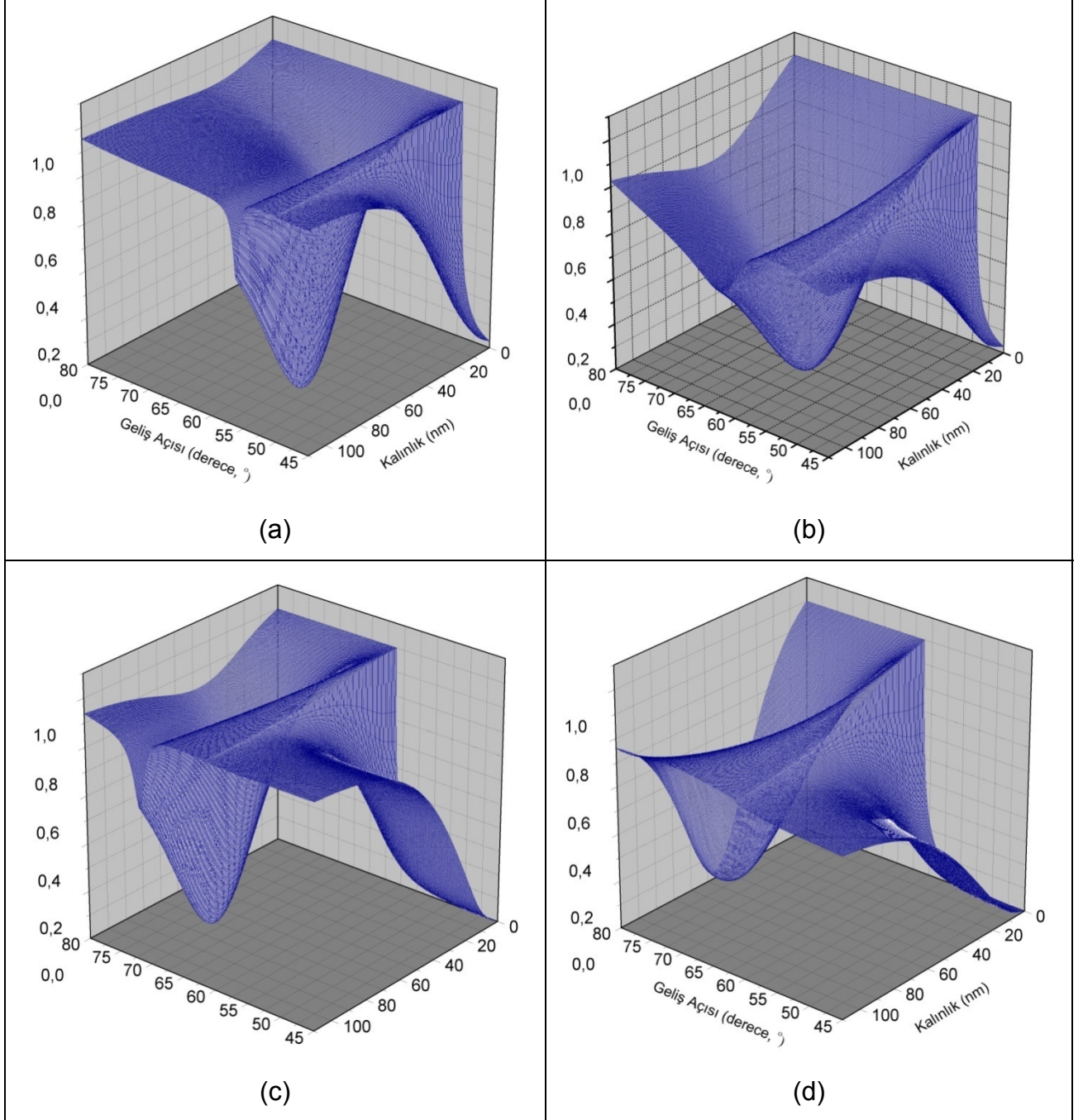
Şekil 3.1.6'da, ışık kaynağı olarak 780 nm dalga boylu lazerin kullanıldığı hesaplamalara ait SPR eğrisi verilmiştir. Şekilde, SF10 substrat için Ag ve Au kaplı (a,b) ve BK7 substrat için Ag ve Au kaplı (c,d) yüzeylerin sonuçları görülmektedir. Görünür bölgenin sonlarında yer alan bu dalga boyunda her iki substrat için de, artan dalga boyu ile gözlenen değişimler (örneğin, SPR eğrisinin metal film kalınlığına bağımlılığının azalması, optimum SPR eğrisinin daha kalın metal filmlerle elde edilmesi ve SPR çukurunun elde edildiği açının daha düşük geliş açılarına kayması) sabit olarak devam etmiştir. Bu dalga boyunda göze çarpan bir davranış ise, özellikle Au yüzeyde yansıma değerlerinin oldukça düşmesidir. Bu düşüş, SPR çukurunun elde edildiği en düşük yansıma değerinde değişiklik olmaksızın gerçekleştiğinden, tipik SPR eğrileri daha kısa (bir başka deyişle, daha dar bir aralıkta; ancak, hassasiyet değişmeksizin) gözlemlenmektedir.

3.1.2.1.5 808 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

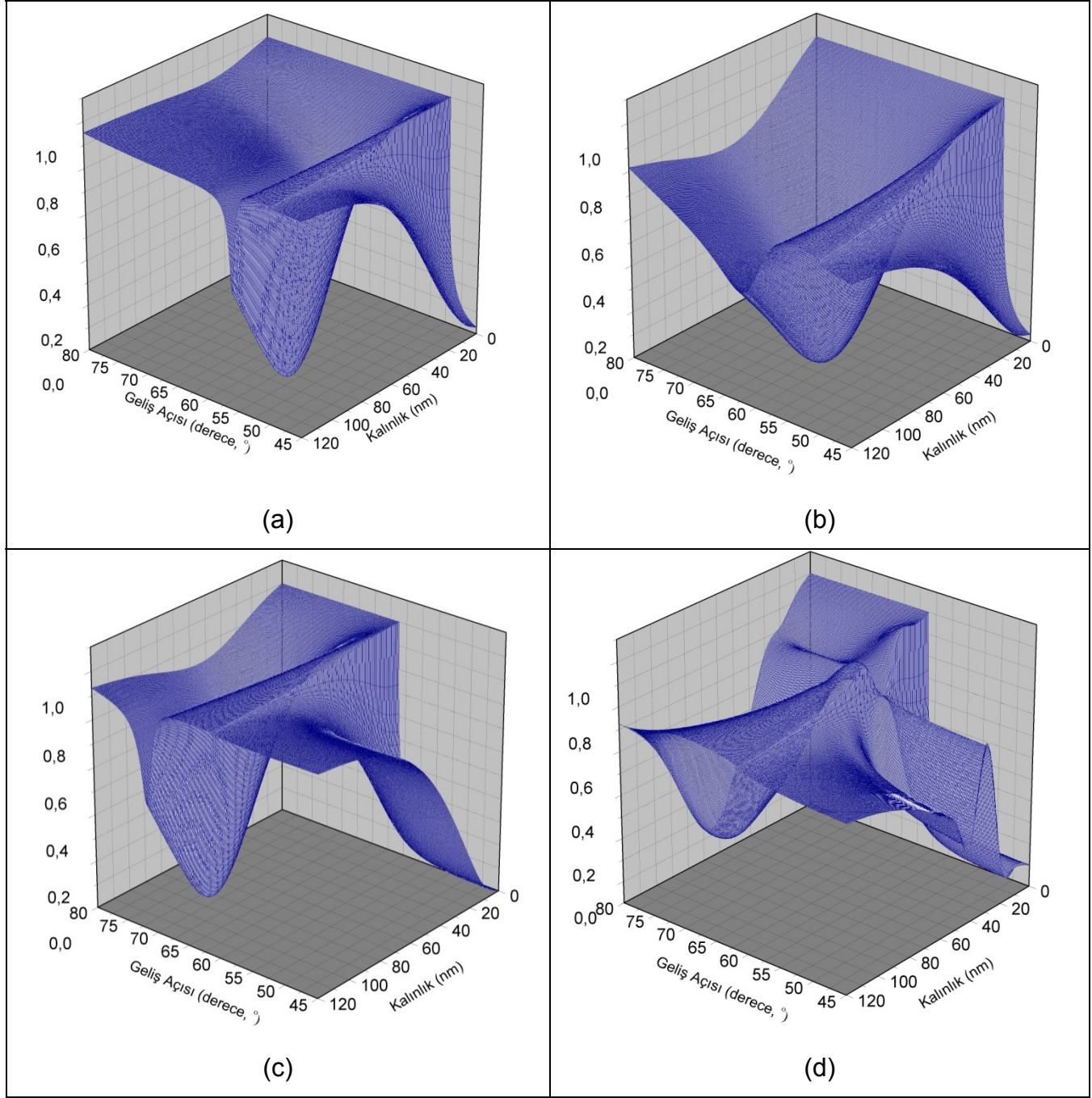
Yakın infrared bölge sınırına dahil olan ilk lazer diyotun kullanıldığı sistem için, SPR eğrileri 780 nm için elde edilen SPR eğrilerinden belirgin bir şekilde farklı olmadığı için SPR eğrileri verilmemiştir.

3.1.2.1.6 904 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

İnfrared bölgede SF10 substrat için Ag ve Au kaplı (a,b) ve BK7 substrat için Ag ve Au kaplı (c,d) yüzeylere ait SPR eğrileri Şekil 3.1.7’de verilmiştir.



Şekil 3.1.6 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (780 nm dalga boyu lazer için)



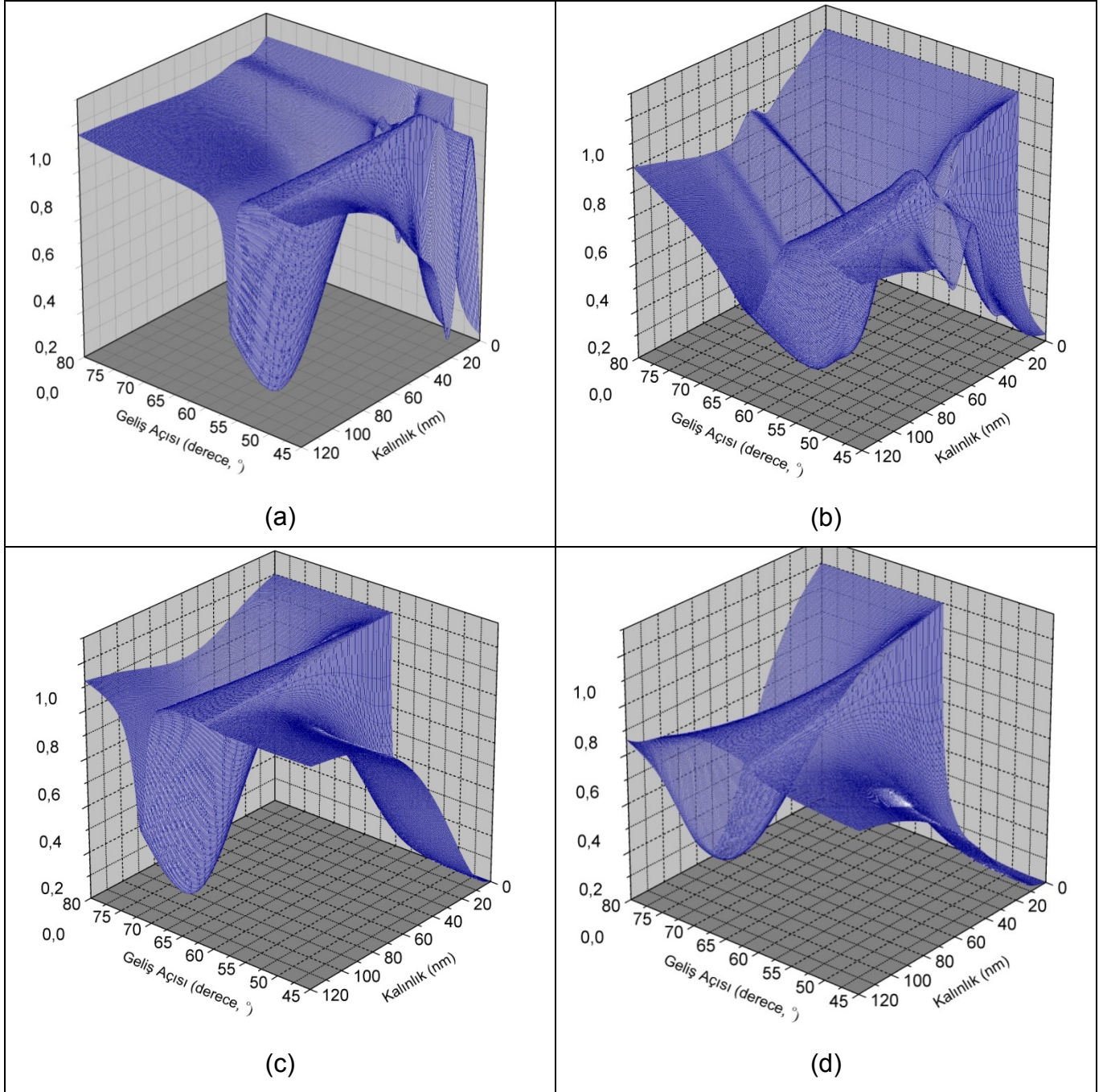
Şekil 3.1.7 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (908 nm dalga boyu lazer için)

Dalga boyuna bağlı değişimler devam ederken, en önemli gözlem Şekil 3.1.7 d’de BK7 substrat için Au film kaplamasında elde edilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi, farklı geliş açıları ve kalınlık değerlerinde birkaç soğurma bandı ortaya çıkmıştır

(bir başka deyişle 80 nm-100 nm film için 70 ° geliş açısı civarında SPR çukuruna ek olarak, 30 nm film kalınlığı ve 70 ° - 75 ° arası için bir çukur, yaklaşık 50 nm film kalınlığı için 45 ° - 60 ° için bir diğer çukur). Ayrıca genel yansım oranları düşüş göstermiş ve tam yansıma dar bir aralıkta, örneğin BK 7 substratta Au film için 60 ° - 65 ° aralığında, elde edilebilmiştir.

3.1.2.1.7 980 nm dalga boyunda lazer için SPR eğrileri

İnfrared bölgede alınan SPR eğrileri, beklenmedik şekilde (Bölüm 3.1.2.1.6'da BK7 substrat için gözlenen) SF 10 substrat için çoklu soğurum bantları vermiştir. Ayrıca tam yansımanın alındığı bölge, gerek SF 10 substratta gerekse BK 7 substratta oldukça daralmış, SPR çukurunun gözlenebilirliği ve özellikle Au film kaplı yüzeyde SPR çukurunun derinliği azalmış ve genişliği artarak analiz hassasiyeti düşmüştür (Şekil 3.1.8). Ancak, infrared bölgede alınan spektrum, örneğin analiz edilen yüzeyde oldukça yakın moleküler gruplarda (yakın infrared bölgede gözlemlenecek) bağ soğurum bantlarını da ortaya çıkaracaktır. Bu durum, teorik olarak beklenen SPR eğrisinden daha farklı bir soğurum eğrisi elde edilmesine neden olacağından, spesifik uygulamalarda kullanım açısından gelecekte yapılacak çalışmalarda kullanılabilecek bir olgudur. İçten zayıflatılmış tam yansıma (ATR, attenuated total internal reflection) esaslı IR-SPR çalışmaları ile ilgili olarak literatürde az sayıda yayın bulunmaktadır (Ikehata ve ark., 2003).



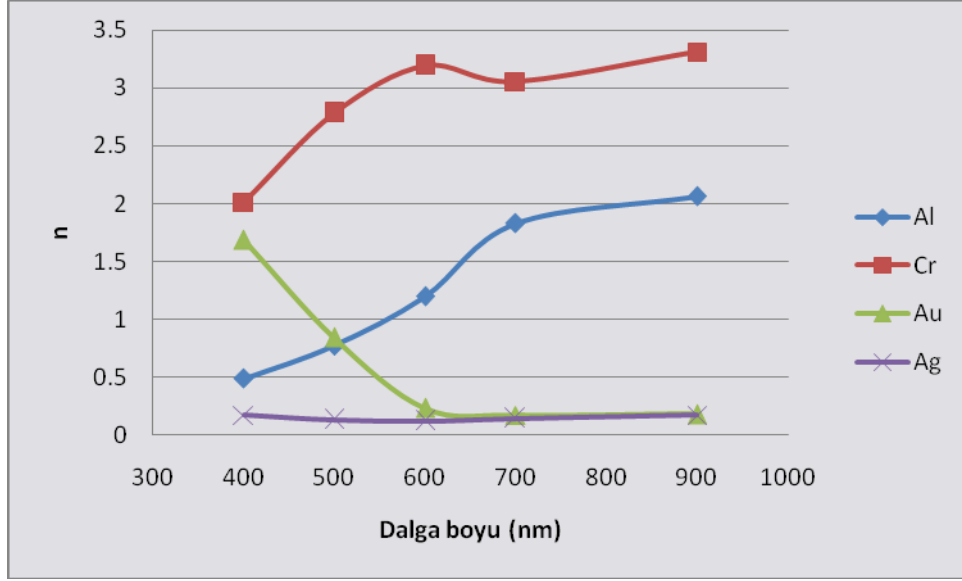
Şekil 3.1.8 - a) SF10 substrat – Ag film b) SF10 substrat – Au film c) BK 7 substrat – Ag film ve d) BK 7 substrat – Au film için SPR eğrileri (980 nm dalga boyu lazer için)

3.1.3 Genel sonuçlar

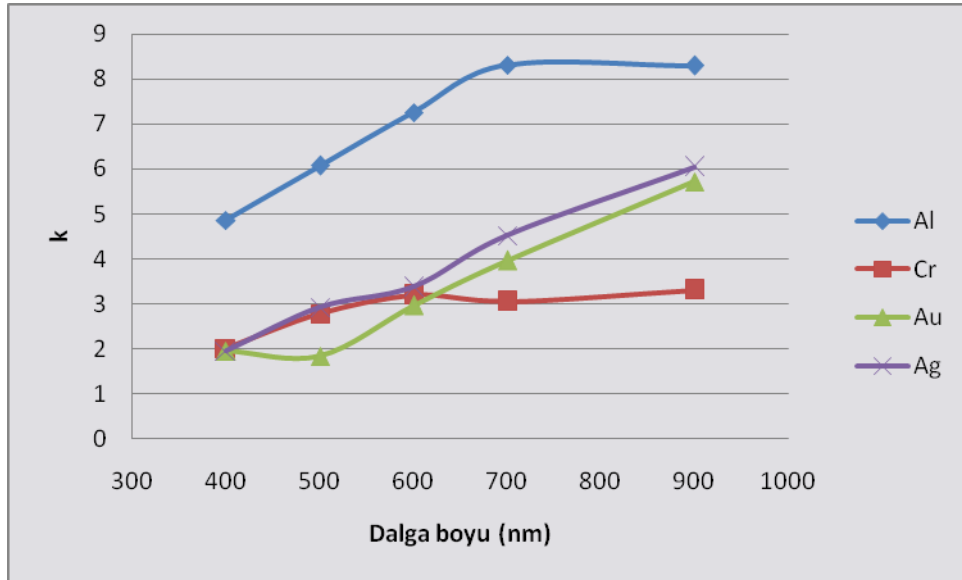
Dalga boyunun artması ile elde edilen genel sonuçlar aşağıdaki gibi listelenebilir:

- Ag film her dalga boyu ve substratta daha derin ve dar SPR eğrisi vermektedir.
- Au film ile elde edilen SPR eğrisi, film kalınlığındaki değişime Ag kadar bağımlı değildir (Örneğin; 635 nm'de Au film için 50° - 55° arasında gözlenen SPR eğrisi, aşırı bozulma olmaksızın 60 nm – 80 nm arasında film kalınlığında gözlenebilirken; Ag film için 46° - 47° arasında gözlenen pikte kayıp olmaması için film kalınlığının 85 nm – 90 nm arasında olması gerekmektedir).
- Dalga boyu yükseldikçe yansıma oranı azalırken, SPR çukuru yaklaşık bir R (%) değerinde sabit kabul edilebilirse de, daha yüksek yüzdelere çıkarak SPR derinliğinde azalmaya neden olmaktadır.
- Dalga boyu artışı, rezonansın gözleendiği açının Ag'de normale göre daha yüksek değerlere, Au'da ise belli bir dalga boyuna kadar daha düşük değerlere kaymasına neden olmaktadır.

Ayrıca farklı metal türlerine ait n ve k değerlerinin dalga boyuna bağımlılığı incelenerek; metal türlerinin geliş açısı veya dalga boyu değişiminde ne tür davranışlar sergileyeceğini önceden tahmin edilmeye çalışılmıştır. Ag, Au, Cr ve Al film için 25°C 'ta farklı dalga boylarındaki n ve k değerleri Şekil 3.1.9'da gösterilmiştir.



(a)



(b)

Şekil 3.1.9 – Farklı dalga boyundaki monokromatik ışık için bazı metal filmlerin n (a) ve k (b) değerlerindeki değişim.

Ag film için yüksek dalga boylarında SPR eğrisinin alındığı açının aşırı şekilde değişmemesi, n değerinin dalga boyuna bağımlı olmaması nedeniyledir. Aynı şekilde Au için dalga boyu artışı, SPR eğrisinin alındığı açının 600 nm dalga

boyuna kadar değişmesine ve bu ardından yaklaşık sabit kalmasına neden olmaktadır. Film tabakalarının n ve k değerleri bilindiğinde, farklı dalga boyları ve geliş açıları için SPR yonga davranışını tahmin etmek olasıdır. Şekil 3.1.9'da görüldüğü gibi Al film kaplı yüzeyler ile Cr film kaplı yüzeylerin, yaklaşık benzer SPR davranışı sergilemesi beklenir.

3.2. Sensör Yüzeylerinin Modifikasyonu

Gerek elipsometri, gerekse SPR uygulamalarında taban malzeme olarak kırılma indisi bilinen cam slaytlar kullanılır. Cam slaytların üretim süreçleri nedeniyle pürüzlülüğünün 5 nm civarında olması bu malzemelerin substrat olarak kullanımını mümkün kılar. Ayrıca mikroskopik uygulamalar için üretilen cam slaytlar optik olarak nispeten izotropik malzemelerdir. SF10 cam, kırılma indisi 25 °C'ta 532 nm ışık için 1,74; BK7 ise 1,52 olan bir camdır. Kolay erişim açısından borosilikat mikroskop lamelleri (BK7) kullanılabilir. Ancak, belirli durumlarda SF10 kullanımına ihtiyaç duyulmaktadır. Substratın yüzeyine moleküler modifikasyon yapılmadan önce veya fiziksel buhar birikim (PVD, physical vapor deposition) yöntemi ile metal kaplaması yapılmadan önce yüzey homojenliğini sağlamak ve immobilizasyon işleminde birikim gibi sorunların önlenmesi için substratın organik kirliliklerden arındırılması gerekir.

Temizleme yöntemlerini yaş ve kuru yöntemler olarak sınıflandırmak mümkündür. Parmak izi vb. gibi kolayca uzaklaştırılabilecek kaba kirlilikler uygun çözücü ile bir veya birkaç kez yıkama ile giderilebilir. Ancak fiziksel veya kimyasal olarak bağlı organik tabakaların temizlenmesi için oksitleyici ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Farklı oksitleyici ortamlarda ve farklı sürelerde yapılan yüzey temizliği ve işlemler sonucu elde edilen sonuçlar Çizelge 3.2.10'de gösterilmiştir.

3.2.1. Sıvı (yaş yöntemler)

3.2.1.1 Yöntem sl - Piranha çözeltisi

Yüzeyler hacimce 1:3 oranında H₂O₂ (% 30 v/v) ve H₂SO₄ (%70) çözeltisinde 15 saniye ila 10 dakika daldırılarak bekletilmiştir. Ardından deiyonize su, etil alkol ve tekrar su ile yıkanarak azot gazı ile kurutulmuş ve bekletilmeden kullanılmıştır.

3.2.1.2. Yöntem sII – Nitrik asit çözeltisi

Yüzeyler hacimce 1:5 oranında derişik HNO_3 ve su karışımı içerisinde 15 dakika ila 30 dakika, kaynama sıcaklığında bekletilmiştir. Ardından deiyonize su, etil alkol ve tekrar su ile yıkanmış ve azot gazı ile kurutularak bekletilmeden kullanılmıştır.

3.2.1.3. Yöntem sIII – RCA I çözeltisi

Yüzeyler hacimce 1:1:5 oranında H_2O_2 (% 30 v/v), NH_3 (% 29,8 v/v) ve deiyonize su karışımında, kaynama sıcaklığında 15 dakika ila 30 dakika arasında bekletilmiştir. Ardından, Bölüm 3.2.1.2’de belirtilen son temizleme işlemi yapılmıştır.

3.2.2. Kuru yöntemler

3.2.2.1. Yöntem kI- UV-ozon temizleyici

UV-ozon temizleme cihazının (Irvine, CA, Model 42, Jelight Co., ABD), UV odacığı içerisinde havanın oksijeni ozona çevrilerek yüzeyde oksitleme işlemi gerçekleştirilir. Alıkonma ve temizleme süresi 5 dakika ve 30 dakika olarak seçilmiştir. Temizlemenin ardından yüzey deiyonize su, etil alkol ve tekrar su ile yıkanmış ve ardından azot gazı ile kurutulmuş ve bekletilmeden kullanılmıştır.

3.2.2.2. Yöntem kII- Oksijen veya hava plazma

Vakum altında doğrudan oksijen gazı veya havanın oksijeni kullanılarak oluşturulan plazma (Diener, Tetra, Clairton, PA, ABD) yoluyla yüzeyde oksitleme işlemi gerçekleştirilmiştir. Temizleme süresi 5 dakika ila 30 dakika arasında değiştirilmiştir. Temizlemenin ardından yüzey deiyonize su, etil alkol ve tekrar su ile yıkanıp, ardından azot gazı ile kurutulmuş ve bekletilmeden kullanılmıştır.

3.2.2.3. Uygun temizleme yönteminin seçimi

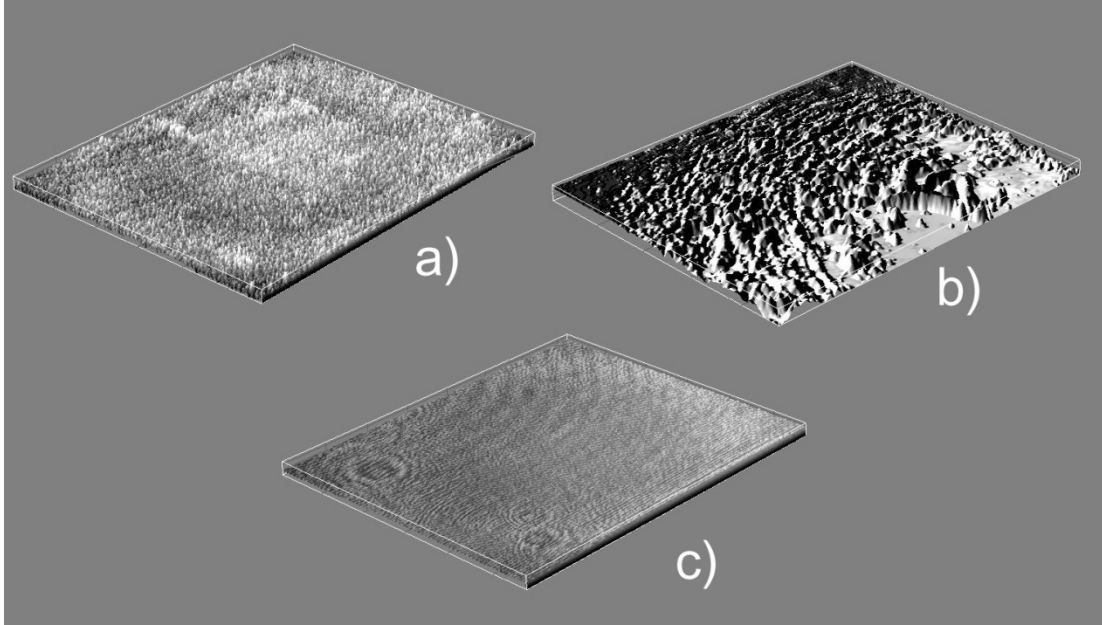
Yukarıda belirtilen temizleme yöntemlerinin etkinliklerini belirlemek amacıyla cam ve altın kaplı yüzeyler belirli miktarda organik tabaka ile kaplanmıştır. Kaplanan yüzeyler Çizelge 3.2.1'de belirtilen yöntem ve sürelerde temizleme işlemine tabi tutulmuş ve yüzeydeki organik tabaka kalınlığı elipsometrik olarak yeniden ölçülmüştür. Yüzeyde organik madde birikimi nedeniyle oluşan kalınlık, elipsometre (Nanofilm EP3, Almanya) kullanılarak 532 nm dalga boyunda, cam için 70 °, Au kaplı substratlar için 60 ° geliş açısında ölçülmüştür. Tabaka kalınlığı analizi sırasında, 50 µm x 50 µm alanda dört bölge otomatik sıfırlama (four zone auto nulling) prosedürü uygulanmış, kalınlık cihazdaki modelleme program ile belirlenmiştir. Modellemede cam yüzeyler için BK7 (substrat) / organik tabaka / hava; altın kaplı yüzeyler için BK7 (substrat)/2nm Cr film/ 32nm Au film/ organik tabaka/ hava tabakaları öngörülmüştür. Oldukça ince filmlerde kalınlık ile kırılma indisi orantılı olduğundan, tek tabaka için kırılma indisi (%100 dolu) 1,4600 alındığında (Aspness, 1985), kalınlık verileri doluluk ile orantılı olur.

İşlem sonucunda tabaka temizlenmesi ve yüzey özelliklerinin (substratın yüzey pürüzlülüğü gibi) karşılaştırılması ile uygun temizleme yöntemine karar verilmiştir. Tabakaların bilinen miktarda molekülle kaplanması işleminde, cam ve altın yüzeyler, modifikasyondan önce hidrofilik bir yüzey göstermesi için plazma ünitesinde 100 W güç ve hava ortamında işleme tabi tutulmuştur. Ardından cam yüzeyler için, hacimce % 3'lük 3-aminopropiltrietoksisilan (APTS) / etanol çözeltisi; altın kaplı yüzeyler için 1 mM merkaptoundekanoik asit (MUA) / etanol çözeltisi hazırlanarak, substratlar bu çözeltiler içerisinde 1 saat süre ile immobilizasyona tabi tutulmuştur. Yüzeylerin ortalama kalınlıkları substratın 3 farklı yerinde 4 ayrı 50 µm x 50 µm'lik alanda ölçülmüş ve aritmetik ortalama alınarak listelenmiştir (Çizelge 3.2.1).

Çizelge 3.2.1 – Farklı yöntemlerle temizleme ile tabaka kalınlığındaki değişim

Temizleme yöntemi, substrat ve süre	Temizlemeden önceki kalınlığı (nm)	Temizlemeden sonraki kalınlığı (nm)
Islak yöntemler		
sl, cam, 20 saniye	$1,2 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,2$
sl, cam, 2 dakika	$1,4 \pm 0,3$	$0,2 \pm 0,1$
sl, Au film kaplı, 20 saniye	$1,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
sl, Au film kaplı, 2 dakika	$1,3 \pm 0,1$	$< 0,1$
sII, cam, 5 dakika	$1,5 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,4$
sII, cam, 30 dakika	$1,3 \pm 0,1$	$0,5 \pm 0,2$
sII, Au film kaplı, 5 dakika	$0,9 \pm 0,1$	$0,6 \pm 0,2$
sII, Au film kaplı, 30 dakika	$1,1 \pm 0,1$	$0,3 \pm 0,1$
sIII, cam, 5 dakika	$1,4 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,4$
sIII, cam, 30 dakika	$1,1 \pm 0,3$	$0,6 \pm 0,2$
sIII, Au film kaplı, 5 dakika	$1,3 \pm 0,1$	$0,9 \pm 0,2$
sIII, Au film kaplı, 30 dakika	$1,0 \pm 0,1$	$0,4 \pm 0,1$
Kuru yöntemler		
kl, cam, 5 dakika	$0,8 \pm 0,2$	$0,5 \pm 0,2$
kl, cam, 30 dakika	$1,1 \pm 0,2$	$< 0,1$
kl, Au film kaplı, 5 dakika	$1,2 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
kl, Au film kaplı, 30 dakika	$1,4 \pm 0,1$	$< 0,1$
kII, cam, 30 dakika, 50 W, hava	$1,1 \pm 0,2$	$< 0,1$
kII, cam, 30 dakika, 100W, hava	$1,1 \pm 0,2$	$< 0,1$
kII, Au film kaplı, 30 dakika, 50 W, hava	$1,1 \pm 0,2$	$0,3 \pm 0,1$
kII, Au film kaplı, 30 dakika, 100W, hava	$0,8 \pm 0,2$	$< 0,1$
kII, cam, 30 dakika, 50 W, oksijen	$0,9 \pm 0,3$	$< 0,1$
kII, cam, 30 dakika, 100W, oksijen	$1,4 \pm 0,1$	$< 0,1$
kII, Au film kaplı, 30 dakika, 50 W, oksijen	$0,8 \pm 0,2$	$< 0,1$
kII, Au film kaplı, 30 dakika, 100W, oksijen	$1,1 \pm 0,1$	$< 0,1$
kII, Au film kaplı, 2 dakika, 100 W, oksijen	$1,2 \pm 0,3$	$0,3 \pm 0,1$
kII, Au film kaplı, 2 dakika, 100W, hava	$1,5 \pm 0,3$	$< 0,1$

Çizelge 3.2.1’de görüldüğü gibi Yöntem-sII ve Yöntem-sIII yöntemleri hariç diğer yöntemlerin tamamında uzun olmayan sürelerde temiz yüzey elde edilmiştir. Ancak, yüzeyin ıslak yöntemlerde daha çok hasara uğradığı görülmüştür. Şekil 3.2.1’de Yöntem sl ve Yöntem kII ile temizlenmiş iki altın yüzeyi ile temizleme öncesi yüzeyi temsilen 3 boyutlu elipsometrik görüntü verilmiştir. Altın filmdeki bölgesel incelemeler ile düzensiz bozulmaların görüldüğü piranha çözeltisi kullanarak temizleme yöntemi, nispeten yüzeye daha fazla zarar veren ve bu çalışmada tercih edilmeyen bir yöntem olmuştur. Tez çalışmasında yüzey temizliği için susbtrata en az hasarı vererek yüzey temizliğinin elde edildiği “vakum altında plazma ile temizleme” yöntemi kullanılmıştır.



Şekil 3.2.1 – a) MUA kaplı Au yüzey, **b)** Yöntem sl ile temizlenmiş (10 dakika) Au yüzey ve **c)** Yöntem kII ile temizlenmiş (100 W, 30 dakika) Au yüzey

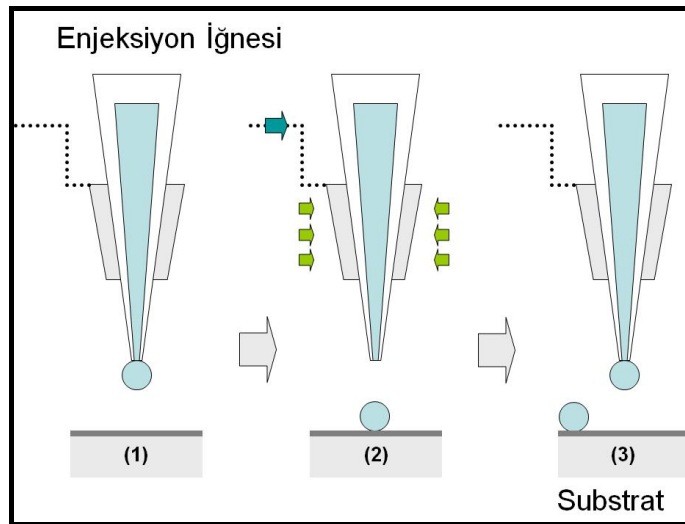
Hidroksil gruplarının oluşturulması açısından, plazmada uygulanan güç ve işlem süresi 100 W ve 30 dakika olduğunda cam için elde edilen temas açısı değerinin $< 3^\circ$ olduğu görülmüştür. Bu nedenle, hidroksil grupları oluşturma ve temizlik açısından Yöntem kII’nin 100 W ve 30 dakika süre ile uygulanması güvenli ve

yeterli olduđu belirlenmiřtir. Dikkat edilmelidir ki, 50 W ve daha dűřűk plazma gűcűnde plazmayı oluřturmak veya plazmanın kararlılıđını sađlamak oldukça zordur. Burada plazma ile uygulanan gűç ve plazma uygulama sűresi belirlenirken cihaza ait fiziksel sınırlamalar da dikkate alınmıřtır.

3.3. Ink-jet litografi çalışmaları

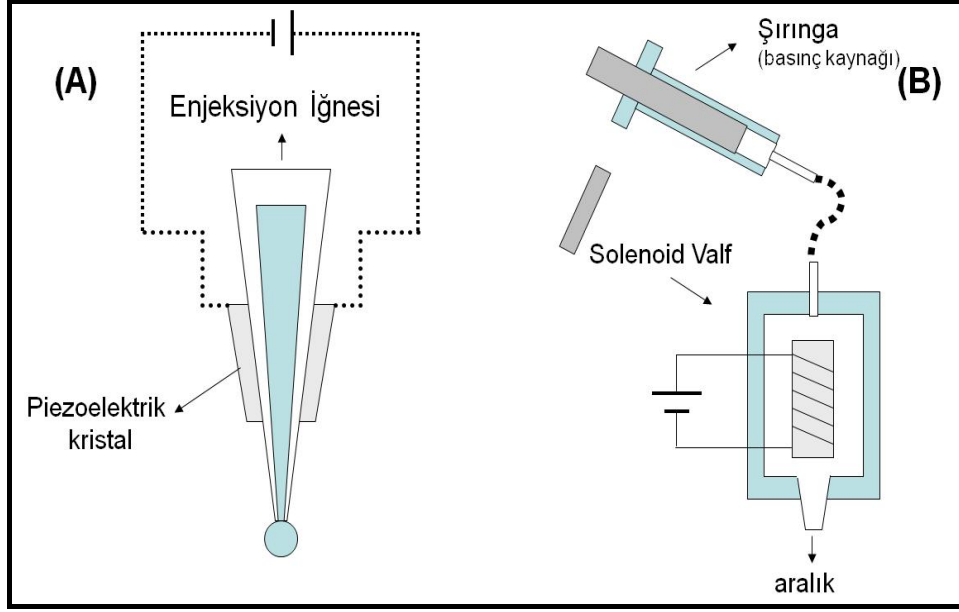
Tez çalışmasında mikro desenleme amacıyla kullanılan yöntemlerden birisi Ink-Jet litografidir. Piezo püskürtme sistemine sahip yeni ink-jet yazıcılar 1 pL mürekkep püskürtme kapasitesi ile litografi için uygun cihazlar olarak nitelendirilmektedir. Ink-jet baskılama düşük fiyatlı masa üstü renkli yazıcılar ile uygulanabilirliği nedeniyle en fazla bilinen teknolojilerdendir (Heinzel, 1985; Hebner, 1998).

Şekil 3.3.1`de şematik olarak açıklandığı gibi, prob moleküllerini taşıyan sıvının tekli mikroskobik damlacıklar şeklinde enjeksiyonu, bilgisayar kontrollünde yapılarak yüzeylerde desenler elde edilir.



Şekil 3.3.1 - Ink-jet baskılamada dağıtım mekanizması.

Kullanılmakta olan geleneksel sistemlerde, bir piezoelektrik dağıtıcı (Şekil 3.3.2 a) veya şırınga bobin enjekte tipi (Şekil 3.3.2 b) dağıtıcı bulunmaktadır. Her iki dağıtıcı da mikro-noktalama tekniği için önemli bir avantaj olan hacim dağıtımının programlanmasına olanak tanır. Her iki tip dağıtıcıda da hacim yüklenmesi (5 μ L - 10 μ L aralığında) mikro-noktalama iğnelerinkinden daha fazladır.

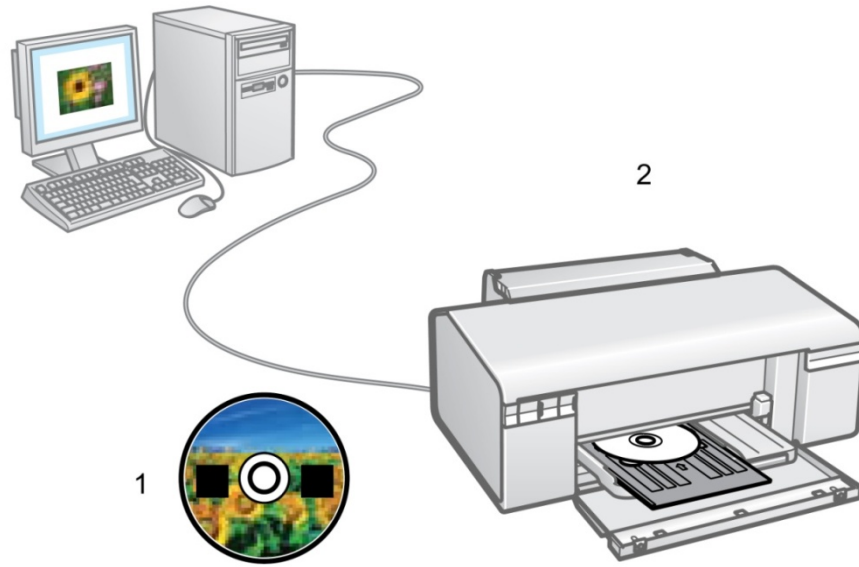


Şekil 3.3.2- İnk-jet baskılamada dağıtıcılar: (a) Piezoelektrik dağıtıcılar; (b) şırınga bobin enjeksiyon tipi dağıtıcılar.

Piezoelektrik dağıtıcılarla baskılama hacimleri 0,05 nL'ye kadar düşüp mikro-noktalama iğnelerinden çok daha iyiye, şırınga bobinlerinde bu oran oldukça yüksektir (4 nL -100 nL). Mikro-noktalama iğneleri ile karşılaştırıldığında spot boyutları piezoelektrik dağıtıcılarda daha az, fakat şırınga bobinlerinde yüksektir. Farklı şekillerde tasarlanmış baskı başlıklarıyla enjekte edilen damlacıklar, 20 μ L - 30 μ L aralığında noktalar bırakır. Piezoelektrik dağıtıcıların spot yoğunlukları mikro-noktalama iğnelerle karşılaştırılabilir. Ancak, spot yoğunlukları şırınga bobinlerinde belirgin derecede azdır. İnk-jet baskılamada bir avantaj olarak malzemeler çoklu tabakalar halinde biriktirebilir. Ancak, dağıtıcılar mikro-noktalama iğnelerine göre özellikle piezoelektrikler ile karşılaştırıldıklarında çok daha karışık ve pahalıdır. İnk-jet baskılama yöntemi ilgili literatürde birçok uygulama yer almaktadır (Barron, 2005; Allain, 2004). İnk-jet baskılama ile ilgili çok ilginç bir araştırma son zamanlarda Allain ve arkadaşları tarafında rapor edilmiştir. Birkaç farklı türde boya molekülleri (Eosin Y, floresan ve 4-metilumbeliferon) kullanılarak, substrat yüzeyi üzerinde DNA hibridizasyonu temelli tanıda, *Bacillus anthracis* bakterisi için bir array geliştirilmiştir (Allain, 2004).

3.3.1 Deneysel yöntemler ve sonuçlar

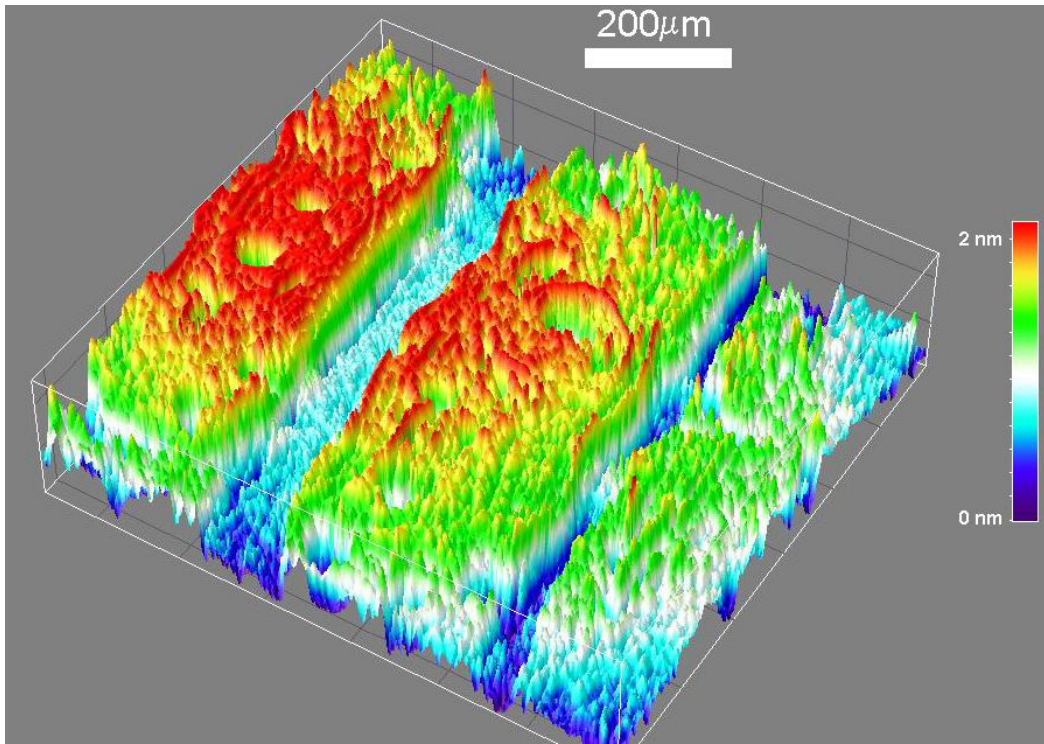
Tez çalışmasında kullanılan yazıcı, Epson R285 model, 6 mürekkep hazneli bir yazıcıdır. Fabrika verisi çözünürlüğü 5760 x 1140 nokta/inç'tir (dpi). Uygun ortamlarda ulaşılacak bu çözünürlük, teorik olarak 4 µm kesinlikle desenlerin oluşturulmasına imkan vermektedir. Ayrıca fabrika verisi olarak 1 pL damlacık hacmi ile baskılama sağladığı belirtilmiştir (Şekil 3.3.3).



Şekil 3.3.3 – Ink-jet litografi konfigürasyonu (1) Şablon CD üzerine baskı yapılacak yüzey yerleştirilir (2) Yazıcının CD baskı tepsisinde desenleme yapılır.

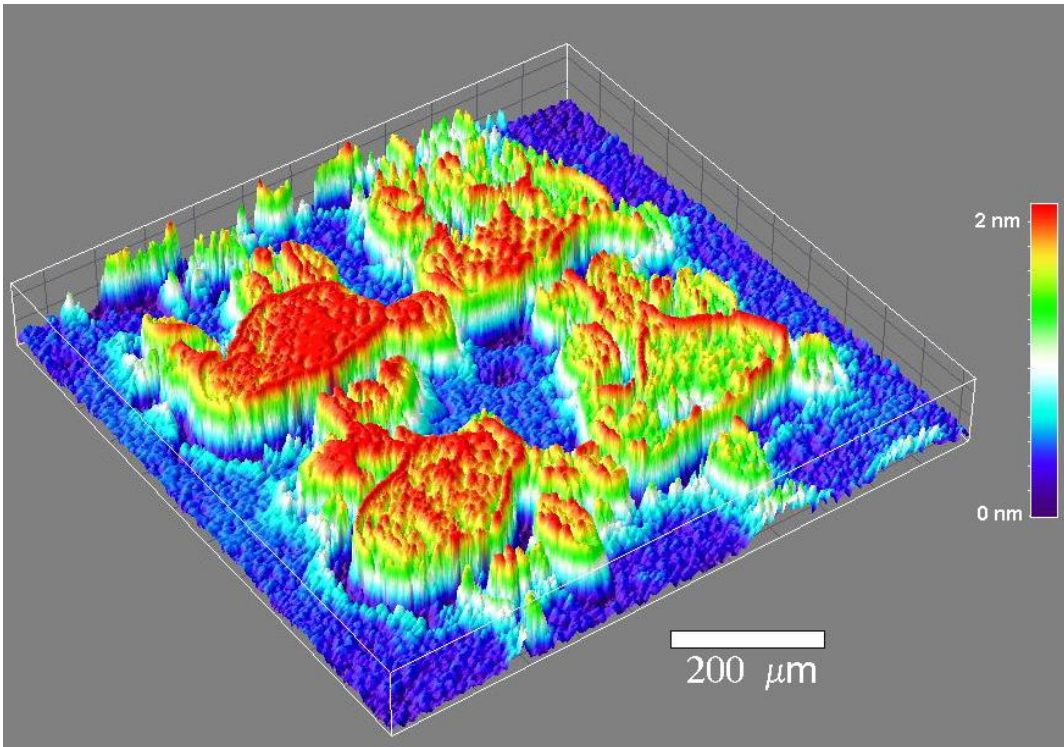
Çalışmada kullanılan yazıcı için doldurulabilir kartuş seti temin edilmiştir. Kartuş seti polipropilen'den imal edilmiş olup birçok çözücü ve çözeltiliye dayanıklıdır. Ancak püskürtme işleminin yapıldığı 90 adet piezo kanalın tıkanmaması veya korozyona uğramaması için, ılımlı pH'lara sahip ve katı partikül içermeyen kimyasalların yüzeye baskılanması daha uygundur. CMYK (Cyan, magenta, yellow, key) renk sistemine göre baskılama yapan yazıcıda desenleme için CMYK renk sisteminde kalibrasyonu iyi olan profesyonel bir yazılım Adobe Photoshop® kullanılmıştır. Photoshop yazılımında hazırlanan desenler, renk skalasında siyah, kırmızı, turkuaz veya sarı ile renklendirilerek yalnızca ilgili kartuştaki çözeltilinin

yüzeye püskürtülmesi sağlanmıştır. 1 mM MUA/etanol çözeltisi içeren kartuş kullanılarak, 200 μm genişlik ve 200 μm aralığa sahip MUA desenler 32 nm altın kaplı SF10 substrat yüzeyine immobilize edilmiştir. Baskı için yazıcının CD yüzeyine baskı tepsisi ile CD büyüklüğünde hazırlanmış slayt şablonu kullanılmıştır. İmmobilizasyon sonrasında slaytlar bekletilmeden alınmıştır. Daha sonra, içerisinde saf etanol bulunan ve etanol buharı ile doymuş bir kapalı kap içerisinde 1 saat bekletilmiştir. İşlemin ardından etanol ve su ile yıkanan slaytların 3 boyutlu elipsometrik görüntüsü alınmıştır (Şekil 3.3.4 ve Şekil 3.3.5). MUA tabaka kalınlığı farklı noktalardan, elipsometrik olarak ölçülerek belirlenmiş ve hat desenli yüzeyde $1,4 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$; noktacık desenli yüzeyde $1,1 \text{ nm} \pm 0,5 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur. MUA'nın teorik moleküler uzunluğu ChemDraw yazılımı ve "molecular mechanics 2/ MM2" modellemesi kullanılarak 1,2 nm olarak bulunmuştur. Ölçülen değer olan $1,4 \text{ nm} \pm 0,6 \text{ nm}$ kalınlık yaklaşık tek tabaka formasyonunun oluştuğunu göstermektedir.



Şekil 3.3.4 – Hat desenli ink-jet litografi, MUA tek tabakasının 3D elipsometrik görüntüsü

Ink-jet litografi çalışmasının ikinci basamağında, MUA immobilize edilmiş yüzeye EDC aktifleştirmesi yoluyla protein A immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon için pH 7,4 fosfat tamponunda hacimce % 0,1'lik protein A çözeltisi 3 saat süre kullanılmıştır. İmmobilizasyon işlemi sonunda 3 slayt için farklı 3 bölgeden alınan 4 ayrı 50 μm x 50 μm bölgeye ait kalınlıkların aritmetik ortalaması $6,32 \text{ nm} \pm 1,2 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur. Protein A için yatay dizilimde, literatürde belirtilen (Demirel ve ark., 2007) kalınlık yaklaşık 4 nm, dikey formasyon için yaklaşık 8 nm'dir. Bu sonuçlar, Protein A immobilizasyonunun başarıyla gerçekleştirildiğini göstermektedir.

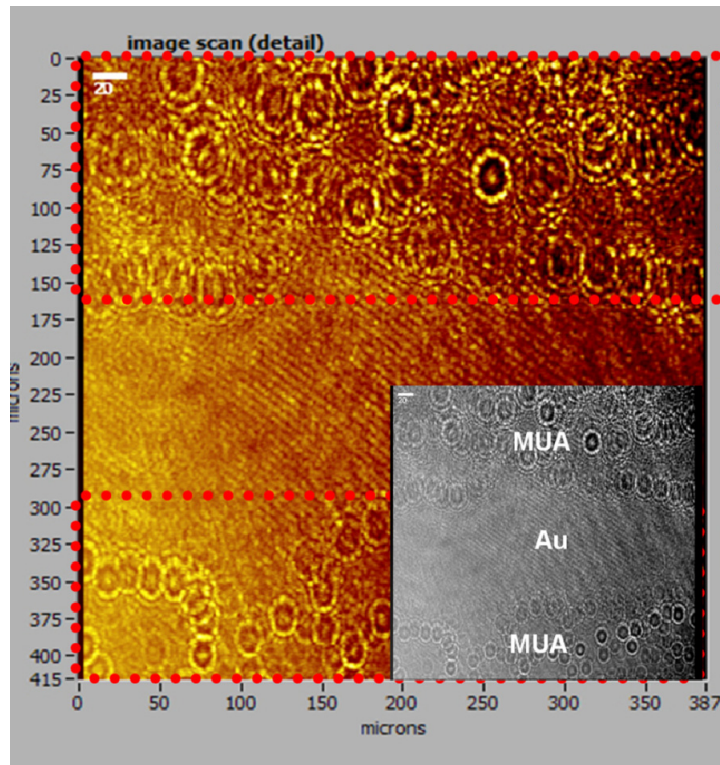


Şekil 3.3.5 – Noktacık (dot) desenli ink-jet litografi, MUA tek tabakasının 3D elipsometrik görüntüsü

Ancak, Şekil 3.3.6'da görüldüğü gibi, tek tabaka sınırının belirgin olmaması nedeniyle daha sıkışık tek tabakalarda array analizlerinin yapılmasının sorun olabileceği düşünülmüştür.

Mevcut cihaz ile Ink-Jet litografinin aşağıda belirtilen avantajları vardır:

- Tek işlemde aynı anda 6 fonksiyonel molekülün farklı desenlemeler ile baskılanabilmesi olanağı,
- Karışık tabaka formasyonunu sağlamak üzere; tek bir desen üzerine aynı anda 6 fonksiyonel molekülün baskılanabilme olanağı,
- Tekrarlanabilen desenlere ardışık halde 6 farklı molekülün baskılanabilme olanağı,
- Kartuşlardan birisinin çözelti ile doldurulması halinde yüzeye baskılamada gradyan oluşturulabilme olanağı (bir başka deyişle baskı sırasında seyreltmenin mümkün olması),
- Hızlı ve spesifik bağlanan molekül çiftlerinin ardışık olarak aynı desen üzerine sırayla baskılanması ile tabaka üstü tabaka yapılandırmasının sağlanabilme olanağı,
- Aktifleştirici ajan veya başlatıcının ikinci bir kartuş ile püskürtülmesi yoluyla desenli yüzeyde polimerizasyon veya reaksiyon gerçekleştirilebilme olanağıdır.



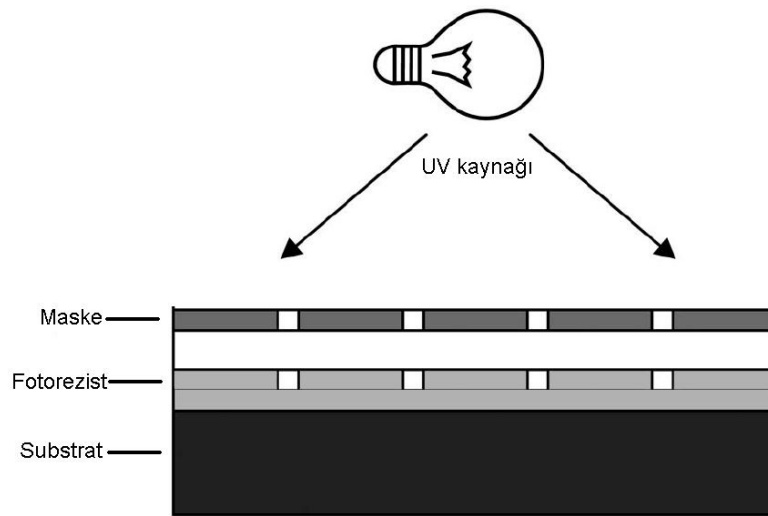
Şekil 3.3.6 – MUA baskılanmış yüzeyde daha yüksek büyütme ile alınan 2D elipsometrik görüntü. Damlacıkların dağılımları net olarak görülebilmektedir.

Bu eşsiz avantajlara sahip olmasına rağmen, yüzeyden yüzeye baskı çözünürlüğünün değişmesi (yüzey püskürtülen çözeltinin dağılması), tekrarlanabilir sonuçların elde edilmesini zorlaştırmaktadır. Şekil 3.3.6'da görüldüğü gibi sınırlarda oluşan $\pm 10 \mu\text{m}$ belirsizlik, örneğin altın yüzeyinde en yüksek elde edilebilecek çözünürlüğün $30 \mu\text{m}$ olabileceğini göstermektedir. Yüzeyin öncelikle başka yöntemlerle modifiye edilmesi halinde çözünürlüğün artırılması mümkündür (bir başka deyişle; damlacığın sabit kalması için hidrofilik yüzeye hidrofobik çözücüde molekül baskılanması veya tersinin uygulanması olanağı mevcuttur). Ancak bu durumda da, kendiliğinden düzenlenme için gereken sürücü gücün azalması ve kendiliğinden düzenlenmenin engellenmesi sorunu ortaya çıkabilmektedir (tek tabaka oluşumu ile ilgili çalışma tezin ilerleyen bölümünde verilmiştir).

3.4. Fotolitografi çalışmaları

Mikro-desenleme amacıyla, tez kapsamında kullanılan yöntemlerden birisi fotolitografidir. Işığa duyarlı bir polimerik tabakanın bir maske yardımı ile desenlenmesi prensibine dayanan bu yöntemde ışık alan (genellikle UV) bölgenin çapraz bağlanması (negatif) veya ışık alan bölgenin parçalanması (pozitif) ile desenleme yapılmaktadır (Şekil 3.4.1). Çalışmada el yapımı fotolitografi ünitesi kullanılmıştır. Bu ünite, fotorezist (pozitif) malzemenin uniform kaplanması için bilgisayar fanı (0-9 V, 9 cm çap) ve ayarlı güç kaynağından ($\pm 0,1$ V ve $\pm 0,1$ A hassasiyetle ayarlanabilen) imal edilmiş bir dönüşlü kaplama (spin coating) cihazı ve maskelerin substrat üzerine yerleştirildiği ve UV ışık altında işleme tabi tutulduğu bir UV-ışın odacığından oluşmaktadır. UV ışık kaynağı olarak Philips 100 W lamba (365 nm) kullanılmıştır. Mercek ile odaklama ve titreşim önleme sistemlerinin bulunmadığı bu fotolitografi ünitesinde, farklı aralıklara sahip noktasal ve çizgisel olmak üzere farklı iki şablonda desenler oluşturulmuştur.

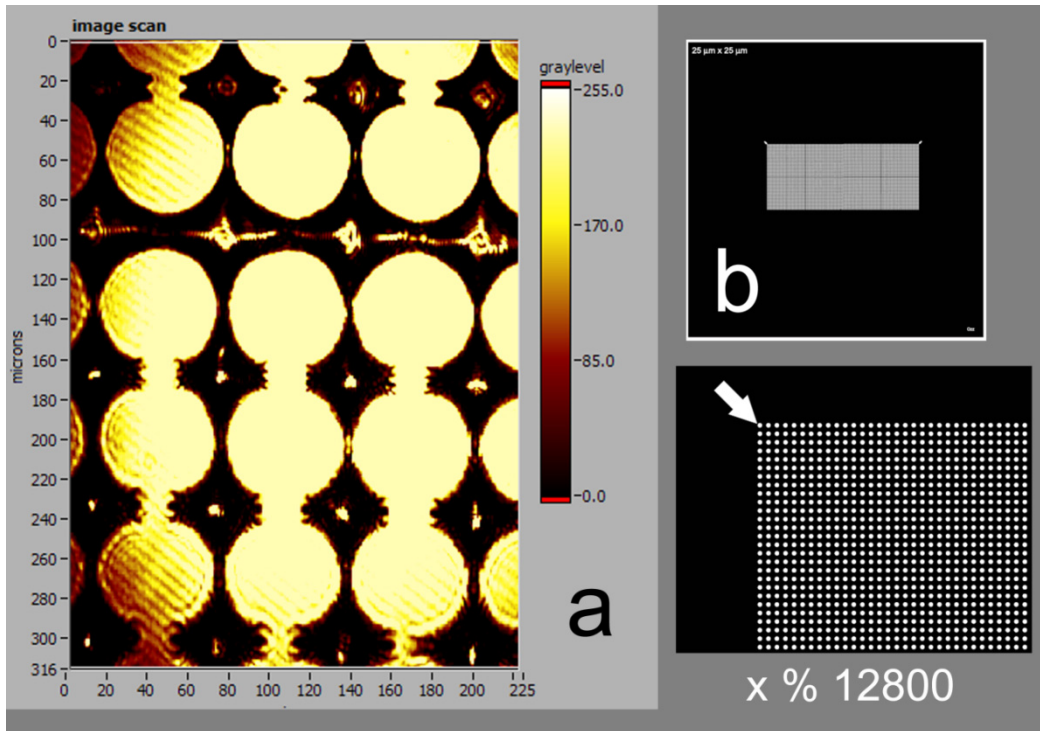
Fotorezist malzeme (Pozitif veya Pozitif-20) kullanım talimatına uygun olarak yüzeye uygulanmıştır. Desenlemede kullanılacak olan maskeler, CorelDraw® yazılımı kullanılarak ölçekli ve vektörel olarak çizilmiş ve bu haliyle profesyonel film yazıcıda bastırılmıştır.



Şekil 3.4.1 – Fotolitografi sisteminin şematik gösterimi

Maske filmlerinin CorelDraw çizimleri ile Au film üzerinde desenlerin elipsometrik görüntüleri Şekil 3.4.2’de verilmiştir. Görüldüğü gibi maske hazırlama basamağında 25 µm çapa ve 25 µm aralığa sahip noktacık desenler net bir şekilde oluşturulabilmektedir.

Fotorezist malzeme (Pozitif 20 veya Pozitif) ticari bir ürün olup, sprey formda uygulanmaktadır. Uygulama, imalatçının talimatlarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.2’de belirtildiği şekilde temizlenen substratlar, herhangi bir su kalıntısının uzaklaştırılması için etüvde kurutulmuştur. Spin-coating işlemi, fotorezist malzemenin el ile püskürtülmesi ve kaplama sisteminin hızının belirli aralıklarda yalnızca gerilim ayarlı güç kaynağı ile ayarlanabilmesi nedeniyle; yalnızca elde edilen filmin kalitesinin mikroskop ile kontrol edilmesi sonucu optimize edilmiştir.

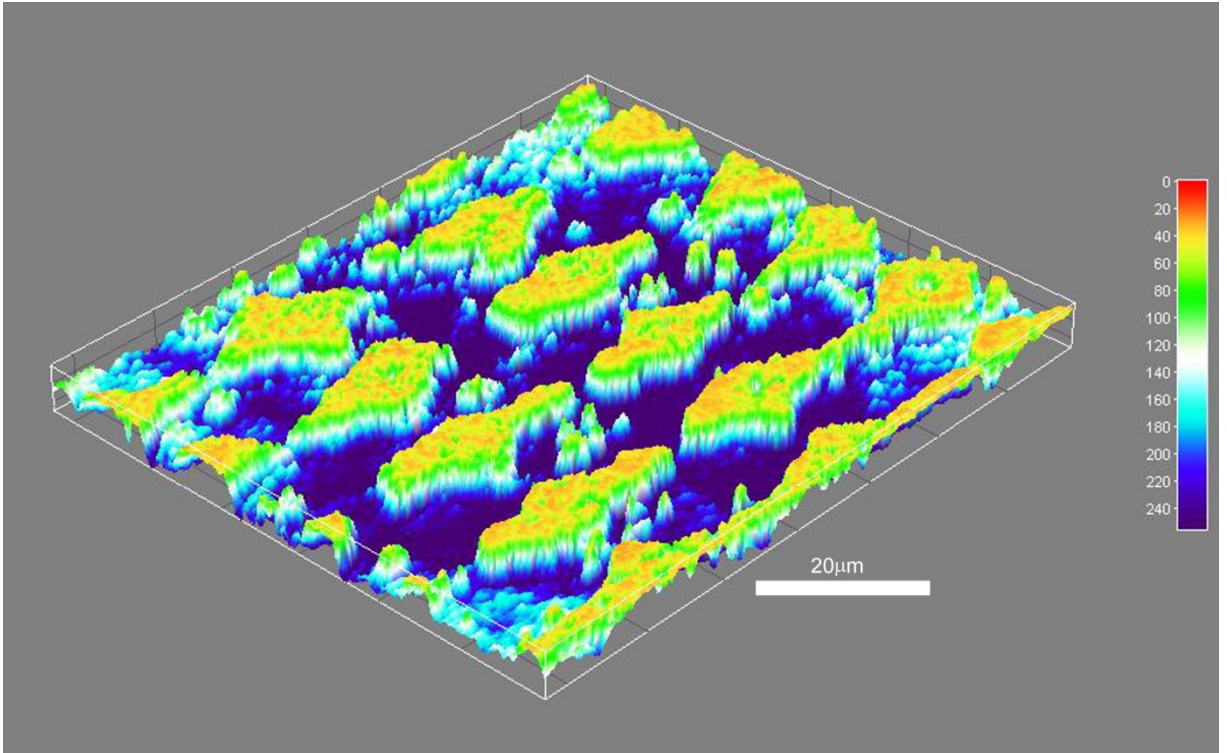


Şekil 3.4.2 – a) Au film üzerinde oluşturulan desenlerin elipsometrik 2D görüntüsü, b) 25 µm x 25 µm (nokta çapı x noktalar arası boşluk) noktaların 2,5 cm x 2,5 cm

film baskısında görünümü ve hazırlanan şablonun % 12800 büyütülmüş bir bölgesi.

Fotorezist malzemenin yüzeye uygulanmasını takiben ilk pişirme işlemi, 70 °C'ta (10 dakika) gerçekleştirildikten sonra, yüzey üzerine maske konularak 20 dakika süre ile UV ışığa (dalga boyu 365 nm) maruz bırakılmıştır. Maruz bırakma mesafesi ve süresi uygulanan filmin kalınlığına göre değiştirilmiştir. Optimum süre, elde edilen desenlerin mikroskop altında göz ile muayenesi sonucu belirlenmiştir. Uzun süreli ışığa maruz bırakma rezistin parçalanma hızını artırırken; desenlerin birleşmesi veya kaybolması gibi sorunlara neden olmaktadır (Şekil 3.4.3).

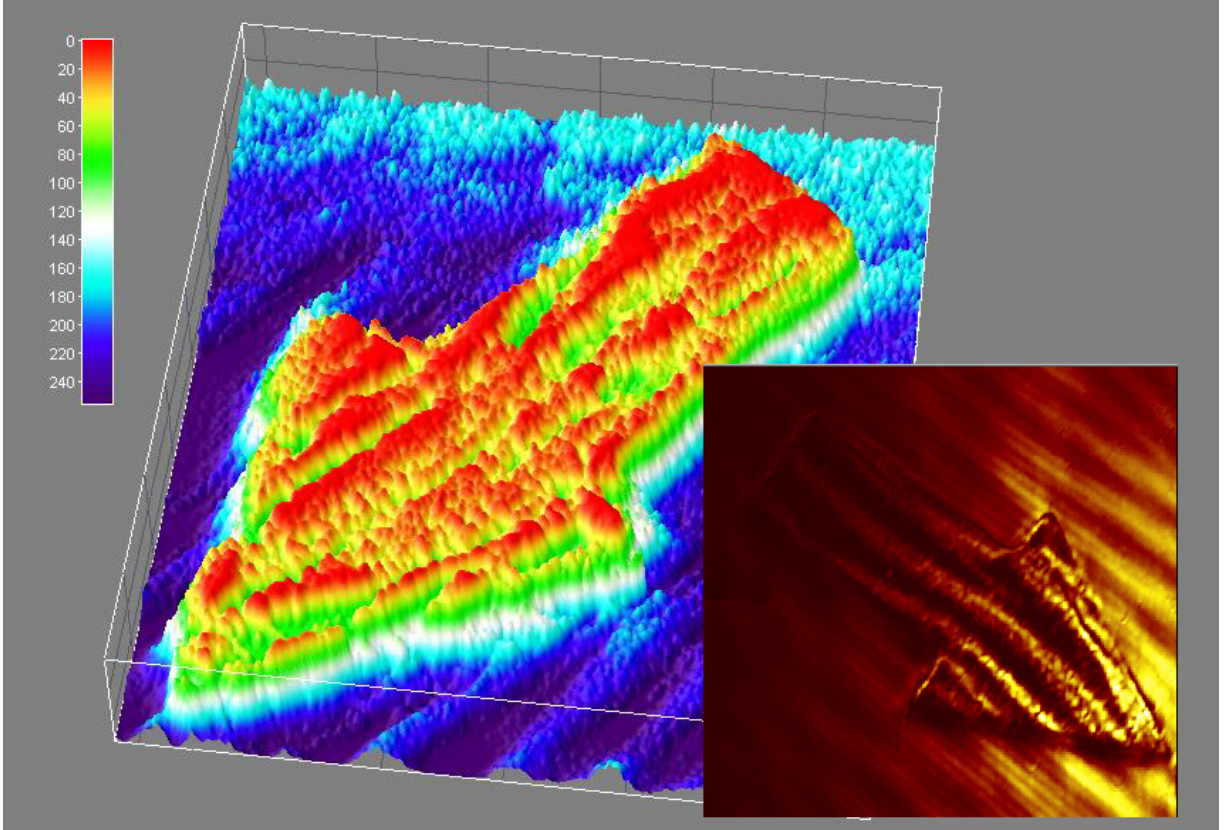
Hizalama ve titreşim önleme sisteminin bulunmaması nedeniyle, maske sınırlarındaki titreşim ve ışığın saçılarak yüzeye ulaşması, elde edilen desenlerin sınırlarında sorunlara neden olmaktadır. Bu nedenle, mevcut sistemde desenleme ile inilen en düşük çap, tekrarlanabilirlik açısından 50 µm olarak düşünülmüştür.



Şekil 3.4.3 – 20 µm çaplı noktacıklardan oluşan fotolitografi deseninin elipsometrik görüntüsü. Polimer film kalın olduğundan, elipsometrik olarak kalınlık

belirlenememiştir. Sağda görülen skala kalınlıklarının nitel karşılaştırılması için verilmiştir.

Ayrıca, maskelerin hazırlanma aşamasının kolaylığı ve tasarımın kullanıcı tarafından CorelDraw ® gibi bir ticari yazılımla yapılabilmesi, desenleme konusunda büyük oranda esneklik sağlamaktadır. Şekil 3.4.4’de desenleme sırasında desenlerin bulunmasını sağlamak amacıyla yerleştirilmiş (Şekil 3.4.2) bir ok işareti görülmektedir.

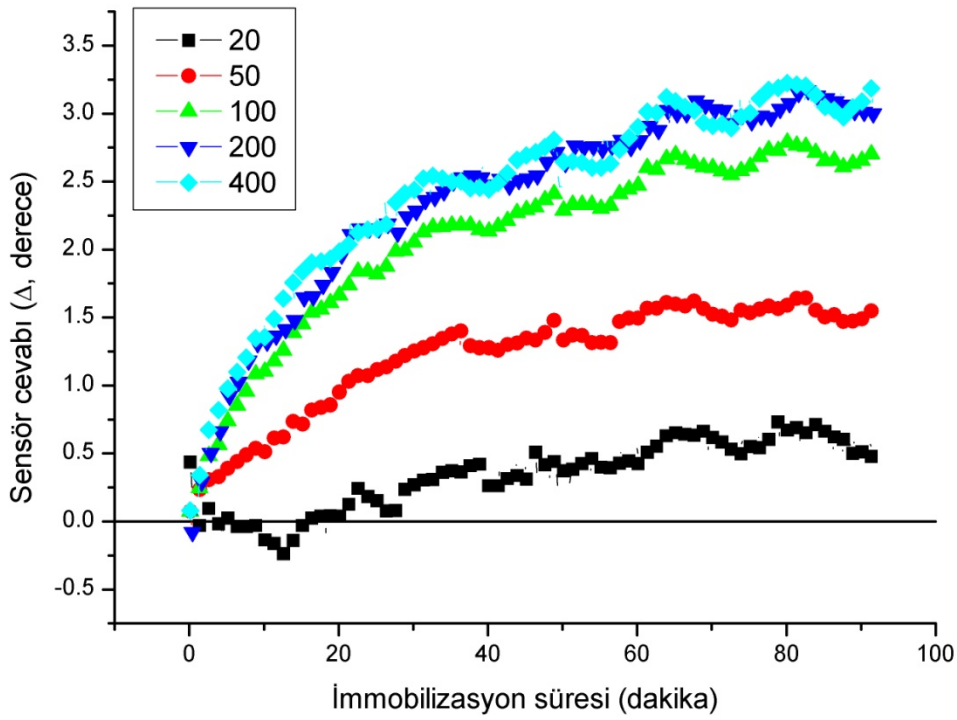


Şekil 3.4.4 – Fotolitografi ile elde edilmiş yüzeyde hatların keskinliği, görüntü alanı yaklaşık 200 μm x 200 μm ’dir.

3.5 Mikro-desenlemenin SPR sinyaline etkisi

Teorik olarak mikro-desenlenmiş yüzeylerde SPR sinyali alınması ile ilgili bir sınır bulunmamakla birlikte, desenleme sırasında fiziksel engellemeler nedeniyle (maske-ışık düzeninde ışık yönlendirici, titreşim önleyici, odaklama sistemi veya kontrollü atmosfer gibi bileşenlerin bulunmaması) oluşabilecek kısıtlamalar, optimum sinyalin alındığı mikro-desen boyutunun belirlenmesini gerektirmiştir. Bu amaçla, 20 μm noktacık – 400 μm noktacık arasında hazırlanan yüzeylerde, immobilizasyon sırasında elde edilen sinyal değerlendirilerek bir optimizasyon yapılmıştır (Şekil 3.5.1).

Optimizasyon çalışmasında, hazırlanan yüzeylere 1 mM MUA immobilize edilmiş ve immobilizasyon eş zamanlı incelenerek, sensör cevapları karşılaştırılmıştır.



Şekil 3.5.1 – Noktacık (dot) desenli SPR yüzeylerinde elde edilen MUA immobilizasyon sinyalinin karşılaştırılması (1mM MUA).

Şekil 3.5.1’de görüldüğü gibi, 20 µm ve 50 µm çaplı noktacık desenlerde alınan sensör sinyali, diğer konfigürasyonlardan düşüktür. 20 µm çaplı noktacık desende, maskeleme sırasında oluşan titreşim nedeniyle fotorezist malzeme maskenin gölgelediği yerlerde de UV ışına maruz kaldığından, fotorezist malzemenin giderilmesi işlemi sırasında noktacıkların açılması işleminde sorunla karşılaşılmıştır. Noktacıkların birbirleri ile birleşmemesi için bu işlem kısa tutulduğunda ise, SPR sensör yüzeyinde kalan fotorezist malzeme, MUA immobilizasyonunu engellemiştir. 20 µm noktacık deseninde alınan sinyal $0,628^{\circ} \pm 0,067^{\circ}$, aynı şekilde nispeten daha iyi temizlenebilen 50 µm deseninde ise alınan sinyal $1,560^{\circ} \pm 0,046^{\circ}$ olmuştur. Noktacık çapı genişlediğinde; Au filmin fotorezist ile kirlenmesi azaldığından ve noktacık desenler birbirleri ile birleşmeden elde edilebildiğinden, alınan sensör cevabı daha yüksek değere ulaşabilmiştir. 100 µm noktacık deseninde alınan sinyal $2,709^{\circ} \pm 0,055^{\circ}$ olurken, 200 µm ve 400 µm noktacık deseninde, alınabilecek maksimum sinyal elde edilmiş ve sırasıyla $3,089^{\circ} \pm 0,063^{\circ}$ ve $3,147^{\circ} \pm 0,092^{\circ}$ olarak bulunmuştur. Bu nedenle mevcut imkanlar dahilinde, noktacık desenli (veya hat desenli) yüzey çalışmalarında 200 µm desen 200 µm aralık olan yüzeyler ile çalışılması uygun görülmüştür.

3.6.Silikon (001) Yüzeyine Amino Sonlandırılmış, Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakaların Oluşturulması ve Düzenlenmesi

Tezin bu kısmında, sensör uygulamaları açısından yüzey fonksiyonelliğinin sağlanması amacıyla Silikon (Si 001) yüzeyine amino sonlandırılmış tek tabakaların oluşturulması incelenmiştir. Silikon yüzeyi üzerinde yapılan çalışmaların, cam yüzeyine yaklaşık olarak benzer performansta uygulanabilmesi mümkün olduğundan (her iki taban malzemede geçerli olan silan kimyası) bu tür bir çalışma cam substrat kullanılan sensör uygulamalarında da kullanılabilir.

Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (self assembled monolayers, SAM), yüzeye yüksek afinite gösteren kimyasal grup içeren moleküllerin, yüzey ile etkileştirilmesi ile hazırlanmaktadır. Tek tabakanın oluşması için gereken sürücü kuvvet, ilgili moleküllerin yüzeye kimyasal olarak tutunması ve moleküller arası etkileşimi içermektedir. SAM'lerin morfoloji ve kalınlıkları; molekül tipi, derişimi, çözeltinin türü ve kalitesi, sıcaklık, reaksiyon süresi ve yüzey özellikleri gibi bazı parametrelere bağlıdır. Tezin bu bölümünde Si (001) yüzeyinde N-(3-trimetoksipropil) dietilentriamin (TPDA) molekülü kullanılarak amino sonlandırılmış SAM oluşturulması amaçlanmıştır. SAM oluşumunda etkin olan daldırma (immobilizasyon) süresi, çözelti derişimi ve türünün etkisi incelenmiştir.

3.6.1. Deneysel çalışma

Bu aşamada kullanılan taban malzeme Si (n-tip Shin-etsu, Hondoutai, Japonya), 5 mm x 5 mm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Su ve etanol ile yıkanan substrat, hacimce %25'lik NH_3 , %30'luk H_2O_2 ve su karışımında (hacimce 1:1:5 oranında) 70 °C'ta 20 dakika süresince temizlenmiştir.

Temizlenen substratlar etanol ile yıkanmış ve azot ile kurutulmuştur. Hidrokarbon kalıntılarını uzaklaştırmak ve hidrofilik bir yüzey elde etmek amacıyla; temizlenen yüzeyler, modifikasyondan hemen önce 15 dakika süresince UV-ozon temizleme

cihazında (Irvine, CA, Model 42, Jelight Co., ABD) temizlenmiştir. Temizlenen yüzeylerin temas açısının 3°'den düşük olduğu belirlenmiştir. Bu düşük temas açısı, temizlenmiş yüzeydeki hidroksil gruplarının bir ölçüsüdür (Demirel ve ark., 2007).

Tek tabaka formasyonu oluşturmak için kullanılan TPDA çözeltileri, farklı derişimlerde mutlak etanol içerisinde taze olarak hazırlanmıştır. Deneylerde kullanılan TPDA derişimleri hacimce % 0,25; % 0,5, %1,0; %2,0; %4,0 ve %8,0'dir. Silikon yongalar farklı derişimlerdeki TPDA çözeltileri içerisinde belirli zaman aralıklarında daldırılmıştır. Otomatik temas açısı gönyometresi (model DSA 100, Krüss, Almanya) kullanılarak 25 °C'ta hava ortamında örnek yüzeylerinin durgun temas açıları ölçülmüştür. Tüm ölçümlerde standart sapma $\pm 1^\circ$ 'den küçüktür.

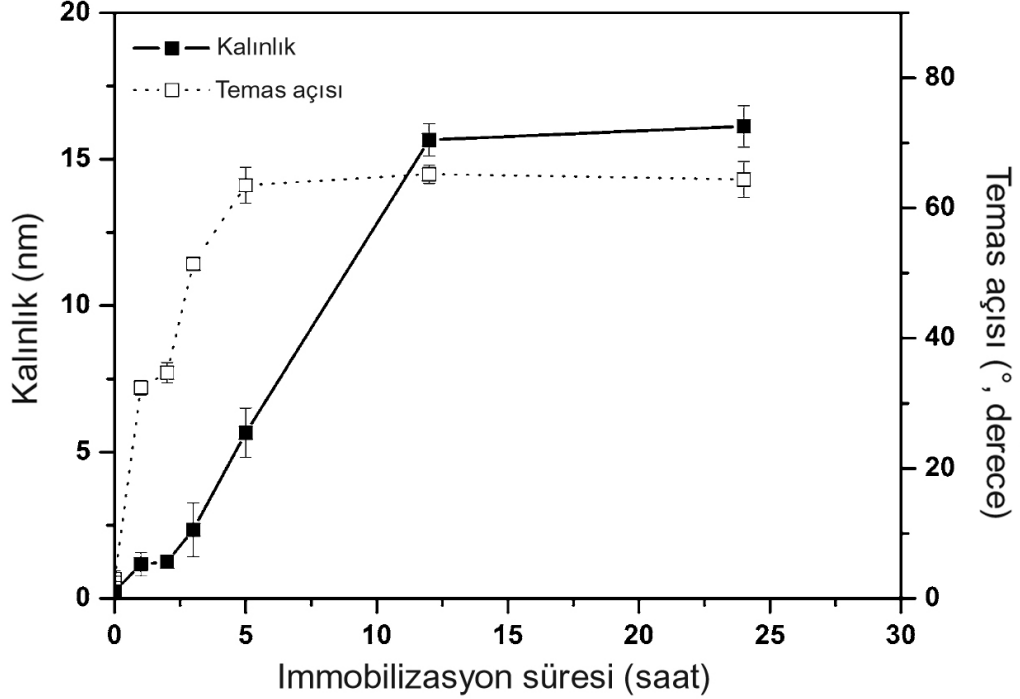
Yüzeyde organik madde birikimi nedeniyle oluşan kalınlık elipsometre (Nanofilm EP3, Almanya) kullanılarak 532 nm dalga boyunda 72° geliş açısında ölçülmüştür. Tabaka kalınlığı analizi sırasında, 50 μm x 50 μm alanda dört bölgeye otomatik sıfırlama (four zone auto nulling) işlemi uygulanmış, kalınlık cihazdaki modelleme program ile belirlenmiştir. Modelde dört tabaka yaklaşımı yapılmış ve sırasıyla silikon taban malzeme / SiO₂ / organik tabaka / hava tabakaları varsayılmıştır. Oldukça ince filmlerde kalınlık ile kırılma indisi orantılı olduğundan, tek tabaka için kırılma indisi (%100 dolu) 1,4600 alındığında, kalınlık verileri doluluk ile orantılı olur (Aspness, 1985). Modellemede kullanılan kırılma indisi değerleri sırasıyla 3,8650 Si substrat, 1,4605 SiO₂ tabakası ve 1,4600 organik tabakadır.

3.6.2. Sonuçlar ve tartışma

3.6.2.1. Daldırma süresinin etkisi

Öncelikle TPDA moleküllerinin formasyonuna daldırma süresinin etkisi incelenmiştir. Daldırma süresi, alkoksisilan moleküllerinin yüzey formasyonunda en önemli kriterlerden biridir (Tortech ve ark., 2005; Komeda ve ark., 1997). Daldırma süresinin TPDA formasyonuna etkisi yüzeye, % 1 (v/v) TPDA (etanolde) çözeltisinde 0 saat – 24 saat aralığında TPDA immobilize edilmesi ile belirlenmiştir. Si (001) yüzeyinde TPDA bağlanması ile kalınlık ve temas açısı

değişimi Şekil 3.6.1’de verilmiştir. Şekilde görüldüğü gibi, ilk iki saatte film kalınlığı 1,2 nm’ye ulaşmıştır.



Şekil 3.6.1- İmmobilizasyon süresinin, yüzey kalınlığı ve temas açısı değerlerine etkisi.

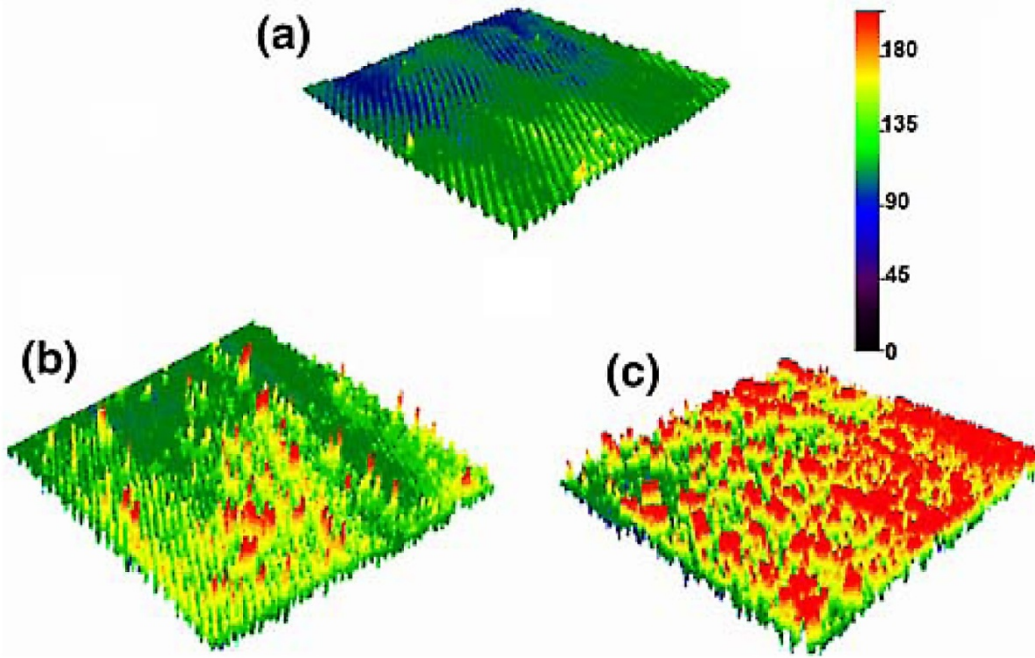
Teorik moleküler TPDA uzunluğu VASP (Vienna Ab initio Simulation Program) ile hesaplandığında 1,39 nm olarak bulunmuştur. İlk iki saatte TPDA'nın yüzeyde tek tabaka oluşturduğu söylenebilir. Ancak, 2 saatten daha fazla daldırma süresi kalınlıkta önemli bir artışa neden olmuştur. Bu artış çoklu tabaka oluşumunun gerçekleştiğini göstermektedir. Çoklu tabaka oluşumu, iki süreç sonucu gerçekleşebilir. Birinci süreçte, TPDA'nın su ile reaksiyona girmesi sonucu TPDA oligomerlerinin oluşması söz konusudur. Ancak, iki boyutta polimerleşmenin tamamlanması, zincir uzaması nedeniyle yüzeyde oluşan uzamsal kısıtlamalar sonucu tamamlanamamaktadır. Oligomerler, substrat yüzeyine difüze olduklarında; fiziksel etkileşim ile yüzeye tutunmaktadır. Daha sonra, yüzey grupları üzerinden (su eliminasyon reaksiyonu ile) Si-O-Si bağı yoluyla kimyasal olarak yüzeye bağlanmaktadır. Oligomerlerin alkil zincirleri, enerjilerini minimize

etmek için yüzey üzerinde *van der Waals* etkileşimleri yoluyla daha sıkı bir formasyon oluştururlar. Buradaki sürücü güç oligomerler arasındaki yatay etkileşimdir (iki boyutlu kondenzasyon). İki boyutlu oluşumda boşta kalan Si-OH grupları substrat yüzeyine bağlanmayı sağlamaktadır. Bu gruplar birden fazla TPDA molekülünün (oligomerik yapıların) çoklu tabakalar halinde yüzeye immobilize olmasına neden olmaktadır. Paralel olarak gerçekleşen ikinci süreç, TPDA moleküllerindeki amino gruplarının (NH_2 ve NH) metoksisilan grupları veya hidrolize olmuş metoksisilan uçları ile (Si-O-CH_3 , Si-OH) hidrojen veya iyonik bağ yapmasıdır. Böylece boş alanlara oligomerik yapıların yerleşmesi veya mevcut tek tabaka üzerine çoklu tabakalar halinde TPDA moleküllerinin birikmesi mümkündür. Bu birikim, silikon taban malzeme yüzeyinde çoklu tabakaların oluşumu için önemli bir alternatif reaksiyon mekanizmasıdır (Hozumi ve ark., 2001; Sugimura ve ark., 2002; Zhang ve ark., 2004). Ancak bahsi geçen proseslerden hangisinin çoklu tabaka oluşumunu gerçekleştirdiği veya ne kadar etkin oldukları henüz bilinmemektedir.

Su ile yapılan temas açıları deneyleri yüzey polaritesine bağlıdır ve hidrofiliğin bir göstergesi olarak kullanılmaktadır. Temas açısındaki değişiklikler hem yüzeydeki kimyasal bileşim değişikliği hem de yüzey doluluğu hakkında bilgi verebilmektedir (Kulkarni ve ark., 2005). Şekil 3.6.1'de temas açısı değişimleri de gösterilmiştir. Temiz bir Si yüzeyi (hidroksillenmemiş) genellikle 15° - 20° arasında bir temas açısı değerine sahiptir ve hidrofilik karakter gösterir. Hidroksillenmiş yüzey ise $<3^\circ$ 'lik bir temas açısı değerine sahiptir. Şekil 3.6.1'de TPDA'nın hidrofobik zincirleri (oligomerik formdaki hidrofobik yapılar) nedeniyle temas açısı değerlerinde bir artış görülmektedir. Daha uzun süreli daldırma sonucu daha yüksek temas açısı değerleri elde edilmekle birlikte, 12 saatlik daldırma sonucunda yüzeyin tamamen dolgunluğa ulaştığı görülmektedir. Örneğin, %1 (v/v) TPDA için elde edilen temas açısı değeri 1 saat için 33° ve 3 saat için 52° iken, 24 saat sonra ulaşılan yatışkın durum değeri $65^\circ \pm 2,1'$ 'dir. Bu değer, TPDA molekülleri ile yüzeyin tam olarak kaplandığı durumdaki değerdir. Literatürde, amino sonlandırılmış yüzeyler için ölçülen temas açıları değeri 23° ila 68° arasındadır (Demirel ve ark., 2007).

Şekil 3.6.2'de hidroksillenmiş Si (001) yüzeyine ve 2 saat ile 24 saat daldırma ile TPDA immobilize edilmiş iki örneğin 3 boyutlu elipsometrik görüntüsü verilmiştir.

TPDA immobilize edilmiş yüzeyler (Şekil 3.6.2 (b) ve Şekil 3.6.2 (c)), yüzey morfolojisi olarak hidroksillenmiş boş silikon yüzeyden tamamen farklıdır. Yüzeyde tek tabaka oluşumunun düzgün olmadığı ve bazı bölgelerde birikim bölgeleri oluşurken bazı bölgelerin nispeten düşük dolulukta olduğu görülmektedir. Kalınlık ölçümlerinde $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ 'lik alanın ortalama kalınlığı alındığından 2 saat içerisinde çoklu tabaka oluşumu başlamış olsa dahi nispeten uniform bir tek tabakanın oluştuğu görülmektedir (Şekil 3.6.2 b). Daha uzun sürede oligomerleşme ile birlikte nispeten düzgün ama çok tabakalı oluşum belirlenmiştir (Şekil 3.6.2 c).



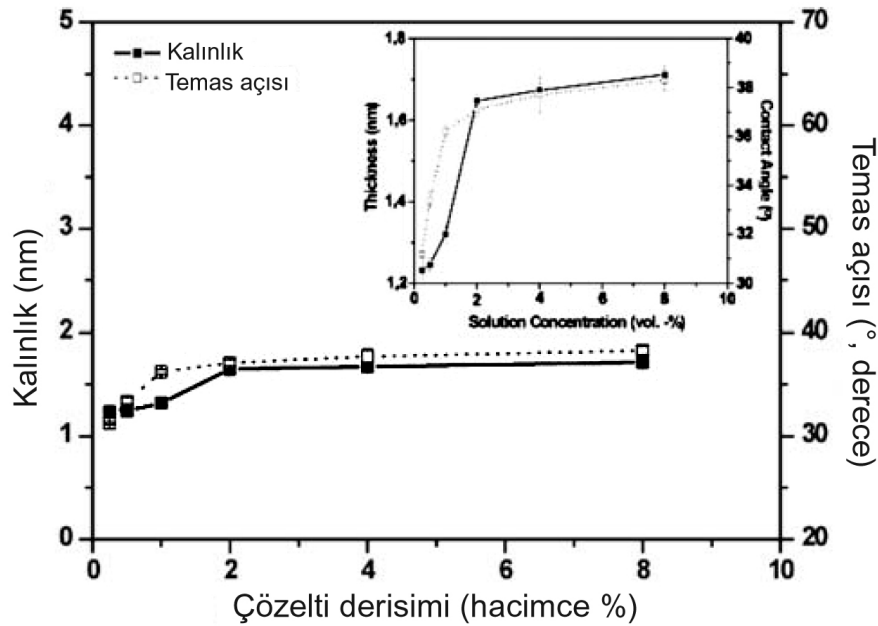
Şekil 3.6.2 - $50\ \mu\text{m} \times 50\ \mu\text{m}$ alanda elipsometrik 3 boyutlu görüntü a) Hidroksillenmiş silikon yüzeyi b) 2 saat sonra TPDA/Si (001) yüzeyi c) 24 saat sonra TPDA/Si (001) yüzeyi.

3.6.2.2. TPDA derişiminin etkisi

Farklı derişimlerde TPDA'nın etanoldeki çözeltisi (% 0,25 v/v ila % 8,0 v/v) kullanılarak 2 saat süresince oda sıcaklığında yapılan tabaka formasyonu çalışmaları, derişimin hidroksillenmiş silikon yüzeyinde TPDA formasyonuna

etkisi incelenmiştir. Şekil 3.6.3'te derişime bağılı olarak temas açısı ve film kalınlığındaki değışim gösterilmektedir. Şekil 3.6.3'te görüldüğü gibi kalınlık ve temas açısı değıerleri çok az değışmektedir. % 0,5 TPDA çözeltisi ile elde edilen kalınlık 1,24 nm iken % 2,0 ila % 8,0 TPDA kullanıldığında elde edilen kalınlık 1,64 nm – 1,71 nm aralığındadır. Farklı TPDA derişimleri kullanıldığında 2 saat içerisinde yüzeyin tek tabaka ile kaplandığı görülmektedir.

Şekil 3.6.3'te ayrıca temas açısı değışimi de verilmiştir. Kalınlık değışimine oranla nispeten daha fazla artış gösteren temas açısı değıerleri % 0,5 (v/v) ve % 2,0 (v/v) TPDA derişiminde, sırasıyla 33,2° ve 37,1° olarak bulunmuştur. Daha yüksek derişimlerde temas açısı fazla değışmemiş ve % 8,0 (v/v) TPDA için $38^{\circ} \pm 0,4^{\circ}$ 'ye ulaşmıştır. Şekil 3.6.3'te görüldüğü gibi, tek tabaka oluşumu için 2 saat sürenin ve % 2,0 (v/v) TPDA derişiminin yeterli olduğu görülmektedir. Bu durumda elde edilen temas açısı yaklaşık 38° olmaktadır.



Şekil 3.6.3 – TPDA derişiminin, yüzey kalınlığı ve temas açısına etkisi.

3.6.2.3. Çözücü türünün etkisi

Kendiliğinden düzenlenme, monomerik moleküllerin çözeltide birbirlerini tanınması ve dimer ile mezoskopik boyutlar arasında büyüklüğe sahip agregatlar oluşturması

sürecidir. Moleküllerin birbirini tanımasını sağlayan kuvvetler genellikle çözücü türüne bağlıdır. Örneğin, hidrojen bağları ile bir arada tutulan bir tek tabaka, su veya alkoller gibi hidrojen bağı yapan çözücülerde kararlı olamaz. Buna istinaden, hidrofobik etkileşimlerin SAM oluşumunda sürücü güç olduğu SAM'lerde, hidrofobik organik çözücülerin kullanılması SAM oluşumunu engeller (Martin ve ark., 2005). Çalışmanın bu bölümünde, farklı çözücüler (etanol, aseton, tetrahidrofuran ve benzen) kullanılarak %1 (v/v) TPDA çözeltileri hazırlanmış ve 2 saat süre ile hidroksillenmiş silikon yüzeyinde etkileştirilmiştir. Bu işlem sonucu TPDA formasyonu incelenerek çözücü tipinin etkisi incelenmiştir.

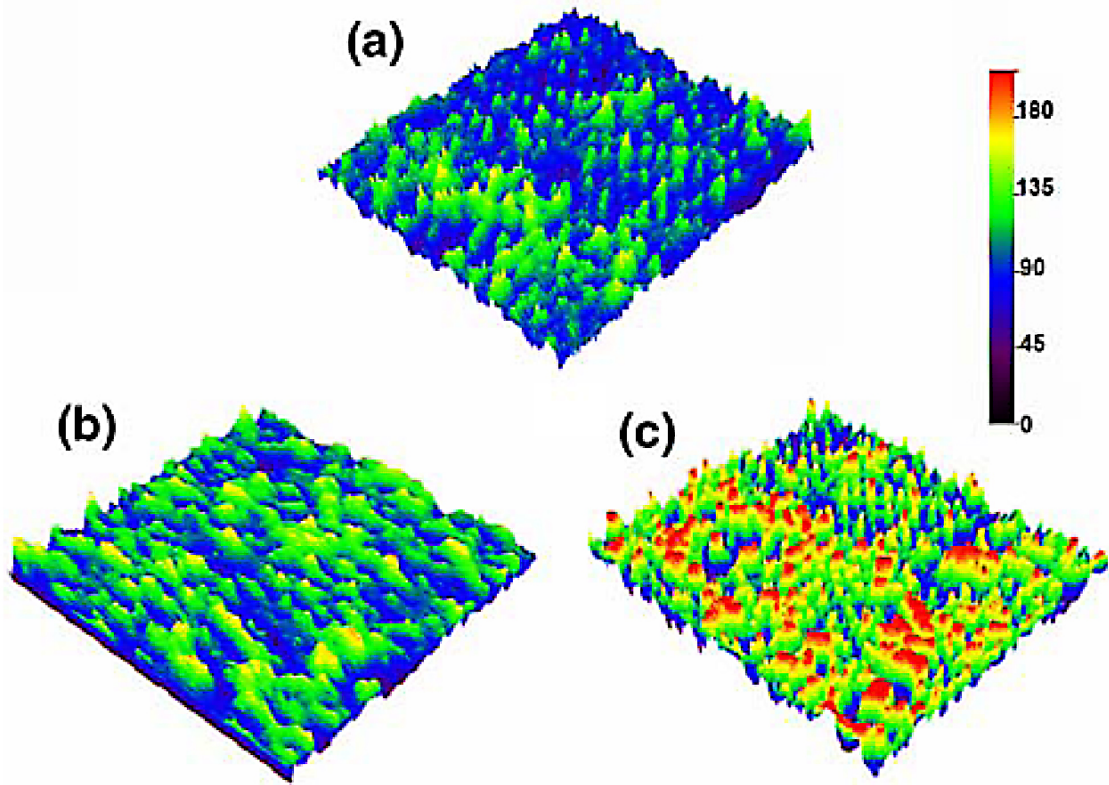
Çizelge 3.6.1'de çözücü türü, temas açıları ve ölçülen kalınlık değerleri verilmiştir. Etanol, aseton, THF ve benzen'in çözücü olarak kullanıldığı denemelerde TPDA tabakasının kalınlığı sırasıyla 1,45 nm, 1,90 nm, 2,86 nm ve 14,70 nm olarak belirlenmiştir. Benzen hariç diğer çözücüler ile elde edilen kalınlık ve temas açısı değerleri nispeten birbirine yakındır. Bu farklılık, bu çözücülerin dielektrik sabitleri ile ilişkilendirilebilir. Çözücüler dielektrik sabitleri etanol, aseton, THF ve benzen için sırasıyla 24,3; 20,7; 7,52 ve 2,28'dir.

Çizelge 3.6.1 – Farklı çözücülerde hazırlanmış TPDA ile elde edilen yüzeylere ait kalınlık ve temas açısı değerleri

Çözücü tipi	Kalınlık (nm)	Temas açısı (°, derece)
Etanol	1,45±0,02	37,4±0,6
Aseton	1,90±0,02	44,3±0,7
THF	2,86±0,01	41,2±0,9
Benzen	14,70±0,02	57,7±0,4

Benzen ile yüksek kalınlık ve temas açısı değerlerine ulaşılması şu şekilde açıklanabilir: dielektrik sabiti 4'ten büyük olan (ilk üç çözücü) SAM oluşturan TPDA molekülünün hidrofilik uç grubunu çözme eğilimindedir ve hidroksillenmiş silikon yüzeyinde SAM oluşumunu sağlar (Nie ve ark., 2006). Diğer taraftan, 4'ten daha

küçük dielektrik sabitine sahip çözücü (hidrofobik) ters miseller veya yapılar oluşturarak hidrofilik TPDA uç grup derişimini azaltarak SAM oluşumunu engeller. Benzenin düşük dielektrik sabitine (hidrofobikliğe) sahip olması, bu yapıların SAM oluşturmak yerine yüzeyde birikmesine neden olmaktadır. Bundan dolayı; TPDA tabakası daha büyük yapılar oluşturarak yüzeye bağlanmaktadır. Şekil 3.6.4'te verilen 3 boyutlu elipsometrik yüzey görüntülerinde, THF (Şekil 3.6.4 a) ve asetonda (Şekil 3.6.4 b) elde edilen yüzeylerin daha düzenli ve tek tabakalı, benzende elde edilen yüzeyin ise daha fazla agregat içeren (Şekil 3.6.4 c) yapıda olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.6.4 – 50 μm x 50 μm alana sahip yüzeyin 3D elipsometrik görüntüsü a) THF'te TPDA-Si (001) b) asetonda TPDA-Si (001) ve c) benzende TPDA-Si (001)

3.7. IgG'nin Hhidroksillenmiş Si (001) Yüzeyine Çoklu Basamaklı Kendiliğinden Düzenlenen Tabakalar Yaklaşımı ile Protein A Kullanılarak Yönlendirilmiş İmmobilizasyonu

Antibadi esaslı immünosensörler, klinik tanı, biyolojik araştırma ve çevre kontrolü gibi birçok alanda alternatif analiz yöntemi olarak ilgi çekmektedir (Wang ve Jin, 2003). İmmünosensörler genellikle yüzeye immobilize edilen bir antibadi tabakası ve bir fizikokimyasal dönüştürücüden oluşur. Ancak immobilize edilen antibadinin fromasyonunun kontrolü daha duyarlı analizlerin geliştirilmesi için gereklidir. Analiz duyarlılığı ve tekrarlanabilirliği, bağlanacak antibadi için uygun serbest yüzey alanına bağlıdır. Bu nedenle, bir immünosensör tasarımında en önemli basamak, antibadinin aktivitesini koruyarak doğru immobilizasyon yönteminin seçilmesidir. Katı yüzeyine immobilize edilen antibadi moleküler tabakasının iyi bir şekilde düzenlenmesi, immünosensör uygulamaları için hassasiyet ve duyarlılığı belirler (Lee ve ark., 2003). İmmunoglobulin G (IgG)'nin yüzeye fiziksel ve kimyasal immobilizasyonu ile ilgili çalışmalar literatürde mevcuttur (Kanno ve ark, 2000; Sigal ve ark., 1996). Günümüzde, basit olmasına rağmen proteinlerin denatüre olması ve bu nedenle tekrarlanabilirliğin ve duyarlılığın düşük olması nedeniyle, proteinlerin fiziksel olarak immobilizasyonu çok kullanılmaz. Kimyasal immobilizasyon yönteminde yüzey doluluğu ve tekrarlanabilirlik, yüzeye kovalent olarak bağlanmış proteinler nedeniyle daha yüksektir (Bae ve ark, 2005). Ancak, immünosensörlerin hassasiyetinin artırılması halen mevcut bir sorundur. İmmunoglobülin molekülü Y şeklinde bir moleküldür. Spesifik antijene bağlanmayı sağlayan iki adet Fab bölgesinden ve antibadi etkinleştirme fonksiyonu sağlayan bir Fc bölgesinden oluşmaktadır (Bae ve ark., 2005). IgG molekülleri düzensiz bir şekilde yüzeye immobilize edildiğinde, Fab bölgesinin açıkta kalmaması ve böylece antibadi-antijen etkileşiminin engellenmesi söz konusu olur. Ayrıca IgG moleküllerinin rastgele dizilimi biyolojik aktivite kaybına neden olur (Lu ve ark., 1996). Bu nedenle immünosensör hazırlanırken IgG'nin Fab bölgeleri yüzeyden dışarı doğru bakacak ve antibadi-antijen etkileşimini kolaylaştıracak şekilde yönlendirilerek immobilize edilmelidir. Antibadi yüzeyinin oldukça düzenli bir şekilde immobilize edilebilmesi için protein A molekülleri üzerine immobilize edilmesi uygundur. IgG moleküllerinin protein A üzerine Fc bölgesi üzerinden

bağlandığı ve bu sayede Fab bölgelerinin açıkta kaldığı bilinmektedir. Bu nedenle protein A ile yönlendirilen IgG uygulamalarında imüno-reaksiyon daha etkin olmakta ve algılama sisteminin performansı artmaktadır (Demirel ve ark., 2007).

Çalışmanın bu kısmında, 3-glisidoksipropil trimetoksisilan (GPTS) tabakasına 2-2'-(etilendioksi)dietilamin (EDA) yoluyla bağlanan protein A'dan oluşan ve taban malzemesi Si(001) olan yüzeye IgG'nin yönlendirilmiş olarak immobilizasyonu incelenmiştir.

3.7.1. Deneysel çalışma

Çalışmanın bu basamağında kullanılan Si (001) yüzeyler (n-tip, Shin-etsu, Handaoutui, Japonya) modifikasyondan önce Bölüm 3.2.2.1'de belirtildiği şekilde temizlenmiştir.

Tek tabaka oluşumu için, mutlak etil alkol içerisinde % 0,5 (v/v) ila % 1,0 (v/v) derişimlerinde hazırlanan 3-glisidoksipropil trimetoksisilan (GPTS) kullanılmıştır. GPTS tabakasının oluşması için belirli derişimdeki GPTS çözeltisi içerisinde Si (001) yüzeyin belirli sürelerde daldırılması ile daldırma süresi optimize edilmiştir.

GPTS modifiye edilmiş Si (001) yüzeyindeki epoksi uç gruplarının amino gruplarına dönüştürülmesi için, hazırlanan yüzeyler etanol içerisinde % 1,0 (v/v), % 2,0 (v/v) ve % 4,0 (v/v)'lük 2'-2(etilendioksi)dietil amin (EDA) içerisinde 1 saat – 24 saat süresince etkileştirilmiştir. Bu işlemin ardından amino uç grubuna sahip yüzeyler çözeltiden alınmış, etanol ile yıkanmış, etanolde 10 dakika süresince ultrasonik banyoda temizlenmiş ve azot ile kurutulmuştur. Ardından, 1 mg protein A, 10 mL pH 7,5 fosfat tamponu ve 0,1 mg 1-etil-3(3-dimetilaminopropil) karbodiimid (EDC) içeren çözeltide +4 °C'ta 24 saat bekletilerek protein A immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Protein A immobilize edilen yüzeyler bir kaç kez deiyonize su ile yıkandıktan sonra azot ile kurutulmuştur. Ardından, protein A immobilize edilen yüzeye floresanlı IgG immobilize edilmiştir. Floresanlı IgG immobilizasyon koşulları, 1 mL floresan etiketli IgG, 10 mL pH 7,5 fosfat tamponu içerisinde +4 °C'ta 24 saat

immobilizasyon süresi olarak belirlenmiş ve immobilizasyon işlemi bu koşullarda ve karanlık bir ortamda gerçekleştirilmiştir.

Yüzeylerin temas açıları Bölüm 3.6.1’de belirtilen cihaz ve yöntemle belirlenmiştir. Yüzeydeki organik tabakaların kalınlığı ise Bölüm 3.6.1’de belirtildiği şekilde ölçülmüş ve kalınlıkların belirlenmesi sırasında kurulan modelde, aynı bölümde belirtilen tabakalar ve algoritma kullanılmıştır.

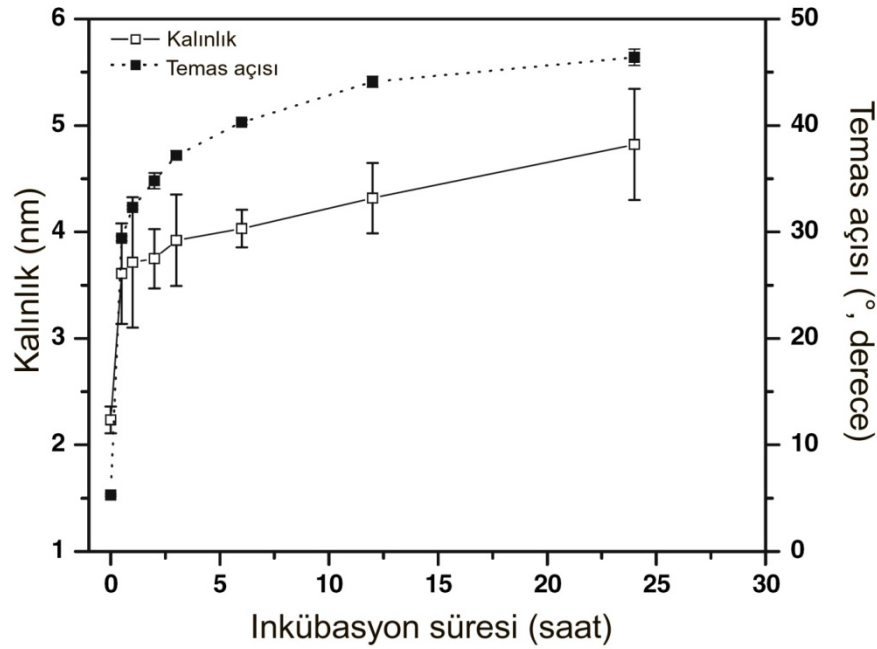
Floresan mikroskobu ölçümleri, civa lambalı floresan sistemi ile (Nikon, Eclipse E600, Japonya) gerçekleştirilmiş ve floresan etiketli IgG’ler görüntülenmiştir.

3.7.2. Sonuçlar

3.7.2.1. GPTS tek tabakası oluşumuna daldırma süresinin etkisi

Daldırma süresinin GPTS tek tabakasının oluşumuna etkisi, Si (001) substratın hacimce % 4,0’lük GPTS (etanol içerisinde) etkileştirilmesi (0,5 saat – 24 saat; oda sıcaklığı) sonucu belirlenmiştir. Önceki çalışmalarda, hidroksillenmiş Si (001) yüzeyine alkoksisilan immobilizasyonunda en uygun çözücünün etanol olduğu belirlenmiştir (Demirel ve ark., 2007; bkz. Bölüm 3.6). GPTS ile yapılan çalışmada da çözücü olarak etanol kullanılmıştır. Şekil 3.7.1’de GPTS immobilize edilmiş Si (001) yüzeyin daldırma süresi ile değişen kalınlık ve temas açısı değerleri gösterilmiştir. Boş hidroksillenmiş Si (001) yüzeyin kalınlığının 2,24 nm olduğu görülmektedir. Hidroksillenmiş yüzeyin oksitlenmeye ve organik bileşik biriktirmeye eğilimli olması, bu yüksek değerlerin yüzey pürüzlülüğünden kaynaklandığını düşündürmüştür. Ancak, burada ölçülen kalınlıklar optik kalınlıklar olup “etkin kalınlık” değerini vermektedir ve mutlak kalınlık değildir. Birinci saat sonunda GPTS kalınlığı 3,72 nm olarak bulunmuştur. Burada elde edilen kalınlık farkı (yaklaşık 1,5 nm) tek tabaka kalınlığına denk bir kalınlıktır. VASP (Viena Ab initio Simulation Pack) kullanılarak hesaplanan teorik GPTS molekül uzunluğu yaklaşık 1 nm’dir. Daha uzun immobilizasyon sürelerinde elde edilen kalınlık 24 saat için yaklaşık 5 nm’yi bulmuştur (fark olarak yaklaşık 2,5 nm). Yeniden düzenlenme ile birlikte bazı aglomeratların yüzeye birikmesi ile nispeten çoklu tabakaların

oluşması sonucu bu yaklaşık 2,5 nm'lik kalınlık değeri elde edilmiştir. Bu deneyin ardından Si yüzeyinde GPTS tek tabakasının oluşturulması için 1 saatlik immobilizasyon süresinin yeterli olduğuna karar verilmiştir. 1 saat süresinde elde edilen kalınlık değerinin 50 μm x 50 μm 'lik bir alanın ortalaması olduğu ve bazı aglomerasyonlar ile birlikte bazı nispeten boş bölgelerin de bulunabileceği unutulmamalıdır. Ancak tek tabakadan bahsederken, yüzey doluluğunun sonraki basamaklardaki modifikasyonlar için uygun olduğuna karar verilmiştir.

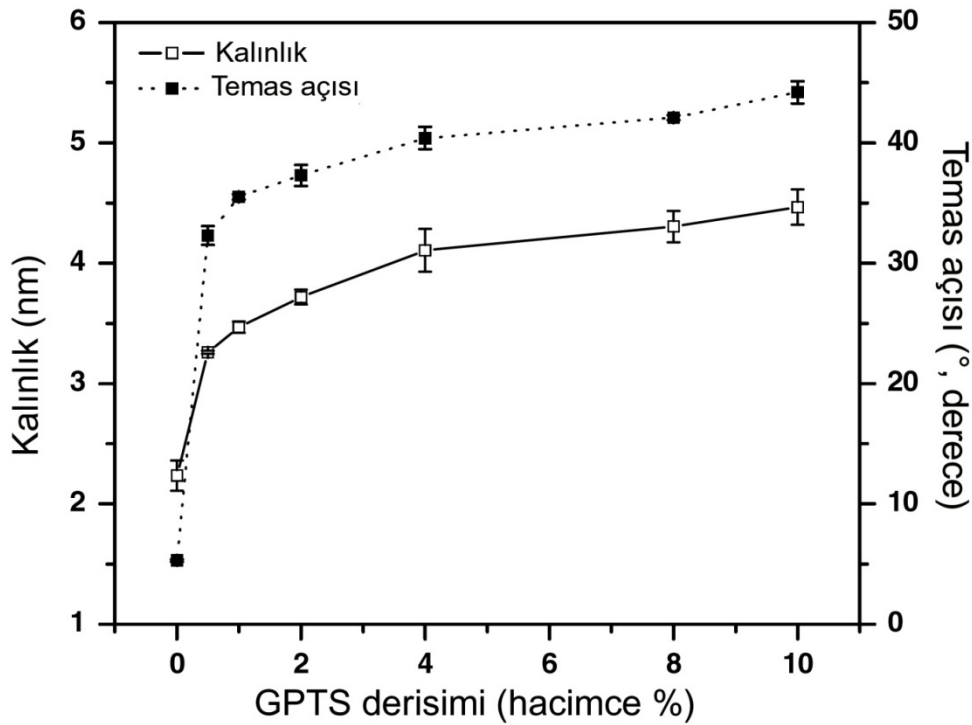


Şekil 3.7.1 – Daldırma süresi ile yüzeydeki GPTS kalınlığının ve temas açısının değişimi (GPTS derişimi hacimce % 1,0)

Yüzey temas açısındaki değişim hem yüzeyin kimyasal bileşimini, hem de yüzey doluluk miktarını gösterdiği bilinmektedir. GPTS molekülleri hidroksillenmiş Si yüzeyini daha hidrofobik hale getirilmekte ve 1 saat daldırma süresinin ardından 32°'lik bir temas açısı değeri elde edilmektedir. Yukarıda belirtilen kalınlık verisi de dikkate alındığında daha uzun süreli daldırma işlemi temas açısı değerlerini oldukça değiştirmemekle birlikte 24 saat içerisinde daha sıkı bir tek tabaka oluşumuna işaret eden 46°'lik temas açısı değerine ulaşılmaktadır.

3.7.2.2. GPTS derişiminin GPTS formasyonuna etkisi

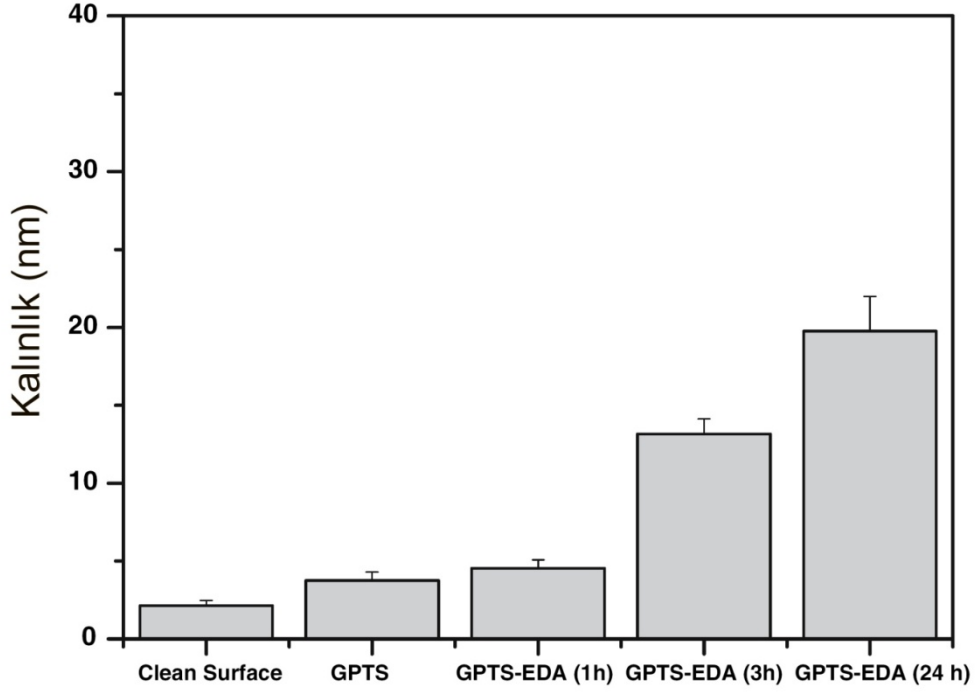
Kullanılan GPTS çözeltisi derişiminin hidroksillenmiş silikon substrat üzerinde oluşan GPTS tabakasının kalınlık ve temas açısı değerlerine etkisi, 1 saat etkileşim süresi sabit tutularak % 0,5 (v/v) GPTS ile % 10,0 (v/v) GPTS derişimi (etanolda) aralığında incelenmiştir. Şekil 3.7.2'de görüldüğü gibi, oluşan GPTS tabakasının kalınlığı, bu geniş derişim aralığında 3,47 nm ile 4,16 nm arasında değişmiş ve hafif bir artış göstermiştir. Önceki bölümde belirtildiği gibi, yüksek GPTS derişimlerinde 1 saat içerisinde, muhtemelen sıkı istiflenmiş ve yüzeyin tamamını kaplayan bir tek tabaka elde edilmiştir. Şekil 3.7.2'de ayrıca, GPTS bağlanması ile birlikte yüzey temas açısının değişimi de gösterilmiştir. Bu değişim verileri, kalınlık değişimi ile uyumlu sonuçlar vermiştir. Elde edilen en yüksek temas açısı 44° çıkmıştır, bu değer tek tabaka yüzey oluşumuna karşılık gelir.



Şekil 3.7.2 - GPTS derişiminin, yüzeyde oluşan GPTS tabakası kalınlığı ve temas açısı değerlerine etkisi (daldırma süresi 1 saat).

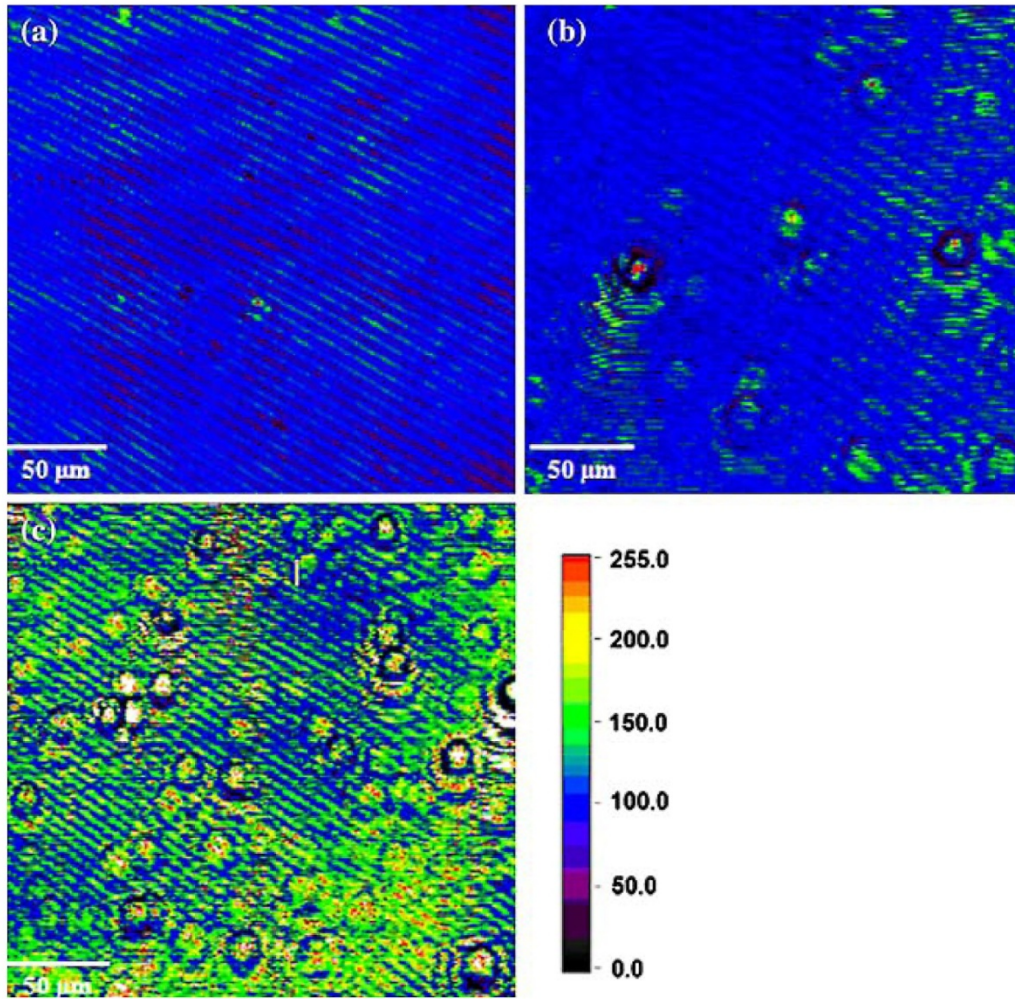
3.7.2.3 EDA'nın modifiye Si (001) yüzeyine bağlanması

Amino uç gruplarına sahip kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (SAM), immünosensörler, biyoçipler vb. gibi nanobiyoteknoloji uygulamalarında fonksiyonel yüzeyler oluşturmak için kullanılır (Wang ve ark., 2005; Li ve ark., 2007; Zhang ve ark., 2004; Yang ve ark., 2006). Çalışmalarda, amin sonlandırılmış yüzey elde etmek için tek tabaka oluşumunda optimum değerler olan % 4 (v/v) GPTS'in etanoldeki çözeltisi, oda sıcaklığında 1 saat süre ile immobilize edilmiş ve bilinen bir diamin olan 2-2'(etilendioksi) dietilenamin (EDA) ile reaksiyona tabi tutulmuştur. EDA moleküllerinin yüzeyde tek tabaka halindeki GPTS'in açıkta olan epoksi grupları ile kovalent bağ yapması sonucu, diğer amino sonlanmış uç çözelti tarafında kalarak amin sonlu yüzey elde edilmesi amaçlanmıştır. EDA molekülleri nispeten esnek moleküller olup, protein A immobilizasyonu için uygun uzatma kolu (spacer arm) işlevini de görür. EDA ile işlem, hacimce %2 (v/v)'lik etanoldeki EDA çözeltisinde, oda sıcaklığında 1 saat, 3 saat ve 24 saat süre ile bekletilerek gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.7.3'te görüldüğü gibi, yüzeyde biriken EDA kalınlığı reaksiyon süresine bağlıdır ve 1 saat, 3 saat ve 24 saat için ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 4,54 nm, 13,16 nm ve 19,77 nm olarak bulunmuştur. Kalınlıktaki reaksiyon süresine bağlı artış şu şekilde açıklanabilir: EDA moleküllerinin bir yönündeki amino grupları yüzeydeki GPTS moleküllerinin epoksi grupları ile hızlı bir reaksiyon verir. Ancak, çözeltideki EDA molekülleri, yüzeydeki veya çözeltideki diğer EDA molekülleri ile hidrojen bağı veya iyonik bağ oluşturarak, gerek yüzeyde birikme, gerekse kendi aralarında agregat oluşturma eğilimindedir. Hem EDA moleküllerinin hem de agregatların yüzeye tutunmaları, yüzeyde birikime neden olmaktadır. Bunun sonucunda, yüzeyin ortalama kalınlığı artmaktadır.



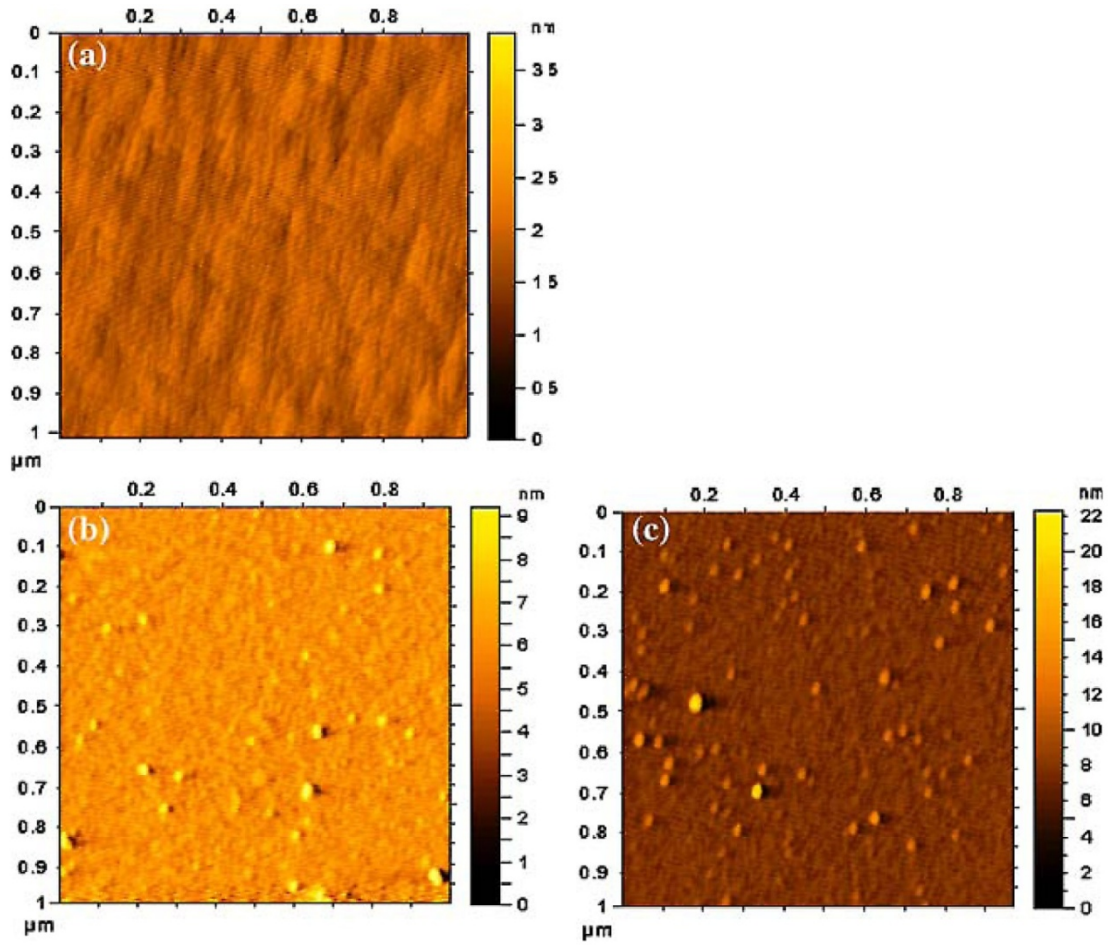
Şekil 3.7.3- EDA-GPTS tabaka kalınlığına EDA ile reaksiyon süresinin etkisi. EDA derişimi hacimce %2.

EDA derişiminin EDA üst tabakası kalınlığına etkisi de, hacimce % 1,0; % 2,0 ve % 4,0'lük EDA çözeltisi (mutlak etanol içerisinde) kullanılarak, oda sıcaklığında 3 saat etkileştirme süresinde incelenmiştir. Bu işlemler sırasında üst tabakanın kalınlığı önemli bir miktarda değişmemiş ve $12,2 \text{ nm} \pm 1,3 \text{ nm}$ olarak ölçülmüştür. Şekil 3.7.4'te EDA ile işlem görmemiş GPTS tabakası (GPTS-Si (001)), 3 saat süre ile EDA bağlanmış GPTS tabakası (EDA/3h-GPTS-Si(001)) ve 24 saat süre ile EDA bağlanmış GPTS tabakasının (EDA/24h-GPTS-Si(001)) yüzeylerinin 2 boyutlu elipsometrik görüntüleri gösterilmiştir. Şekil 3.7.4'te gösterildiği gibi, bu yüzeylerin yüzey morfolojileri nispeten farklıdır. GPTS-Si(001) yüzeylerinin EDA çözeltisi ile işlem görmesi sonucu EDA formasyonu yaklaşık tek tabaka şeklinde gerçekleşmektedir (Şekil 3.7.4 b- düzenli yüzey). Şekilde görülen dairesel yapılar EDA agregatları olup, 24 saat sonunda bu agregatların aşırı derecede arttığı görülmektedir (Şekil 3.7.4 c).



Şekil 3.7.4 - Çeşitli yüzeylerin iki boyutlu elipsometrik görüntüleri a) GPTS-Si (001), EDA bağlanmamış yüzey b) EDA/3h-GPTS-Si(001) ve c) EDA/24h-GPTS-Si(001)

Şekil 3.7.5'te, Şekil 3.7.4'te 2 boyutlu elipsometrik görüntüleri alınan yüzeylerin AFM görüntüleri gösterilmiştir. GPTS-Si (001) yüzeyi nispeten homojenken, EDA ile reaksiyon sonucu yüzey morfolojisi değişmiştir ve 2 boyutlu elipsometrik görüntülerde görülen dairesel yapılar AFM görüntüsünde daha açık bir şekilde görülmektedir. Yüzeylerin root-mean-square (RMS) değerleri GPTS-Si (001), EDA/3h-GPTS-Si(001) ve EDA/24h-GPTS-Si(001) yüzeyleri için sırasıyla 0,303 nm; 0,629 nm ve 0,962 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 3.7.5 - Üç farklı yüzeye ait AFM görüntüleri, a) GPTS-Si (001), EDA bağlanmamış yüzey b) EDA/3h-GPTS-Si(001) ve c) EDA/24h-GPTS-Si(001).

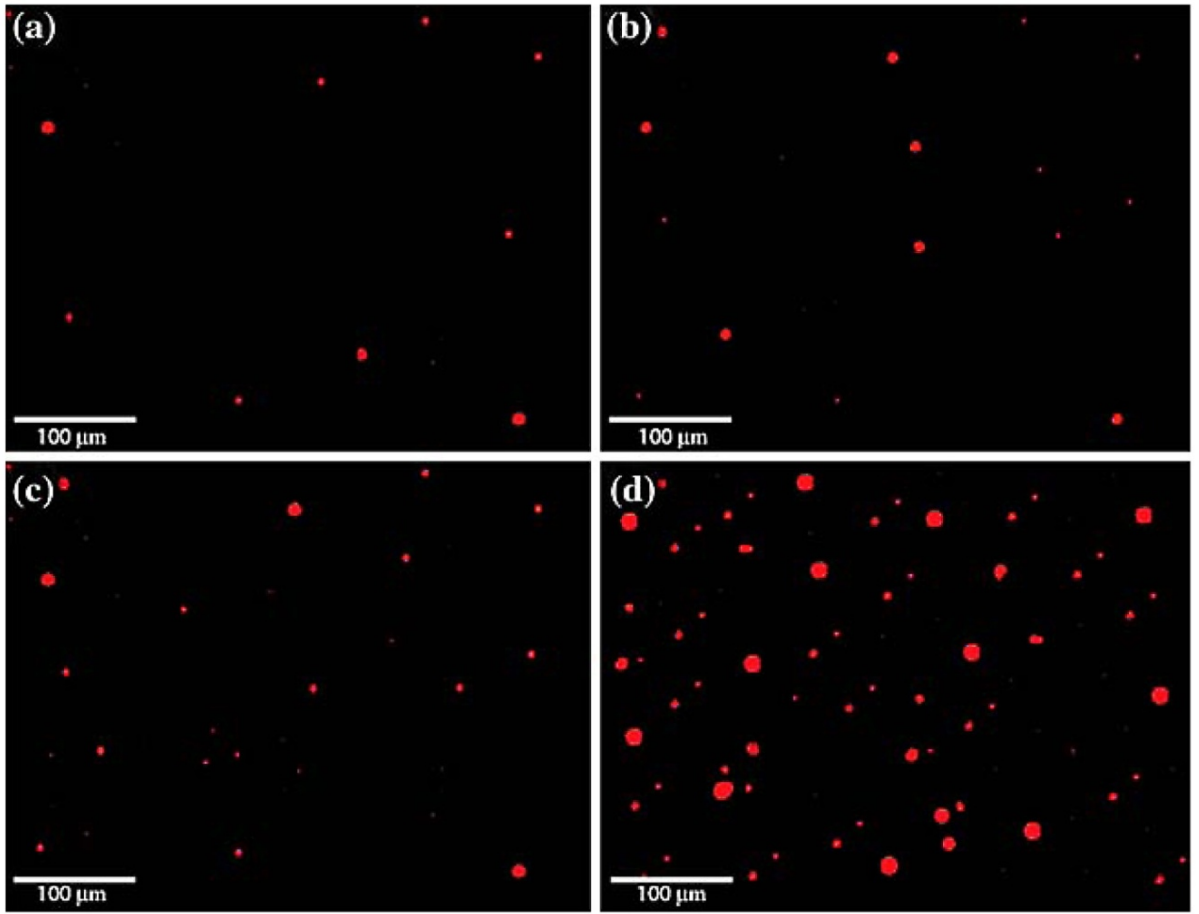
3.7.2.4 Protein A ve yönlendirilmiş IgG immobilizasyonu

İmmünoafinite sistemlerinde, biyoafinite ile ayırma veya tanı amacıyla kullanılacak yüzeye, biyoligandın (genellikle bir antibadi) immobilizasyonu en önemli basamaktır. Çalışmanın bu bölümünde, IgG moleküllerinin Fc fragmenti ile etkileşime girerek Fab fragmentinin açıkta bırakılmasını sağlayan ve bu sayede, komplementer molekül ile uygun bir etkileşim sağlayan protein A molekülleri kullanılmış ve yönlendirilmiş IgG immobilizasyonu incelenmiştir (Bae ve ark., 2005).

Şekil 3.7.6- Çoklu tabaka oluşumunun şematik gösterimi



Şekil 3.7.7 (a) – Şekil 3.7.7 (d)'de floresan mikroskobu ile alınan floresanlı IgG görüntüleri gösterilmiştir. Beklenildiği gibi, birkaç yıkamaya rağmen EDA/3h-GPTS-Si(001) ve EDA/24h-GPTS-Si(001) yüzeylerinde kovalent olarak bağlanmış, protein A mevcut olmayan yüzeyde birikmiş moleküllere ait çok az sayıda floresan sinyali alınmıştır. Ancak, uzun süre EDA ile muamele edildikten sonra (24 saat, Şekil 3.7.7 d) protein A immobilize edilmiş ve ardından floresanlı IgG ile etkileştirilmiş yüzeyde daha yüksek floresan sinyali alınmıştır. Dikkat edilirse, floresan sinyali alınan alanlar, nokta şeklinde dairesel yapılardır. Bu yapılar, Şekil 3.7.4 ve Şekil 3.7.5'te elde edilen görüntülerle benzerlik göstermektedir.



Şekil 3.7.7- 4 yüzeye ait floresan mikroskobu görüntüleri a) IgG-EDA/3h-GPTS-Si(001) b) IgG-EDA/24h-GPTS-Si(001) c) IgG-protein A-EDA/3h-GPTS-Si(001) d) IgG-protein A-EDA/24h-GPTS-Si(001) yüzeyleri

EDA agregatları olarak tahmin edilen bu birikim bölgelerinde, daha yüksek miktarda protein A immobilize edilmiş ve bu nedenle yönelmiş IgG'nin bu bölgelerde yoğunlaşmış olduğu düşünülmüştür. Karanlık olan kısımlarda, immobilize edilen IgG'nin nispeten düşük miktarda olması, yeterli floresan sinyali alınmamasına neden olmuş olabilir. Floresan mikroskobu ile yapılan bu gösterimde, protein A sonlandırılmış yüzeye IgG moleküllerinin Fc bölgesinden bağlandığı ve Fab uçlarının (floresanlı) açıkta kaldığı gösterilmiştir.

3.8. Elipsometre esaslı DNA biyosensörü

Düşük maliyetli DNA esaslı sensör cihazlarının geliştirilmesi ve üretimi halen üzerinde çalışılan bir konudur (Cheung ve ark., 2003; Wang, 2000). DNA esaslı analitik cihazların performansını artırmak için, DNA yüzey etkileşimlerinin tam olarak anlaşılması gerekir. Taban malzemenin yüzey özellikleri, DNA prob moleküllerinin immobilizasyonuna önemli derecede etki eder (Herne ve Tarlov, 1997). DNA immobilizasyonu için silikon yonga veya cam substrat, genellikle amino- epoksi- veya merkaptosilanlar gibi, DNA'nın serbest amino, epoksi veya tiyol grupları üzerinden kovalent olarak bağlanması için, bir başka kimyasal tabaka ile kaplanır. Bu nedenle DNA'nın kaplama yüzeyi ile etkileşiminin yanında, kaplama yüzeyinde kullanılan kimyasalın taban malzeme ile etkileşimi de önemlidir. Silikon yüzeyi üzerine DNA immobilizasyonu ile ilgili çalışmalarda (Herne ve Tarlov, 1997; Cheung ve ark., 2003; Lenigk ve ark., 2001), kaplama yüzeyinin taban malzeme ile etkileşi detaylı olarak araştırılmıştır. Çalışmanın bu bölümünde, 3-merkaptopropil trimetoksisilan (MPTS) ve 5'-tiyollenmiş oligodeoksinükleotid (ODN) prob, Si(001) yüzeyine immobilize edilmiş ve bu yüzeyin DNA tanısında kullanımı incelenmiştir.

3.8.1. Deneysel çalışma

Deneyde kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich (ABD)'den temin edilmiştir. Çalışmada kullanılan silikon yüzey, Si (001) (n-tip, Shun-etsu, Hondoutai, Japonya) sonraki modifikasyonlar için 5 mm x 5 mm'lik parçalar halinde kesilmiştir. Hidroksillenmiş yüzey hazırlığı ile temizliği Bölüm 3.6.1'de gösterildiği şekilde yapılmıştır. Yüzey temas açısı (su ile) Bölüm 3.6.1'de belirtilen cihaz ve yöntemle yapılmıştır.

Hidroksillenmiş silikon yüzeyin hazırlanmasının ardından, mutlak etanol içerisinde farklı derişimlerde 3-merkaptopropil trimetoksisilan (MPTS) çözeltisi hazırlanmıştır (hacimce %0,5 ila %10,0). Hazırlanan bu yüzeyler farklı sürelerde (0 saat – 24

saat) MPTS çözeltisi içerisinde immobilizasyona tabi tutulmuştur. Tiyol sonlandırılmış substratlar immobilizasyonun ardından, deiyonize su ile yıkanmış ve 10 dakika süresince etanol içerisinde ultrasonik banyoda temizlenmiştir. Örneklerin tabaka oluşumundan sonraki yüzey temas açıları Bölüm 3.6.1’de belirtilen cihaz ve yöntemle analiz edilmiştir. Yüzey kalınlıkları ise elipsometre kullanılarak, Bölüm 3.6.1’de belirtilen cihaz ve yöntemler ile belirlenmiştir.

5’tiyol modifiye oligonükleotidlerin (HS-(CH₂)₆-(T)₁₅-CAC CCT CGG GTG CTG TC) silikon yüzeye immobilizasyonu tiyol/disülfid değişim reaksiyonu yoluyla MPTS tabakası üzerine gerçekleştirilmiştir. ODN problemleri, pH 7,4’te hazırlanan fosfat tamponu kullanılarak 0,25 µM ila 2,0 µM aralığında derişime sahip olacak şekilde seyreltilmiştir. Immobilizasyon işlemi 0 dakika ila 120 dakika süresince gerçekleştirilmiş, immobilizasyonun ardından yüzeyler tampon çözelti ile yıkandıktan sonra azot ile kurutulmuştur.

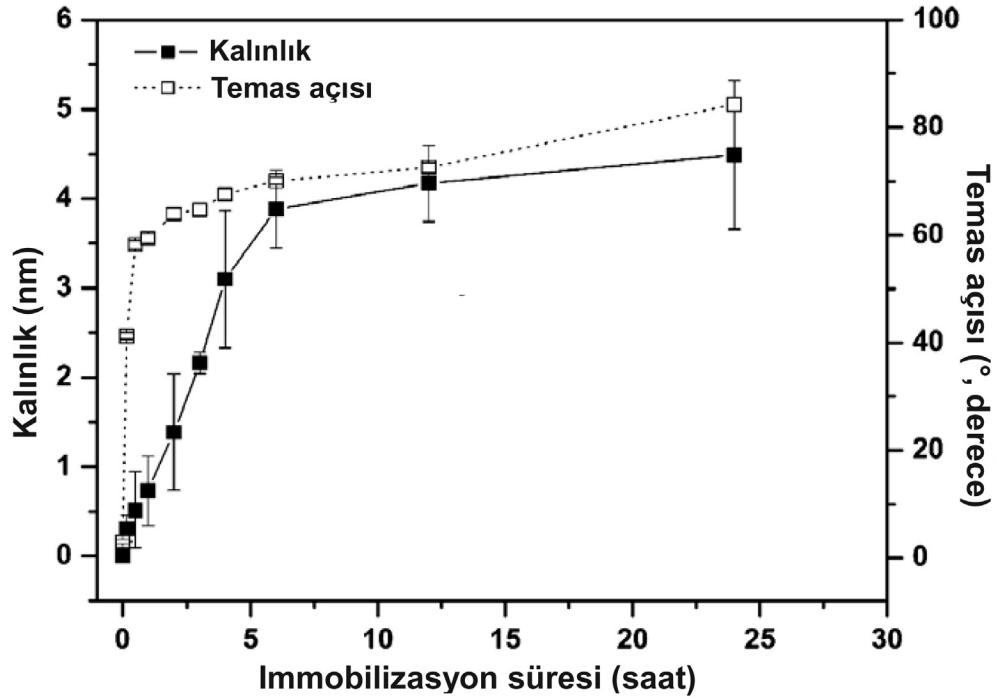
Proba özgü hedef sırasını içeren (GTG GGA GCC CAC GAC AG) hedef ON, 0,05 µM ila 2,0 µM derişim aralığında olacak şekilde fosfat tamponu içerisinde (pH 7,4) çözülmesi ile elde edilen hibridizasyon çözeltisinin, 25 °C’ta, akış hücrelerine sahip elipsometreye 5 µL/dakika hızla enjekte edilmesi ve bu esnada reaksiyonun eş zamanlı olarak gözlemlenmesi ile hibridizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bağlanma sırasında değişen sinyal, Δ (derece) cinsinden verilmiştir. Aynı uzunluğa sahip ancak tam eşdeğer sıralamaya sahip olmayan bir ON hedef (GTC TTA ACG TCA CCT TC) kullanılarak yukarıda belirtildiği şekilde bir kontrol deneyi gerçekleştirilmiştir.

3.8.2. Sonuçlar

3.8.2.1 Silikon yüzeyine MPTS immobilizasyonu

Şekil 3.8.1’de farklı daldırma süresine bağlı olarak MPTS kalınlığı ve yüzeyin temas açısındaki değişim verilmiştir. Hidroksillenmiş silikon yüzeyinin kalınlığı 2,24 nm olarak bulunmuştur. Bu yüksek değer ıslak yüzey temizliği sırasında oluşan yüzey pürüzlülüğünün bir sonucudur. Ayrıca; elipsometrik ölçümler atmosfere açık

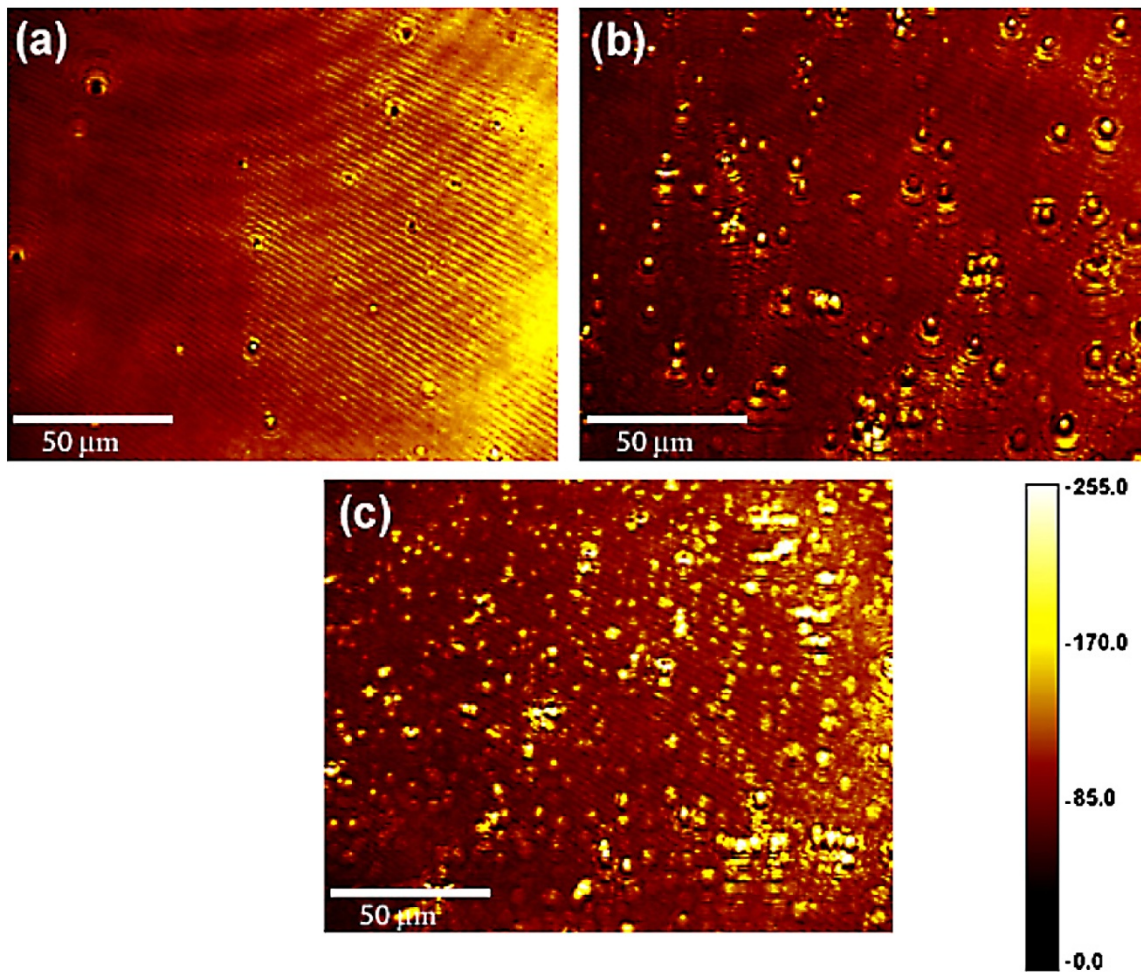
olarak yapıldığından, ölçümler sırasında hidroksillenmiş yüzeyin hemen oksitlenmesi ve kirlilik birikimi de mümkündür. Bu nedenle, Şekil 3.8.1’de ve daha sonra kalınlık değerleri, daha açık ifade edilebilmesi için normalize edilerek sunulmuştur. Normalizasyon sırasında, modifikasyon işleminden önce ölçülen yüzey kalınlığı, işlem sonrasında elde edilen yüzey kalınlığı değerlerinden çıkarılmıştır. 1 saat sonra elde edilen yüzey kalınlığı 0,73 nm’dir ve yaklaşık tek tabaka kalınlığına denk gelmektedir. MPTS’nin literatürde verilen teorik molekül uzunluğu 0,6 nm – 0,7 nm civarındadır (Piwonski ve ark., 2005). Daha uzun inkübasyon süresi sonunda kalınlık 4,5 nm’ye kadar artmıştır. Bu artış aglomere olmuş moleküller nedeniyle oluşabilir. Bu çalışmaların ardından, MPTS tek tabakası oluşumu için 1 saat sürenin yeterli olduğu belirlenmiş ve diğer deneylerde bu daldırma süresi kullanılmıştır. Şekil 3.8.1’de ayrıca, % 1 (v/v) MPTS immobilize edilen yüzeyin temas açısı değerinin zamanın fonksiyonu olarak değişimi gösterilmiştir. Hidroksillenmiş silikon yüzeyinin temas açısı 3° civarındadır. Temas açısı değeri hızla artıp bir platoya ulaşmıştır.



Şekil 3.8.1- MPTS tabaka kalınlığı ve yüzey temas açısı değerlerinin %1’lik (v/v) MPTS immobilizasyonu sırasında zamanla değişimi

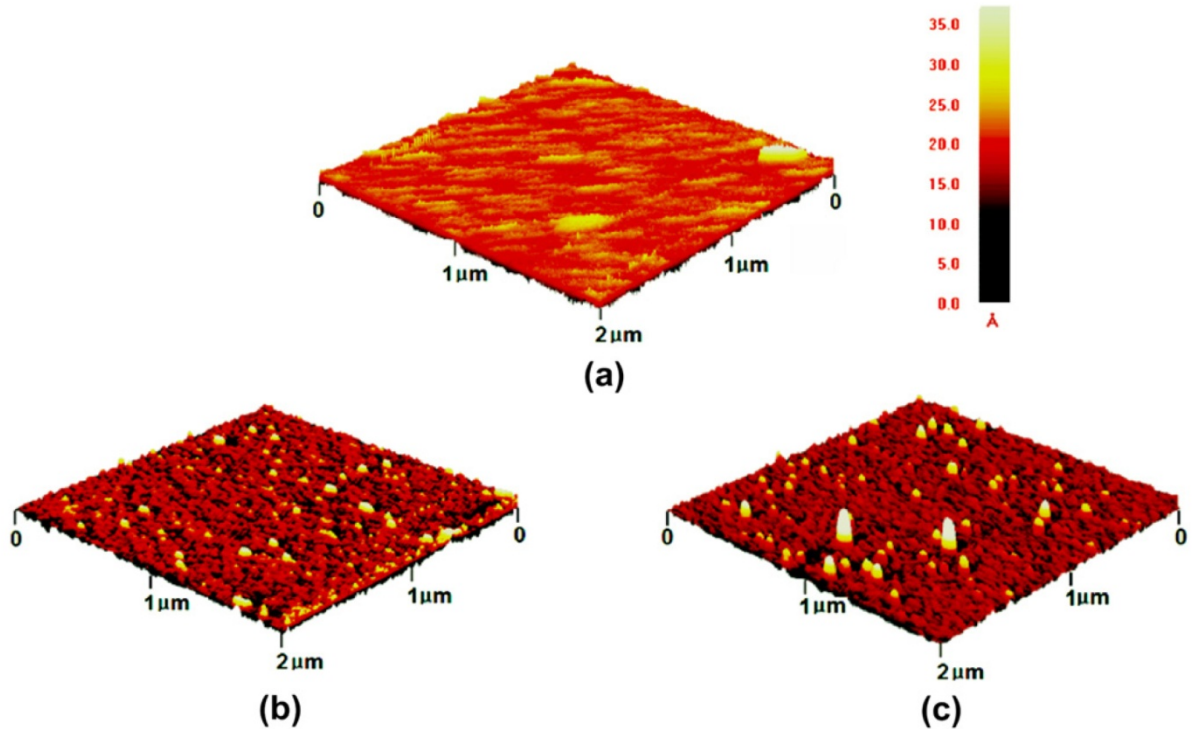
Temas açısı, bir saat sonrasında $59,4^\circ$; altıncı saatte $70,1^\circ$ ve yirmi dördüncü saatte $84,3^\circ$ olarak belirlenmiştir. $59,4^\circ$ 'lik temas açısı değerin, daha düzenli ve tiyol uç grupları yukarı bakan bir tabakayı gösterdiği; $84,3^\circ$ gibi yüksek bir değerin ise yüzeyde agregre olmuş MPTS moleküllerini göstermekte olduğu söylenebilir (Hu ve ark., 2001).

Şekil 3.8.2'de sırasıyla 10 dakika, 1 saat ve 24 saat süre ile MPTS immobilize edilmiş yüzeylerin 2 boyutlu elipsometrik görüntüleri verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi, her üç yüzeyin morfolojileri oldukça farklıdır ve görülen dairesel yapılar MPTS agregatları nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Çok kısa sürede bile (10 dakika) agregat oluşumunun başladığı görülmektedir. Agregatların sayısı 1 ve 24 saatlik MPTS immobilizasyonunu gösteren Şekil 3.8.2 (b) ve Şekil 3.8.2 (c)'de artmıştır.



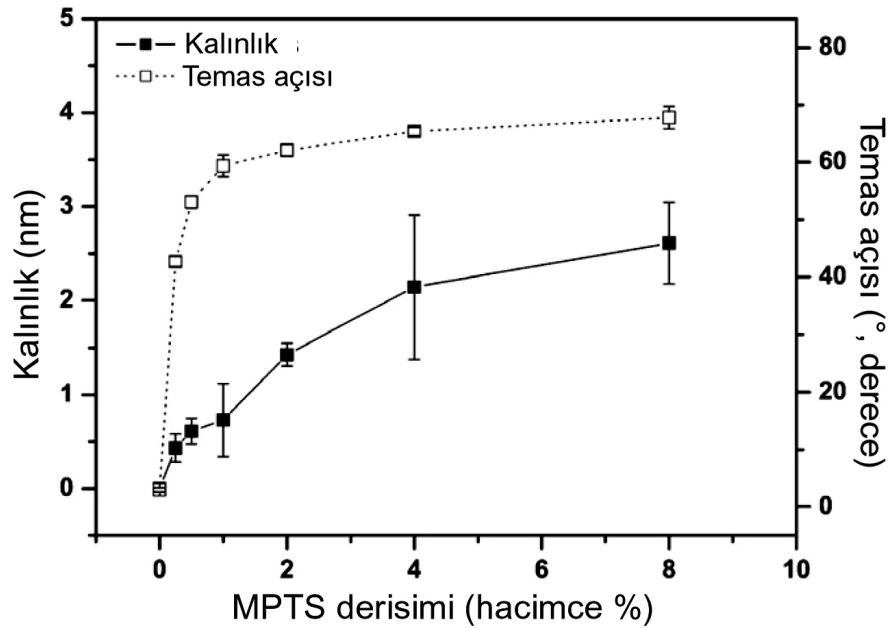
Şekil 3.8.2 – Yüzeyle ait 2 boyutlu elipsometrik görüntüler a) MPTS/Si(001) yüzeyi 10 dakika sonra b) MPTS/Si(001) yüzeyi 1 saat sonra c) MPTS/Si(001) yüzeyi 24 saat sonra.

Hazırlanan yüzeylerin film kalitesi AFM (atomik kuvvet mikroskobu) ile incelenmiştir. Şekil 3.8.3'te, Şekil 3.8.2'de belirtilen yüzeylerin AFM görüntüleri gösterilmiştir. Boş Si (001) yüzeyi nispeten homojendir (Şekil 3.8.3 a), ancak 10 dakika MPTS immobilizasyonu sonucu yüzey morfolojisi değişmeye başlamıştır. Çoğunlukla homojen olan yüzeyde daha geniş alanda bazı agregasyonların oluşmaya başladığı görülmüştür. İmmobilizasyonun 1. saati sonunda yüzeyin nispeten dolu olduğu ve tek tabaka oluşumunun gerçekleştiği görülmektedir. Daha uzun immobilizasyon süresinde (24 h) ise adacık benzeri yapıların olduğu görülmektedir. Yüzey pürüzlülüğünün RMS değerleri MPTS/Si(001) yüzeyi 10 dakika sonra, MPTS(1h)/Si(001) yüzeyi 1 saat sonra ve MPTS(24h)/Si(001) yüzeyi 24 saat sonra için sırası ile 0,427 nm; 0,829 nm ve 1,962 nm olarak bulunmuştur.



Şekil 3.8.3 - Yüzeyle ait AFM görüntüleri a) MPTS/Si(001) yüzeyi 10 dakika sonra b) MPTS(1h)/Si(001) yüzeyi 1 saat sonra ve c) MPTS(24h)/Si(001) yüzeyi 24 saat sonra

MPTS immobilizasyonunda derişimin kalınlık ve temas açısı cinsinden yüzey morfolojisine etkisi hacimce % 0,25 ile % 8,0 MPTS (mutlak etanolde) çözeltisiyle yüzeyin oda sıcaklığında, 1 saat etkileştirilmesi ile incelenmiştir. Şekil 3.8.4'te görüldüğü gibi kalınlık, çözelti derişiminin artması ile artmaktadır. % 0,25 MPTS (hacimce) ile elde edilen kalınlık 0,43 nm iken % 1,0 (v/v) ila % 8,0 (v/v) APTS derişimlerinde 0,73 nm – 2,61 nm değerine ulaşmaktadır. Temas açıları değeri de derişime bağılı olarak hızla değişmektedir. % 0,25 (v/v) ve %1,0 (v/v) MPTS derişimlerinde temas açısı değerleri sırasıyla 42,7° ve 59,4° ve daha yüksek derişimlerde (% 8,0 MPTS için) 67,4°'ye ulaşmıştır. Bu çalışmada % 1,0 (v/v) MPTS derişiminin 1 saat içerisinde yeterli bir tek tabaka oluşumu sağladığına karar verilmiştir ve bu aşamada yüzey temas açısı değeri 59,4° olarak bulunmuştur.



Şekil 3.8.4- MPTS derişiminin, MPTS immobilizasyonu ile kalınlık ve yüzey temas açısı değerlerine etkisi (immobilizasyon süresi 1 saat).

Bu çalışmalara ek olarak, çözücü tipinin MPTS film kalitesi ve film formasyonuna etkisi de incelenmiştir. Moleküllerin birbirleri ile etkileşip yüzeye immobilize

olmasını sağlayan moleküller arası kuvvetler genelde çözücü tipine bağlıdır. Örneğin, kendiliğinden düzenlenme, hidrojen bağları ile destekleniyorsa bu yapı, hidrojen bağ oluşturan su ve alkoller gibi çözücülerde kararlı olmaz (Martin ve ark., 2005). Çalışmanın bu bölümünde MPTS tabakası oluşumuna yedi ayrı çözücünün etkisi incelenmiştir: etanol, metanol, aseton, toluen, THF, benzen ve 2-propanol. Bu çalışma sırasında derişimler hacimce %1 ve immobilizasyon süresi 1 saat olarak sabitlenmiştir. Çizelge 3.8.1’de bu çözücüler ile elde edilen yüzey kalınlıkları verilmiştir. Metanol ile en düşük (0,62 nm), benzen ile en yüksek (8,36 nm) yüzey kalınlığı elde edilmiştir. Metanol, kullanılan çözücülerin içersinde en yüksek (33) ve benzen en düşük (2,3) dielektrik sabitine sahiptir.

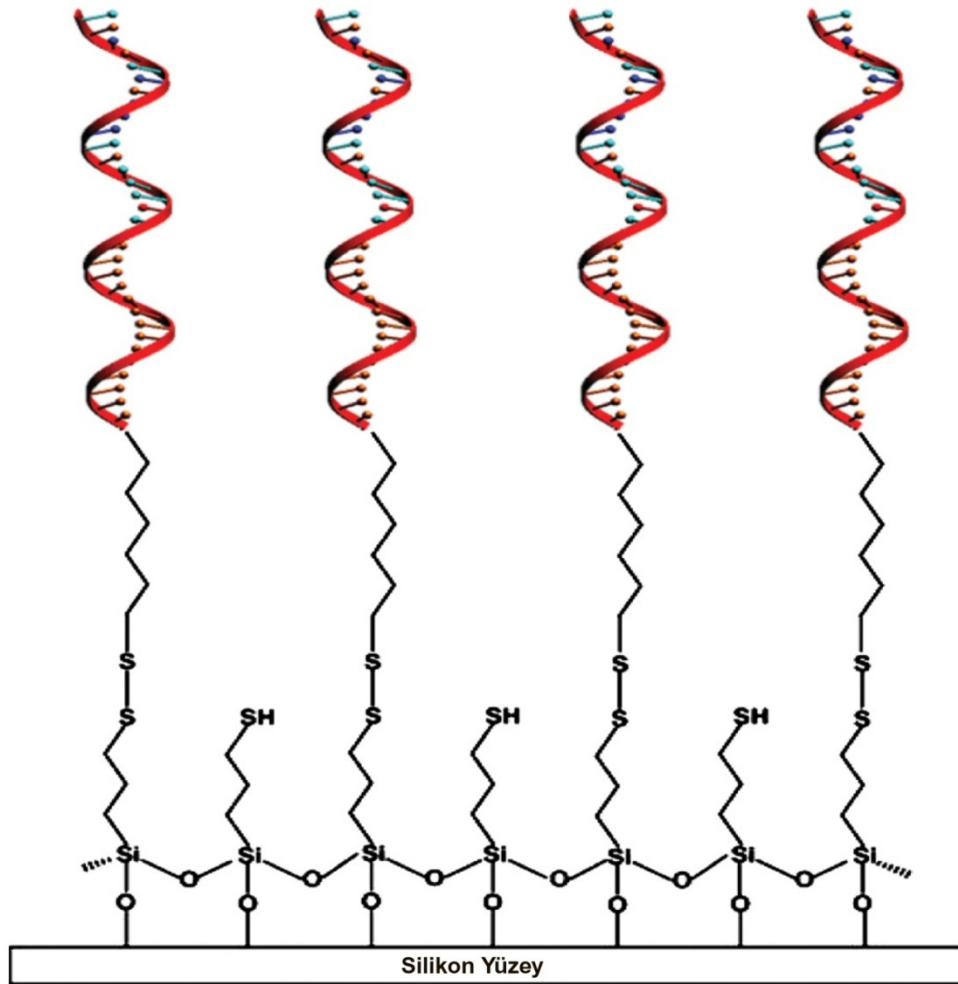
Çizelge 3.8.1 – MPTS tabakasının farklı çözücü tiplerinde Si(001) yüzeyinde elde edilen kalınlığı

Çözücü tipi	Kalınlık (nm)	Dielektrik sabiti
Etanol	0,74±0,21	24
Metanol	0,62±0,43	33
Aseton	1,27±0,37	21
Toluen	6,83±0,63	2,4
THF	5,14±0,74	7,5
Benzen	8,36±0,98	2,3
2-propanol	2,18±0,24	18

Hidrofilik çözücü ile MPTS’nin hidrofilik uç grubu çözünüp, uygun etkileşimle tabaka formasyonu sağlamaktadır. Yüksek hidrofobiteye sahip benzen, çözünmeyi azaltarak MPTS’nin misel formasyonunda birleşmesini ve yüzeye bağlanacak MPTS uç grup derişimini azaltarak SAM oluşumunu önlediği düşünülmüştür. Bu nedenle düzenli bir tek tabaka oluşturmak yerine, hidrofobik çözücü MPTS agregatlarının oluşmasına ve bu yapıların yüzeye birikmesine ve adsorplanmasına neden olmaktadır.

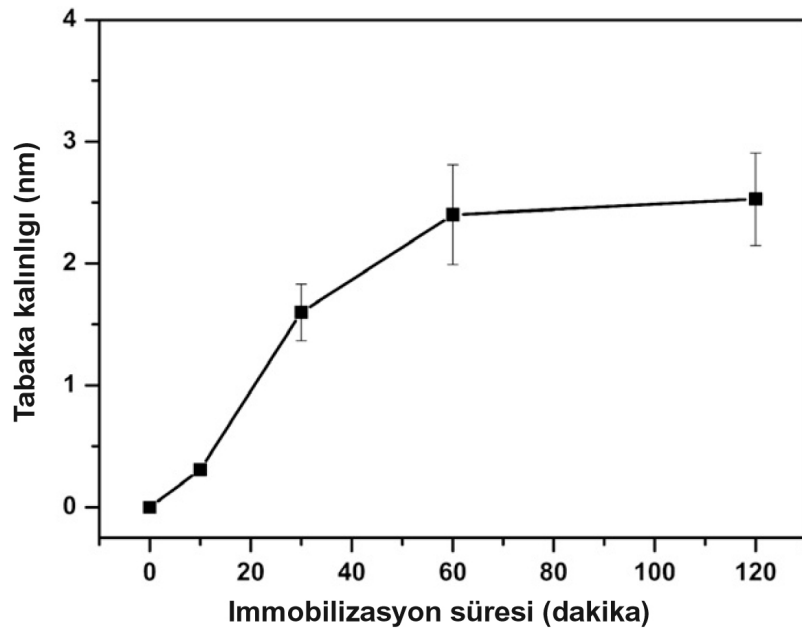
3.8.2.2. Modifiye edilmiş yüzeylere ODN immobilizasyonu ve hibridizasyon

DNA biyosensörleri ve mikro-dizileri (microarrays) hazırlanırken en önemli basamak oligonükleotid prob moleküllerinin (ODN) yüzeye immobilize edilmesidir. Bu immobilizasyon, hibridizasyon verimine ve dolayısıyla algılama sinyali şiddetine etki eder. Çalışmanın bu bölümünde tiyol sonlanmış ODN prob, MPTS tek tabakasına disülfid bağı oluşumu yolu ile bağlanmıştır (Şekil 3.8.5).



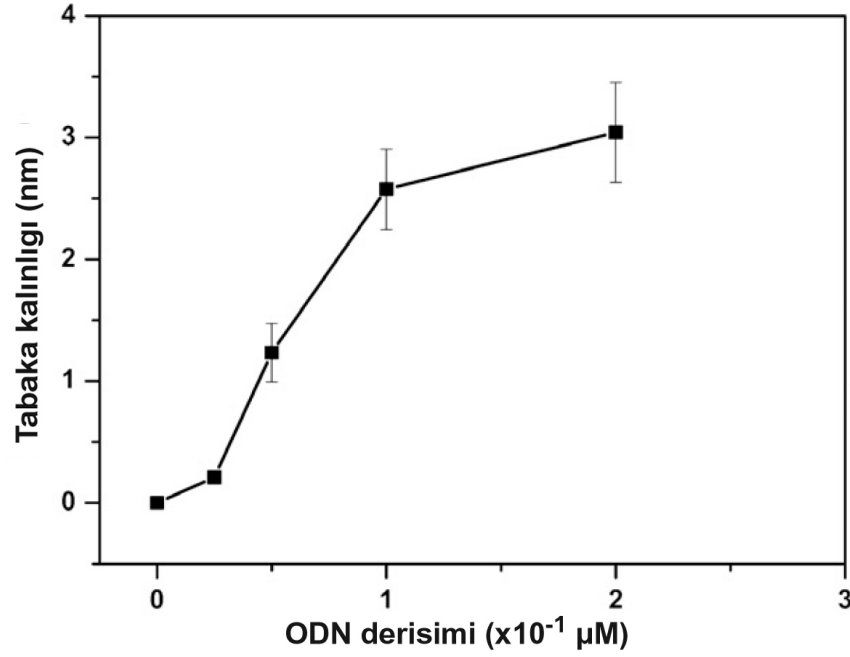
Şekil 3.8.5 - ODN-MPTS-Si(001) yüzeyinin şematik gösterimi

ODN immobilizasyonuna, immobilizasyon süresinin etkisini gözlemek için 0 ila 120 dakika arasında immobilizasyon süresi denenmiştir. Immobilizasyon çözeltisinde ODN derişimi 1 μ M (pH 7,4 fosfat tamponu) ve immobilizasyon sıcaklığı 25 °C'tur. Şekil 3.8.6'da görüldüğü gibi MPTS modifiye edilmiş yüzeydeki ODN tabakasının kalınlığı ilk 10 dakikada 0,31 nm'ye; altmışıncı dakikada 2,5 nm'ye ulaşmış ve bu süreden sonra değişmemiştir. Dik olarak ve sıkı istiflenmiş bir ODN tabakasının kalınlığının daha yüksektir (Lenigk ve ark., 2001). Ancak ODN tabakasının yüzeyde yatık olarak durması (kurutulmuş yüzeyde kalınlık ölçümü) ve tam doluluğun sağlanamaması nedeniyle elde edilen kalınlık, yatay duran ODN zincirlerinin kalınlığına denk gelmektedir. ODN prob miktarının artması, hibridizasyon basamağında sterik engellemeye neden olabileceğinden sensör uygulamasında çok tercih edilen bir durum değildir (Wang ve Bard, 2001).



Şekil 3.8.6 – ODN prob immobilizasyonunda, immobilizasyon süresi ile ODN tabakası kalınlığının değişimi (ODN derişimi 1 μ M'dır).

Kalınlığın 1 saat sonunda dengeye gelmesi, bu sürenin ODN immobilizasyonu için optimum olduğunu göstermiştir. DNA probların immobilizasyonunda, ODN derişiminin formasyona etkisi, pH 7,4 fosfat tamponunda 0,025 μM – 2,0 μM derişimlerine sahip oligonükleotid probun 25 °C'ta 1 saat süre ile immobilize edilmesi ile belirlenmiştir.



Şekil 3.8.7- ODN derişiminin DNA tabakası kalınlığına etkisi, immobilizasyon süresi 1 saat.

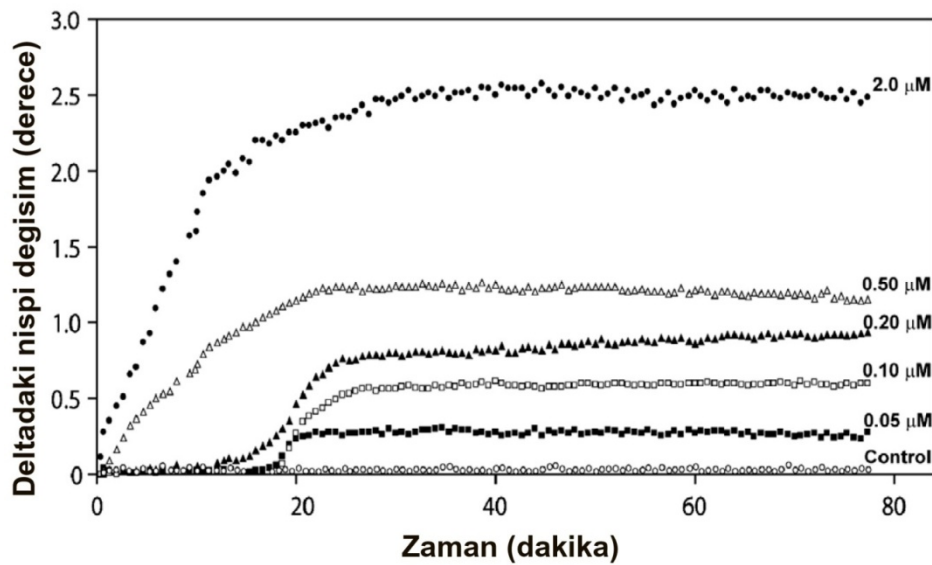
Şekil 3.8.7'de görüldüğü gibi derişimin etkisi, immobilizasyon süresinin etkisine benzer olmuştur. 0,025 μM ODN için ortalama kalınlık 0,21 nm iken; 0,05 μM – 2,0 μM ODN çözeltisinde elde edilen kalınlık 1,23 nm – 3,04 nm aralığında olmuştur.

3.8.2.3 Modifiye edilmiş yüzeylerde hibridizasyon deneyleri

Hibridizasyon deneyleri, hedef ODN çözeltisinin 5 μL /dakika hızla elipsometre akış hücresinde 25 °C'ta gönderilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon reaksiyonu

120 dakika boyunca tek dalga boylu nulling elipsometre ile izlenmiştir. Elipsometrik parametrelerden Delta (Δ ; faz kayması) ışığın yansıdığı tabakaların optik özelliklerine aşırı bağlıdır. Bundan dolayı kompleks kırınım indisi, elipsometre ile ölçülen bu elipsometrik parametre (delta) ile doğrudan ilişkilendirilebilir. Dielektrik maddeler için (bizim analizimizde oligonükleotid) yansıma parametrelerinin homojen tabakalarda doğrudan tabaka kalınlığına bağlı olduğu varsayımı yapılmıştır. Bu varsayımla, hibridizasyon sonucu yüzeyde gerçekleşen birikme elipsometrik değişkenin bağıl değişimi (Δ parametresindeki değişim) olarak izlenmiş ve bu parametredeki değişim, kinetik incelemede kullanılmıştır. Hibridizasyon süreci boyunca Δ değişmekte ve bu değişime bağlı olarak hibridizasyon eş zamanlı olarak izlenebilmektedir (Arwin, 2000).

Şekil 3.8.8’de, farklı ODN hedef derişimlerinde, modifiye yüzeyden alınan Δ (derece) – zaman eğrileri gösterilmiştir. Grafikten görüldüğü gibi, enjeksiyonun hemen ardından reaksiyonun hemen başlarında hedef bağlanması sonlanmış ve hemen hemen yirminci dakikada doygunluğa ulaşılmıştır. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0,05 μM ’dan 2,0 μM ’a artırılması ile hızla artmıştır. Hibridizasyonun ilk 20 dakikasında ulaşılan Δ değişimi 0,05 μM için 0,3°; 0,1 μM için 0,5° ; 0,2 μM için 0,7°; 0,5 μM için 1,2° ve 2,0 μM için 2,5° olarak bulunmuştur. Bu süreden sonra delta (Δ) değerindeki değişim nispeten sabitlenmiş ve bir platoya ulaşmıştır.



Şekil 3.8.8- ODN hibridizasyonu ile zamana bağlı olarak delta (Δ) parametresindeki değişim.

Bu davranış, hibridizasyon ortamındaki hedef ODN derişimindeki azalma ve/veya serbest ODN problemlerinin sayısındaki azalması sonucu, sürücü gücün azalması nedeniyle ortaya çıkmıştır. Kontrol amacıyla eşlenik olmayan ODN hedefe gönderildiğinde, herhangi bir anlamlı sinyal alınmamıştır. Ayrıca floresan mikroskopisi ile FITC etiketlenmiş hedef ODN'lerin yüzeye gönderilmesi ile, hibridizasyon sonrası bağlanma gösterilmeye çalışılmıştır ancak, hibridizasyondan sonra herhangi bir floresan sinyali alınamamıştır. Bunun iki önemli sebebi olabilir: öncelikle, floresan etiketli hedef molekülün yüzeyde düşük derişime sahip olması, tayin edilebilecek düzeyde floresan sinyal alınmasına yetmemiş olabilir. Ayrıca, DNA problemlerinin substrat yüzeyine düşük bir yoğunlukta immobilize edilmiş olması da, bağlanan floresan etiketli ODN miktarının az olmasına ve bu nedenle floresan mikroskobu ile gözlenememesine neden olmuş olabilir.

Kinetik değişimden çok, sensör uygulamasında sensör doğrusallığı ve algılama sınırı önemlidir. Dengedeki sensör tepkisi, ODN hedef derişimine karşı grafiğe geçirildiğinde elde edilen kalibrasyon grafiği (0 μ M- 2,5 μ M ODN hedef için) belirtilen derişim aralığında 0,96 doğrusal regresyon katsayısına sahip bir doğrudur. Geniş aralıkta doğrusal tepki veren bu sensör yapılandırmasında, tekrarlanabilirlik 0,01 μ M hedef derişimi için $\pm 0,2^\circ$ (standart sapma cinsinden) olarak bulunmuştur.

Elde edilen sonuçlar, bütün hedef derişimleri için hibridizasyonun yaklaşık aynı sürede ve hızlıca (yaklaşık 20 dakika) tamamlandığını göstermiştir. Bu çalışmada önerilen sistemin etkin bir şekilde ODN tayini ve mutasyon belirlenmesinde biyosensör olarak ve array teknolojilerinde kullanılabileceği öngörülmektedir.

3.9. Elipsometrik biyosensörden alınan cevabın artırılması için altın nanopartiküllerin kademeli yüzey formasyonu yoluyla sensör yongasında kullanılması

Biyosensör uygulamalarında yüzey etkileşimlerinin bilinmesi önemlidir. İmmobilizasyon için, silan, altın film veya cam yüzey şeklindeki taban malzeme (substrat) genellikle amino, epoksi veya merkaptosilanlar gibi bir diğer kimyasal tabaka ile kaplanır veya tiyol grupları ile doğrudan kovalent bağ oluşturulabilir. Bu nedenle, biyomoleküllerin, kaplanan tabaka ile hem de kaplamanın yüzey ile etkileşimi önemlidir. Alkil siloksan tek tabakalarının cam/silikon yüzeyindeki etkileşimleri daha önce farklı gruplar tarafından çalışılmıştır ve bu tür bazı yüzeylerin birikim özellikleri bilinmektedir (Parikh ve ark., 1997; Linford ve ark., 1995; Delorme ve ark., 2005).

Altın nanopartiküller kararlı, ucuz, hazırlanması ve modifikasyonu kolay olduğundan ve eşsiz optik ve elektronik özellikler gösterdiğinden biyosensör, biyoçip ve katalizör olarak kullanım alanlarına sahiptir. Çalışmanın bu bölümünde, cam substrat kullanılarak adımlı yüzey modifikasyonu ile Au nanopartiküllerin (AuNPs) elipsometrik sensör tepkisine etkisi incelenmiştir.

3.9.1 Deneysel çalışma

Elipsometrik sensörde kullanılan BK7 cam slâyetler, sıvı akış hücrelerine uygun boyutta kesildikten sonra, aşağıda belirtilen adımlar takip edilerek temizlenmiştir:

- Deiyonize su ve etanol ile yıkama
- 1:3 H₂O-derişik HNO₃ karışımında 30 dakika kaynatma veya derişik NH₃, H₂O₂ ve deiyonize su karışımında (1:1:5, hacimce) 20 dakika süresince 70 °C'ta işleme tabi tutma.
- Etanol ve deiyonize su ile yıkama ve azot gazı ile kurutma
- UV/ozon temizleyici veya vakum plazma sisteminde 15 dakika - 30 dakika temizleme.

Temizlenen yüzeylerin aynı zamanda hidrofilik karakter gösterdiğinden, temizlik işleminin tamamlanıp tamamlanmadığı kontak açısı ölçüm cihazı kullanılarak kontrol edilmiştir. Temiz cam yüzeyin temas açısı $<2^\circ$ olup bazı durumlarda ani yayılma gerçekleştiğinden 0° olarak kabul edilmiştir.

Cam yüzeyinin hidroksillenmesinin ardından yüzey, 3-aminopropiltrietoksisilan (APTS)'nin etanoldaki farklı derişimlerde çözeltileri ile işleme tabi tutulmuştur (hacimce %0,5 - % 8,0). Tek tabaka oluşumunun belirlenmesi için immobilizasyon süresinin kontrolü (0 saat - 8 saat) immobilize edilen örneklerin oda sıcaklığında, karanlık ortamda bekletilmesi ile yapılmıştır. İmmobilizasyon süresinin ardından substratlar etanol ile yıkanıp azot ile kurutulmuştur.

Temas açısı kontrolü, yaklaşık $1\mu\text{L}$ hacmindeki damlacığın kullanılması ile su kullanılarak, durgun temas açısı yöntemiyle (Model DSA100, Krüss, Hamburg, Almanya) ölçülmüştür. Temas açısı en az üç ölçümün aritmetik ortalaması olarak verilmiştir.

Substrat üzerindeki biriken organik tabakanın “optik” kalınlığı, elipsometre ile (nulling) 532 nm lazer kullanılarak 73° geliş açısında gerçekleştirilmiştir. Kalınlık ölçmelerinde $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ 'lik örnekleme alanında dört bölge otomatik sıfırlama (nulling) prosedürü kullanılarak ölçüm alınmıştır. 3 faz varsayımı ile cihazda [BK7 (cam substrat) / üstteki organik katman / hava (ortam)] modelleme yapılarak organik tabakanın kalınlığı belirlenmiştir. Kabul edilen kırılma indisi değerleri 1,5183 (BK7), 1.4600 (organik tabaka)'dır.

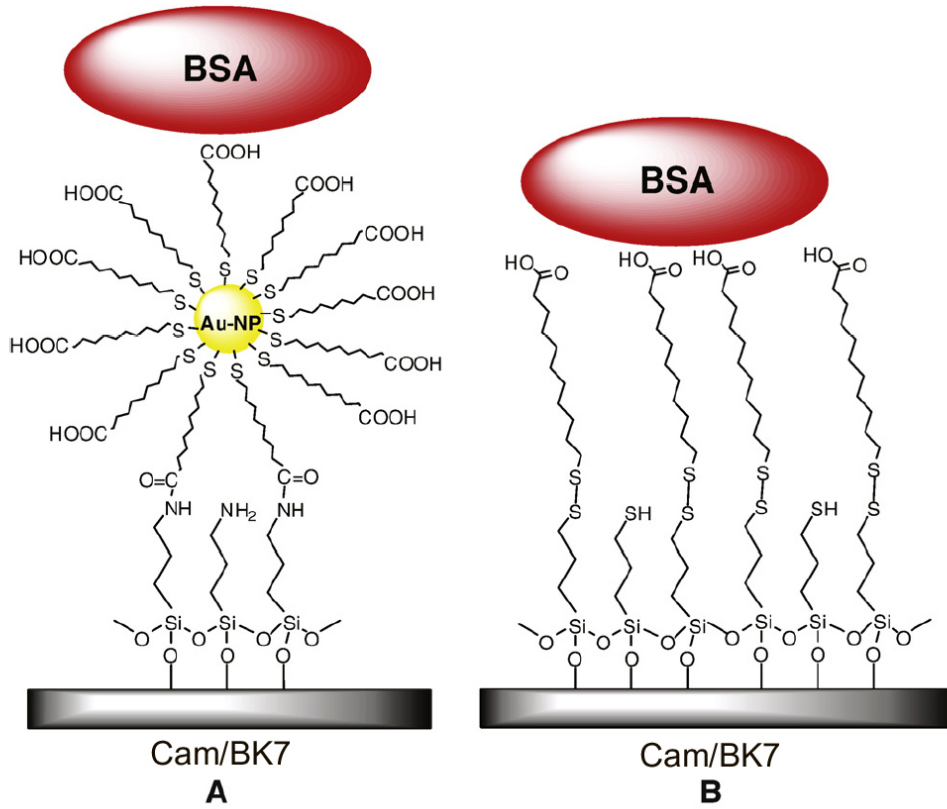
Altın nanopartiküller $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 'nun sitrat indirgenmesi reaksiyonu ile elde edilmiştir. Au nanopartiküllerin (AuNPs) eldesinde, 75 mg $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 250 mL damıtılmış su içerisinde, geri akımlı yoğunlaştırıcı altında karıştırılarak kaynatılmış, ardından 25 mL %1 (m/v) sodyum sitrat çözeltisi hızlıca ilave edilmiştir. Çözelti 15 dakika daha kaynatılmıştır. Bu esnada çözelti rengi açık sarıdan koyu kırmızıya (şarap kırmızısı) dönmektedir. Karıştırma kesilmeksizin çözeltinin oda sıcaklığına kadar soğuması beklenmiştir. Süspansiyon bir kaç kez santrifüjlenmiş ve büyük agregatların uzaklaştırılması için $0,22\mu\text{m}$ filtreden geçirilerek kullanım anına kadar 4°C sıcaklıkta muhafaza edilmiştir. AuNPs'in ortalama partikül çapı ve boy dağılımı zeta-boyut ölçer (Malvern Instruments, Model 3000, HSA, Worcestershire, UK) ile ve UV-görünür spektrofotometre kullanılarak belirlenmiştir. Ortalama boyut

dağılımı, Mie eşitliklerinin MATLAB ile çözülmesi sonucu beklenen teorik absorban piki dalga boyu ile deneysel elde edilen dalga boyunun karşılaştırılması sonucu da doğrulanmıştır. 40 nm anma çapına sahip nanopartiküller, daha sonraki modifikasyonlar için hacimce 1:1 oranında etanol ile seyreltilmiştir. AuNPs'in son derişimi 526 nm dalga boyunda 0,9 AU optik yoğunluk elde edilecek şekilde ayarlanmıştır.

11-merkaptoundekanoik asit (MUA %95'lik) AuNPs'in farklı derişimlerde MUA çözeltisi içerisinde bekletilmesi ile yüzeye immobilize edilmiştir. MUA optimizasyonunda optimum koşullar %1,5 - %12,0 arasında derişime sahip MUA'in UV-spektrofotometrede immobilizasyonunun eş zamanlı olarak ölçülmesi ile belirlenmiştir. Ardından karboksil uç gurubuna sahip AuNPs amino uçlu tek tabakaya sahip cam yüzeyine EDC aktifleştirme yöntemi ile immobilize edilmiştir.

3,0 ppm – 30000 ppm derişime sahip sığır serum albumini (BSA, bovine serum albumine) pH 7,4 olan fosfat tamponunda modifiye edilmiş yüzeye gönderilmiştir (Şekil A.1). İmmobilizasyon işlemi sıvı hücresinde 5 µL / dakika akış hızında gerçekleştirilmiş ve etkileşim eş zamanlı olarak incelenmiştir. Elipsometrik veri 50 µm x 50 µm'lik farklı alanlarda 70° geliş açısında alınmış ve farklı BSA derişimlerine karşılık gelen, dengedeki sensör tepkileri elde edilmiştir.

İmmobilize edilen AuNPs'nin sensör hassasiyetine etkisini karşılaştırabilmek için AuNPs bulunmayan karboksil sonlanmış yüzeyler hazırlanmıştır. Bu işlem için ilk olarak 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPTS), hidroksillenmiş cam yüzeyine immobilize edilmiştir. İmmobilizasyon işlemi %3 (v/v) MPTS'nin etanoldeki çözeltisi ile 3 saat süre ile gerçekleştirilmiştir. Yıkama işleminin ardından (etanol/su/etanol) azot ile kurutulan örnekler hacimce %6,0'lık etanol içerisinde MUA çözeltisinde 24 saat bekletilmiştir. Karboksil sonlandırılmış yüzeyler, BSA immobilizasyonu için aktif yüzeyler olarak kullanılmış (Şekil 3.9.1) ve BSA immobilizasyonu yukarıda belirtildiği gibi gerçekleştirilmiştir.



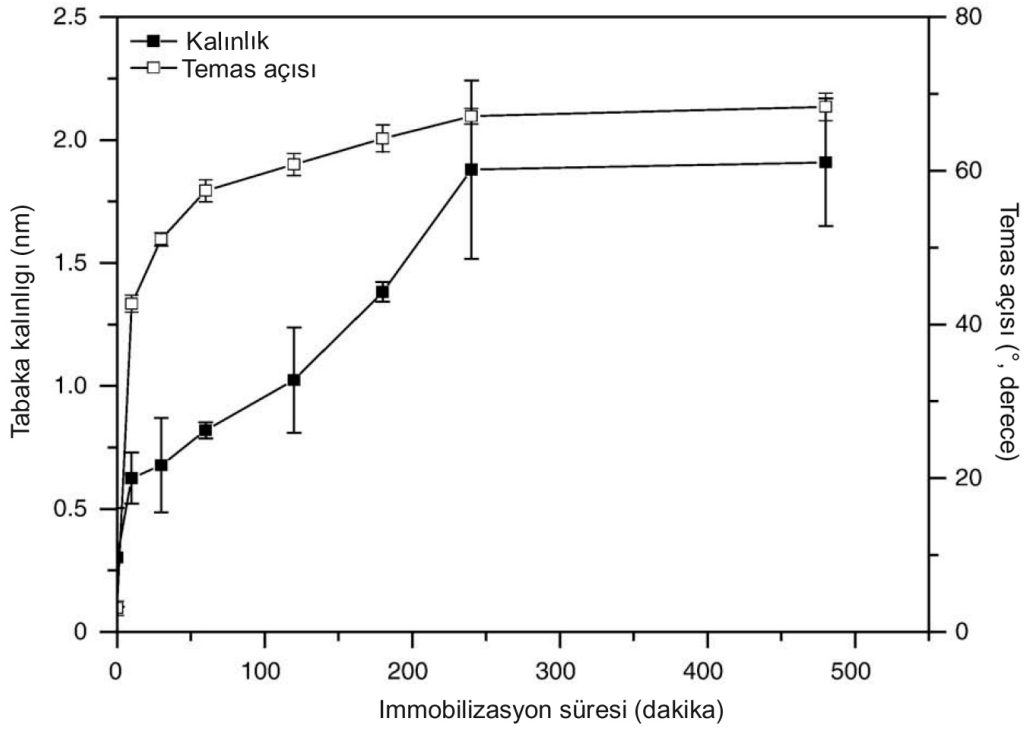
Şekil 3.9.1- BK7/APTS/modifiye AuNPs/BSA çoklu tabakası ile (A) BK7/MPTS/MUA/BSA çoklu tabakalarının şematik gösterimi.

3.9.2. Sonuçlar

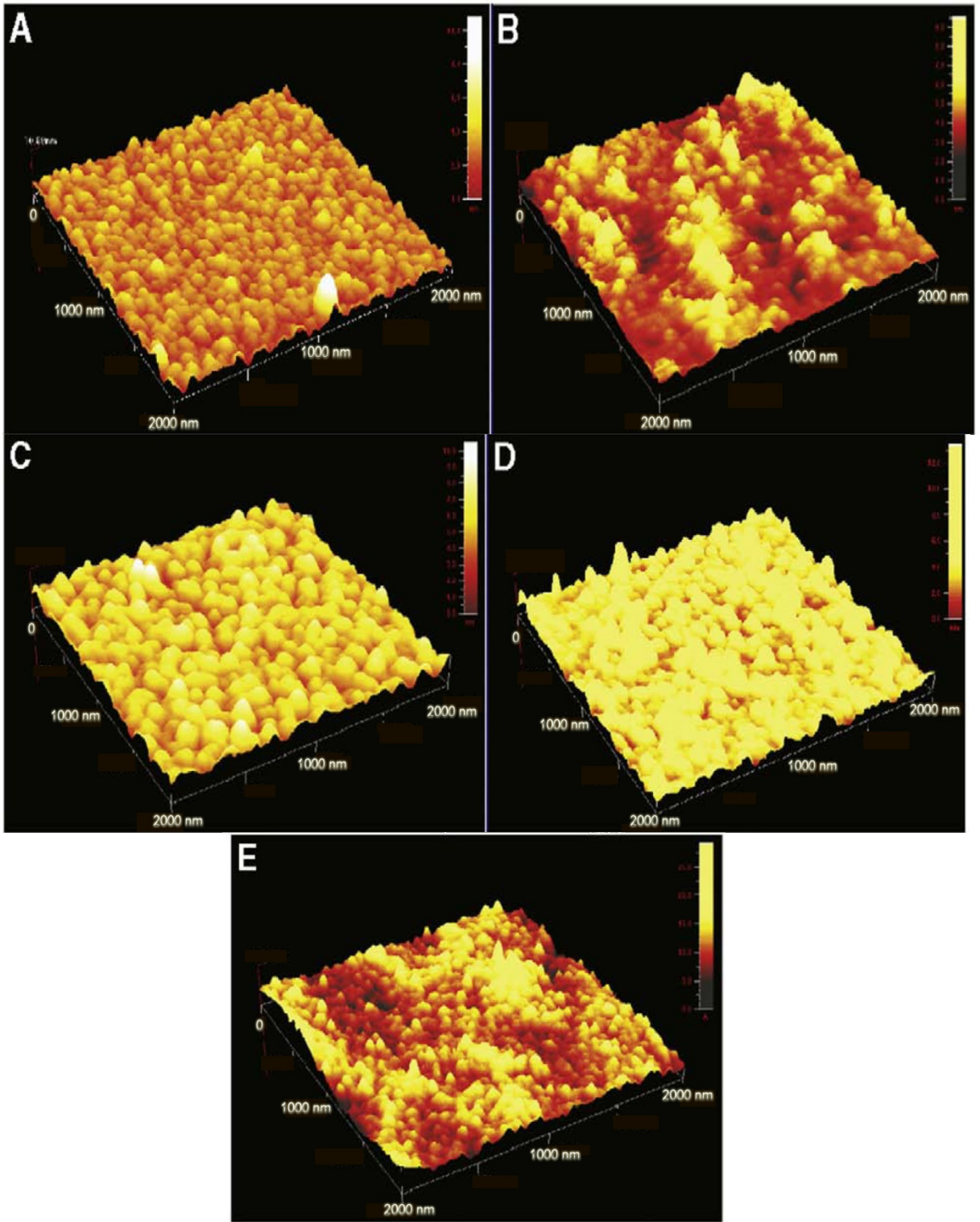
3.9.2.1 Cam yüzeyine APTS immobilizasyonu

Katı yüzeylerde moleküllerin konformasyonu biyosensör teknolojisinde önemli bir rol oynar. Bu nedenle, APTS tabakasının tek tabaka formasyonunda olmasını sağlamak için, APTS moleküllerinin immobilizasyon süresi optimize edilmiştir. Immobilizasyon süresi optimizasyonunda %3 (v/v) APTS-etanol çözeltisi 0 saat - 8 saat süresince oda sıcaklığında deneye tabi tutulmuştur. Daldırma süresinin APTS kalınlığına etkisi Şekil 3.9.2'de gösterilmiştir. Hidroksillenmiş cam yüzeyin APTS immobilize edilmemiş durumdaki kalınlığı yaklaşık 0,2 nm olarak belirlenmiştir. Bu kalınlık değeri muhtemelen yüzey pürüzlülüğünden kaynaklanmakta olup, elipsometrede uygulanan modelde yüzey pürüzlülüğünün eklenememesi nedeniyle ortaya çıkmıştır. Bu nedenle sonuçlarda belirtilen kalınlık değerleri, mutlak kalınlık değerleri olmayıp bağıl kalınlık olarak verilmiş değerlerdir ve değerlere

normalizasyon uygulanmamıştır. İlk 2 saatin sonunda elde edilen APTS kalınlığı yaklaşık 1,1 nm olup, teorik APTS uzunluğuna denk gelmektedir. Bu sürede tek tabaka oluşumunun gerçekleştiği söylenebilir. APTS molekülünün literatürde belirtilen değeri 1,2 nm'dir (Demirel ve ark., 2007). İmmobilizasyon süresinin arttırılması ile yaklaşık 8 saat sonra 1,8 nm kalınlık elde edilmiştir. Bu artış moleküllerin daha sıkı bir yapı oluşturması ve agregat oluşturması nedeniyle olabilir. Bu rastgele birikim ve agregat oluşumu, örneklere ait AFM görüntüsünde de görülmektedir (Şekil 3.9.3).



Şekil 3.9.2- İmmobilizasyon süresinin APTS tabakası kalınlığına ve temas açısı değerlerine etkisi.



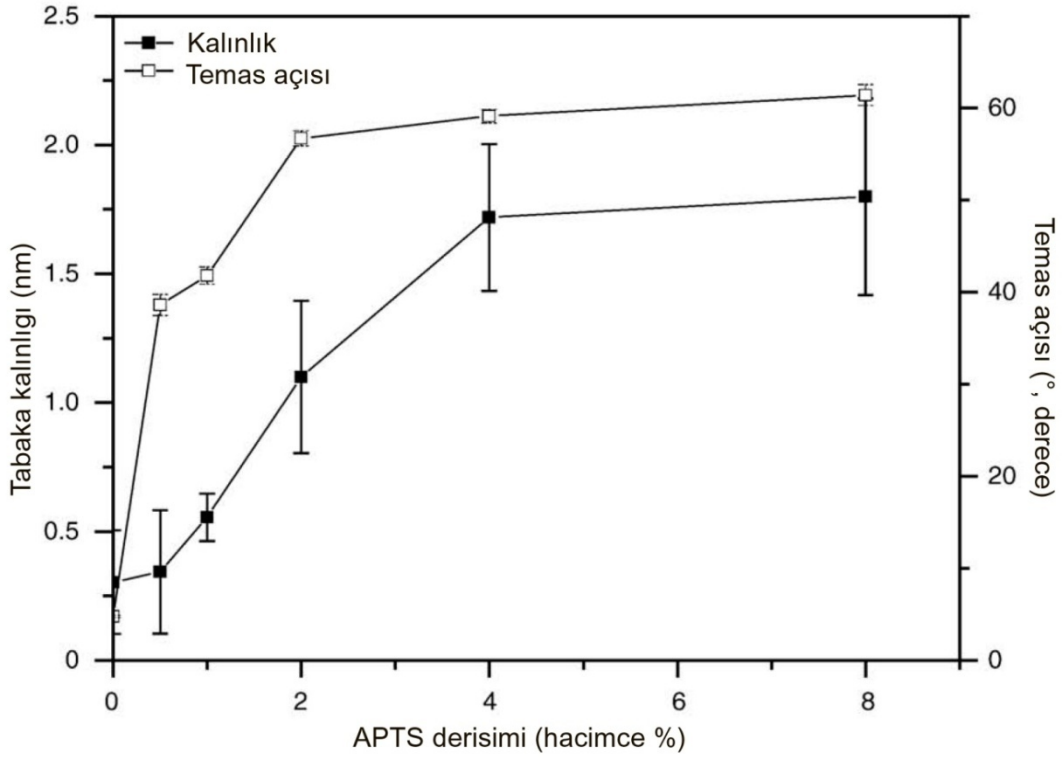
Şekil 3.9.3 – Hidroksillenmiş cam yüzeyin AFM görüntüsü (A), farklı derişimlerde APTS uygulanması ile elde edilen yüzeylerin AFM görüntüsü; % 0,5 v/v APTS (B), %1,0 v/v APTS (C), %2,0 v/v APTS (D), %8,0 v/v APTS (E),

APTS tek tabakasının oluşumu için uygun süre 2 saat olarak belirlenmiştir. Cam-APTS tek tabakası için bulunan bu süre diğer deneylerde de kullanılmıştır. Tek tabaka oluşumunun tam anlamıyla mümkün olmadığından, elde edilen doluluk yeterli yoğunluk olarak kabul edilmiştir.

Şekil A.2’de ayrıca, daldırma süresine bağlı olarak % 3 (v/v) APTS ile modifiye edilmiş yüzeylerin temas açısı değerleri verilmiştir. Temas açısı değerleri yüzeyin kimyasal yapısındaki değişimin ve yüzey doluluğunun bir göstergesi olarak kabul edilebilir. Temizlenmiş cam yüzeylerin temas açısı, hidroksillenmenin ardından $<2^{\circ}$ değerine ulaşmaktadır. Bu düşük temas açısı değeri, yüzeydeki hidroksil gruplarının bir göstergesidir. Şekil 3.9.2’de görüldüğü gibi, temas açısı modifikasyon süresi ile artmış ve bir plato değerine ulaşmıştır. Temas açısı değerleri yaklaşık 5° ’den bir saat içerisinde $62,8^{\circ}$ ’ye; ikinci saatte $63,4^{\circ}$ ’ye ve sekizinci saatte $69,1^{\circ}$ ’ye ulaşmıştır.

APTS derişiminin cam yüzeyindeki APTS tek tabakası oluşumuna etkisi yüzeye, % 0,5 ila % 8,0 (v/v) APTS etanol çözeltisi ile oda sıcaklığında 2 saat sürede APTS immobilizasyonu sonucu belirlenmiştir. Şekil 3.9.4’te film kalınlığının artan derişim ile arttığı görülmektedir.

% 0,5 (v/v) APTS ile elde edilen kalınlık 0,32 nm iken % 2,0 - % 8,0 (v/v) APTS ile 1,17 – 1,82 nm kalınlık elde edilmiştir. Ayrıca, temas açısı değişimleri dikkate alındığında derişim artışı ile birlikte temas açısının da arttığı ve bir platoya ulaştığı görülmektedir. Örneğin % 0,5 (v/v) APTS derişiminde $40,7^{\circ}$ olan temas açısı, % 2,0 (v/v) APTS derişiminde $59,3^{\circ}$ ’ye, % 8,0 (v/v) APTS derişiminde $62,1^{\circ}$ ’ye çıkmıştır. Şekil A.3’te, farklı derişimlerde işleme tabi tutulmuş olan APTS immobilize edilmiş yüzeylerin AFM görüntüleri gösterilmiştir.

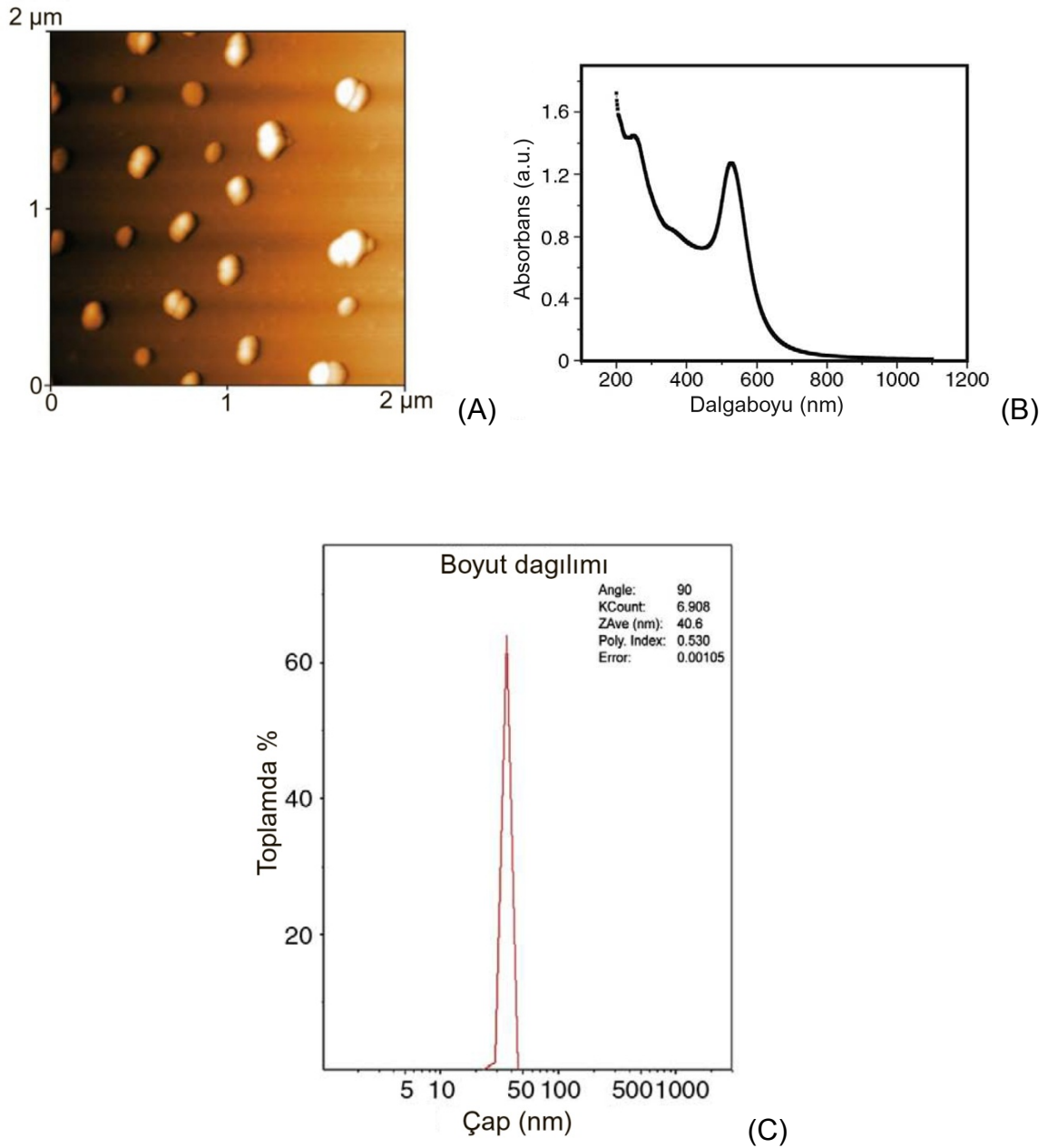


Şekil 3.9.4- APTS derişiminin, kalınlık ve temas açısı değişimi cinsinden etkisi (etkileşim süresi 2 saat)

Hidroksillenmiş cam yüzeyinde görülen noktasal bozukluklar, camın ilk temizlenme sırasında nitrik asit ile yıkanması sonucu oluşan yüzey bozukluklarıdır. APTS immobilize edilmiş yüzeyde ise yüzey homojenliği, oluşan agregatlar nedeniyle bozulmuş durumdadır. APTS moleküllerinin hidroksillenmiş cam yüzeye kısa erimli *van der Waals* kuvvetleri ile bağlanması sonucu rastgele dağılımlı ancak nispeten düzenli kümeler oluşur. AFM görüntülerinden alınan karekök ortalamasının karesi (root mean square- RMS) değerleri, hacimce % 0,5 APTS için 0,49 nm; hacimce %1,0 APTS için 0,73 nm; hacimce % 2,0 APTS için 0,79 nm ve hacimce % 8,0 APTS için 1,96 nm olarak belirlenmiş ve diğer verilerle uyumlu sonuçlar ortaya çıkarmıştır.

3.9.2.2 AuNPs ile modifiye edilmiş cam yüzeyler

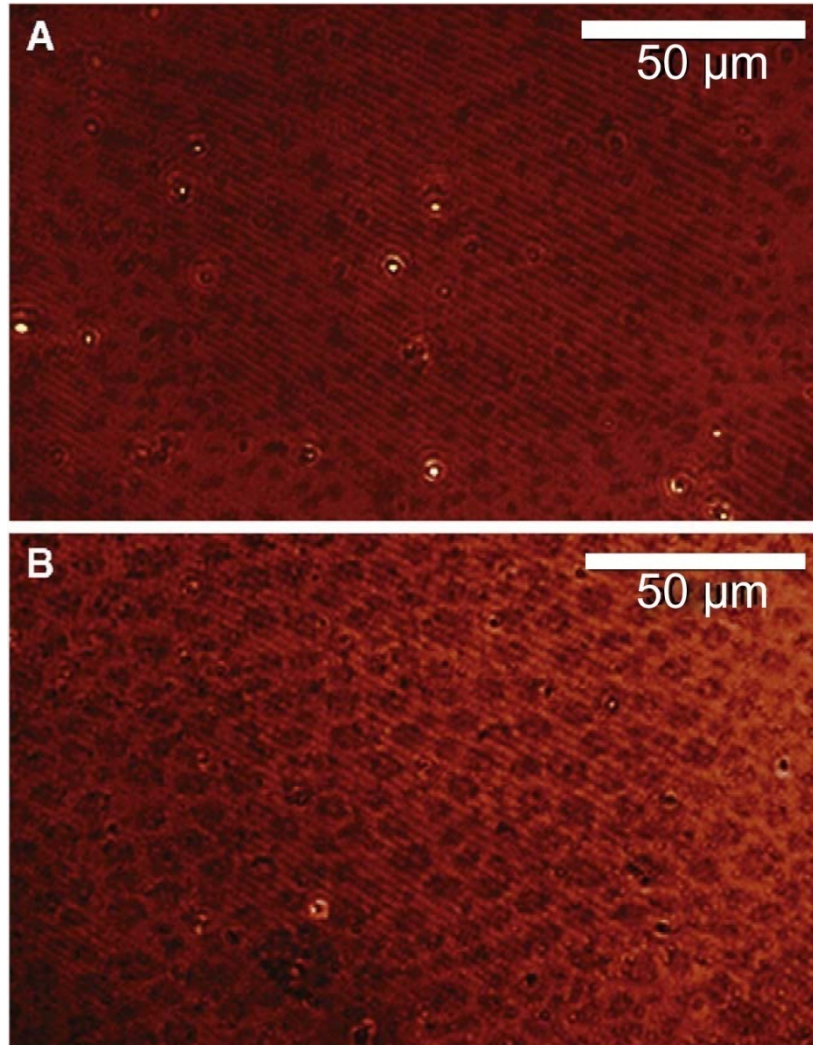
40 nm civarında boyutu olan AuNPs sıvı ortamda 526 nm lokalize plazmon rezonans (LPR) gösteren örneklerdir. Sentezlenen altın nanopartiküllerin AFM görüntüleri, UV-spektrumu ve zeta-boyut ölçer sonuçları Şekil 3.9.5'te gösterilmiştir.



Şekil 3.9.5 - 40 nm boyutlarında AuNPs'in (A) AFM görüntüsü, (B) UV-Vis spektrumu, (C) zeta- boyut ölçer sonuçları.

AuNPs farklı derişimlerde 11-merkaptoundekanoik asit (MUA)'nın etanoldeki çözeltileri ile farklı zaman aralıklarında (0 saat - 24 saat) oda sıcaklığında modifiye edilmiştir. Spektrometrik yöntemle, optimum MUA derişimi % 6,0 (v/v) MUA'nın etanoldeki çözeltisi, immobilizasyon süresi de 1 saat olarak belirlenmiştir. AuNPs'in MUA ile modifiye edilmesinin ardından (modAuNPs), modifiye nanopartiküller EDC aktivasyonu yoluyla farklı sürelerde (1 saat - 24 saat) APTS modifiye edilmiş cam yüzeyine immobilize edilmiştir. Yüzey doluluğunu en uygun sağlayan EDC aktifleştirme süresi 3 saat olarak belirlenmiştir.

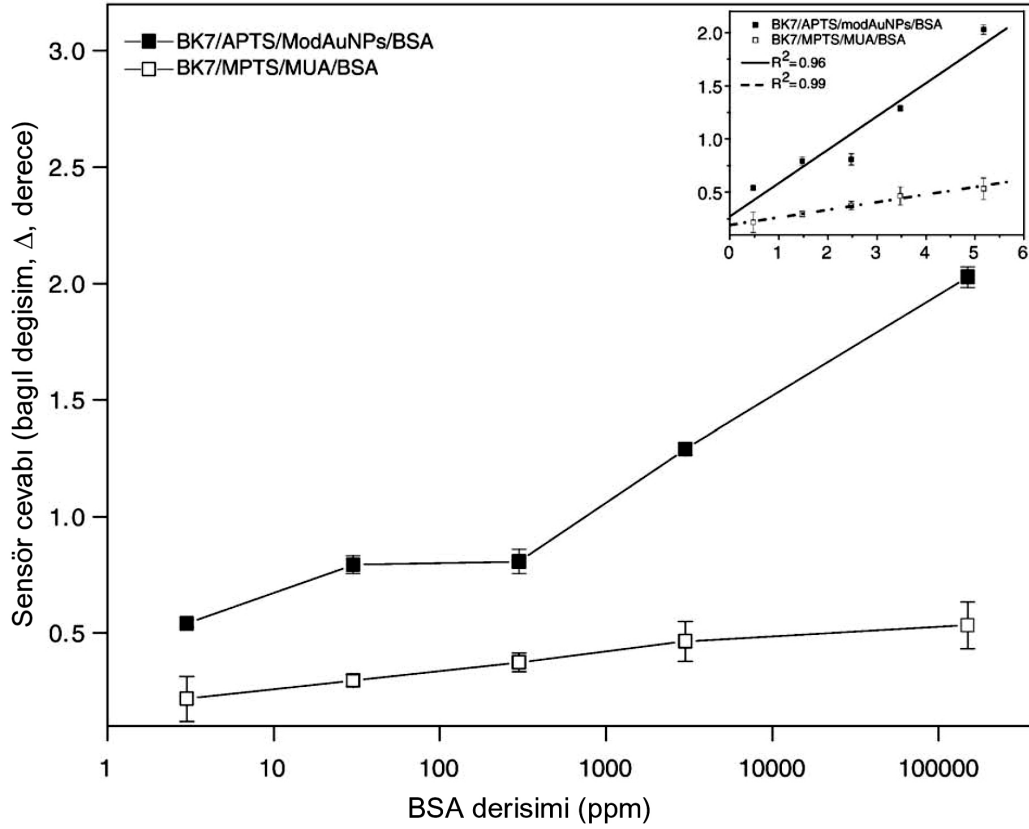
Cam yüzeyinin modifiye AuNPs ile immobilize edilmesinin ardından cam yüzeyler açık mavi bir görünüm elde edilmiştir.



Şekil 3.9.6 – Modifiye AuNPs/APTS/BK7 yüzeyinin AuNPs ile fonksiyonelleştirildikten sonraki 2 boyutlu elipsometrik görüntüsü (A) 3 saat sonra (B) 24 saat sonra

İmmobilizasyon süresinin uzatılması ile amino sonlandırılmış yüzeylere AuNPs immobilizasyonu sırasında yüksek miktarda misel benzeri yapı oluşmuş ve AuNPs dağılımını etkilemiştir (Şekil 3.9.6).

AuNPs'in yüzeye immobilizasyonunun ardından elipsometrik biyosensör tepkisini ölçmek için kullanılacak model olarak BSA (protein) kullanılmıştır. BSA adsorpsiyonu sırasında protein-AuNPs modifiye yüzeylerin etkileşimi elipsometrik olarak *in-situ* incelenmiştir. Sensör tepkisinin doğrusallığı açısından gerek AuNPs immobilize edilmiş yüzey, gerekse modifiye edilmemiş yüzey, doğrusal regresyon katsayısı incelendiğinde, benzer sonuçlar vermiştir.



Şekil 3.9.7 - BK7/APTS/modAuNPs/BSA ve BK7/MPTS/MUA/BSA yüzeylerinin elipsometrik sensör tepkileri (Δ 'daki bağıl değişim olarak)

Şekil 3.9.7’de görüldüğü gibi, modifiye AuNPs (modAuNPs) immobilize edilmiş sensör yüzeyleri, AuNPs olmayan yüzeylerden daha yüksek bir sensör tepkisi vermiştir. Sensör hassasiyeti doğru eğimi ile orantılı olduğundan, hassasiyette yaklaşık %450’lik bir artış olduğu söylenebilir.

Ayrıca, BSA bağlanmış yüzeyin optik kalınlığı elipsometre ile ölçülmüş ve Çizelge 3.9.1’de verilmiştir. Burada belirtilen kalınlık değerleri etkin kalınlık olup “mutlak kalınlık” değerleri değildir. Yatık durumda tam dolu BSA tabakasının 0,2 mg/cm² yüzey doluluğuna neden olduğu bulunmuştur.

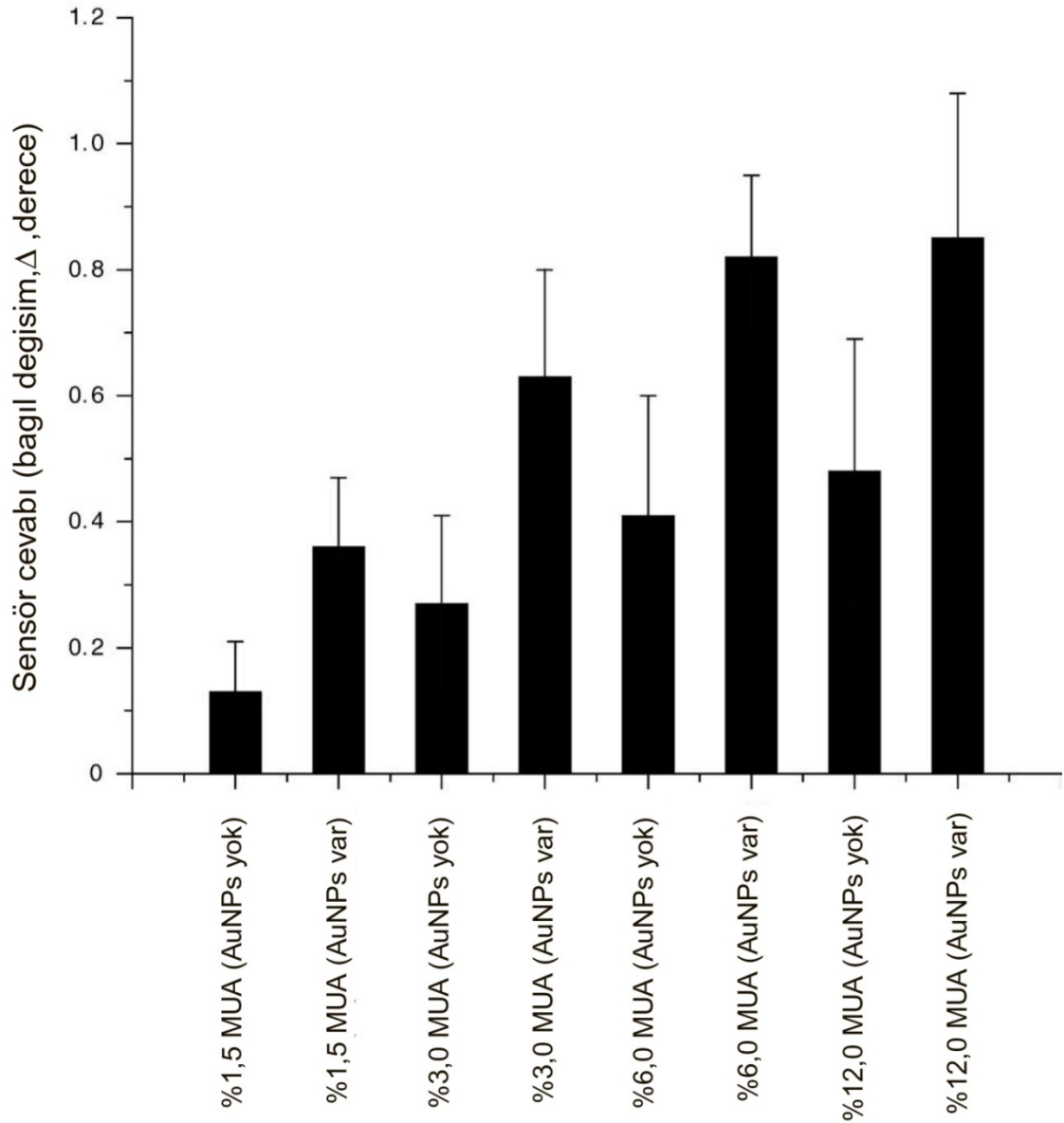
Bu değer BK7/APTS/modAuNPs/BSA yüzeyinde hesaplanan değere oldukça yakındır. AuNPs olmayan durumda yaklaşık % 50 dolulukta dik birikim olduğu söylenebilir. Her iki durumda da yüzey birikiminin fazla olmasının yanında, kritik açının üzerinde AuNPs’in LPR nedeniyle SPR’a destek olması, SPR benzeri etki nedeniyle sensör tepkisinin artmasına neden olmuştur.

Çizelge 3.9.1- BSA’nın BK7/APTS/modAuNPs ve BK7/MPTS/MUA yüzeylerindeki kalınlıkları ve yüzey doluluk değerleri.

BSA derişimi (ppm)	BK7/APTS/modAuNP s yüzeyinde bağıl BSA kalınlığı (nm)	BK7/MPTS/MUA yüzeyinde bağıl BSA kalınlığı (nm)	BK7/APTS/modAuNP s yüzeyinde bağıl BSA doluluğu (µg/cm ²)	BK7/MPTS/MUA yüzeyinde bağıl BSA doluluğu (µg/cm ²)
3	1,25±0,56	0,50±0,12	0,15±0,07	0,06±0,01
30	2,07±0,18	0,65±0,16	0,25±0,02	0,08±0,02
300	2,09±0,22	0,77±0,21	0,25±0,03	0,09±0,03
3000	2,39±0,44	0,86±0,09	0,29±0,01	0,10±0,01
15000 0	2,46±0,46	0,97±0,14	0,30±0,06	0,12±0,01

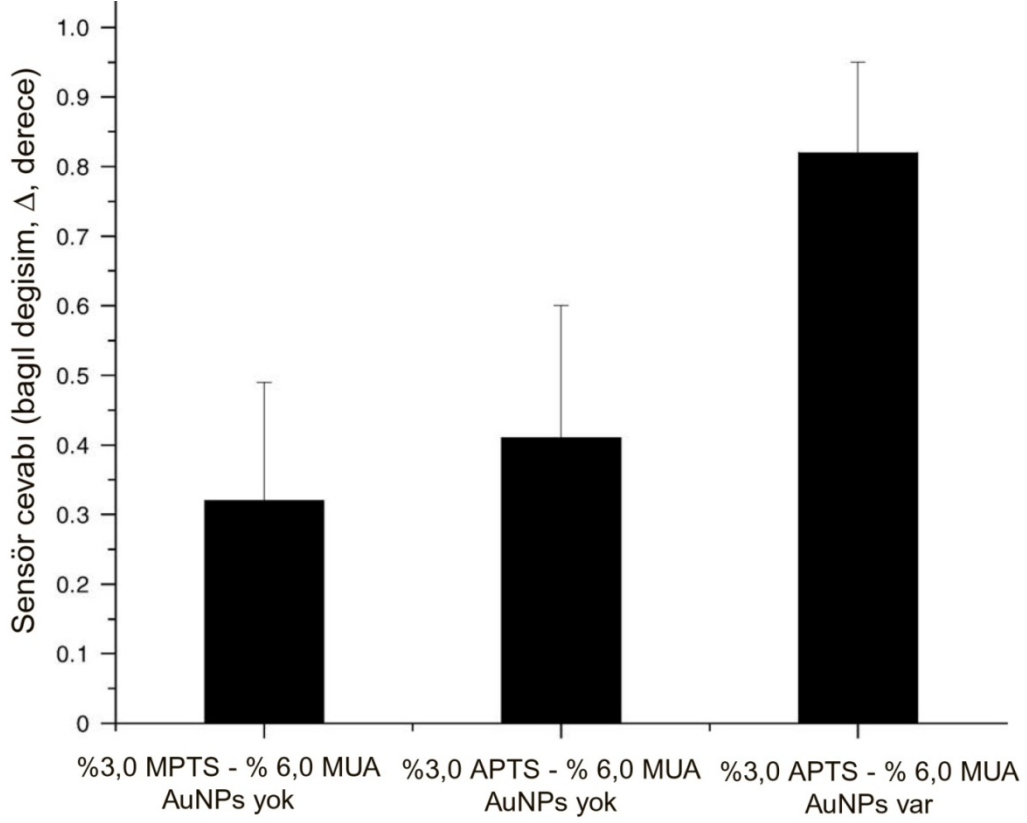
Bu çalışmada ayrıca; farklı MUA (%1,5 - % 12 hacimce) ve BSA (30 ppm) derişimleri kullanılarak AuNPs’in yüzeyindeki fonksiyonel karboksilik asit gruplarının ve yüzey alanı değışiminin etkisi de incelenmiştir.

Şekil 3.9.8’de görüldüğü gibi, MUA derişimi %1,5 (v/v)’tan %12,0 (v/v)’ye çıkarıldığında elipsometrik sensör tepkisinde (Δ ’daki değişim) küçük bir artış olmuştur. Aynı zamanda AuNPs olmadığı durumda %1,5 (v/v) ve %12,0 (v/v) MUA derişimi için elde edilen sensör tepkisi sırasıyla $0,13^\circ$ ile $0,48^\circ$ olmuştur. Sensör tepkisi MUA derişimi ile başlangıçta artmış ve yaklaşık %6 (v/v) MUA derişiminde hem AuNP’lü hem de AuNP’süz yüzeyler için sabit bir değere ulaşmıştır. Daha yüksek derişimlerde sensör tepkisi (örneğin %12,0 v/v MUA) kayda değer bir miktarda artmıştır (artış $< 0,03^\circ$ AuNPs olduğu durumda).



Şekil 3.9.8 – MUA moleküllerinin yüzey doluluğunun sensör tepkisine etkisi

Sensör tepkisinin diğer silanlar ile AuNPs'lerle etkisini belirlemek için MPTS, APTS, MUA ve AuNP kullanılarak farklı yüzeylerde elde edilmiştir. AuNPs ile modifiye edilmiş yüzeyin APTS ve MPTS ile karşılaştırılması sonucu daha yüksek sensör tepkisine neden olduğu görülmüştür (Şekil 3.9.9).



Şekil 3.9.9 – Farklı moleküller hazırlanarak oluşturulan kendiliğinden düzenlenmiş tek tabakaların ve AuNPs modifikasyonu yapılmış tek tabakaların bağıl sensör tepkileri.

3.9.3. Tartışma ve sonuç

Bilindiği gibi gümüş ve altın nanopartiküllerin sönümleme spektrumları, çevreleyen ortamın dielektrik sabitine oldukça bağlıdır. Buna ilaveten, çevre ortamındaki değişime bağlılık mesafeye bağlıdır ve analitin nanopartikül yüzeyine bağlanması ile yerel kırılma indisi değişir ve ara yüzeyde gerçekleşen bağlanma, optik özelliklerde de değişime neden olur (Marinakos ve ark., 2007; Ying ve ark., 2003). Bu nedenle, sensör tepkisindeki değişimi belirlemek için tek tabaka üzerinde AuNP olduğu ve olmadığı durumlarda deneyler yapılmıştır. AuNPs ile modifiye edilmiş

yüzey ile edilmemiş yüzey karşılaştırıldığında, özellikle yüzey alanı artışı ile daha yüksek sensör tepkisi alınmıştır. Temelde iki faktör AuNPs'in etkisini gösterir, birincisi protein moleküllerinin adsorplanabileceği daha fazla yüzey alanı sağlayan yüzey alanı artışıdır. Bu durumda, konformasyonel entropi baskın rol oynar ve adsorpsiyon yalnızca enerji etkileri ile kontrol edilmez. Yüzey doluluğu, yüzey ve adsorplanan molekül arasındaki etkileşim potansiyelini değiştirebilir. Böylece BSA molekülü daha düşük bir konformasyonel entropi kaybıyla farklı noktalara bağlanma imkanı bulur ve böylece bağlanma düz yüzeye oranla daha tercih edilebilir bir hale gelir.

Sonuç olarak, etiketsiz elipsometrik sensör tepkisini, kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar ve altın nanopartikül kullanarak, adımlı oluşturma (stepwise formation) yoluyla artırılabilceği gösterilmiştir. Bu çalışmada hazırlanan yüzeyler AuNP immobilize edildiğinde, gerek APTS gerekse MPTS tek tabakalarında daha yüksek sensör cevabı sağlamıştır. Bağlı sensör tepki artışı % 450 olarak hesaplanmıştır.

3.10. *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin mikro desenlenmiş SPR yongası ile tayini – Prob oligonükleotidlerin kendiliğinden düzenlenme ile immobilizasyonu

Tüberküloz (TB) *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) kompleksi (*M. Tuberculosis*, *M. Bovis*, *M. Africanum*, *M. microti*)'nin sebep olduğu ölümcül ve bulaşıcı bir hastalıktır (Raviglione ve ark., 2004). Dünya sağlık örgütüne göre (WHO) dünya nüfusunun 1/3'ü *M. Tuberculosis* ile enfekte olmuştur. Her yıl yaklaşık 10 milyon yeni tüberküloz hastasının ortaya çıktığı ve dünya çapında her yıl 3 milyon kişinin tüberküloz nedeniyle öldüğü tahmin edilmektedir (WHO, 2000). *M. Tuberculosis* tanısında, yavaş büyüyen organizmanın kültürde çoğaltılması yolu ile tanısı yaygın olarak kullanılmaktadır, ancak bu yöntem 8 hafta kadar sürebilmektedir. Daha gelişmiş kültür teknikleri ise pahalı ve karmaşık cihazlar gerektirmektedir.

Çalışmanın bu bölümünde *M. Tuberculosis* kompleksinin oligonükleotid proba tanınması için SPR esaslı ve ileriye yönelik olarak aynı anda birden fazla *Mycobacterium* türünün tayinine de olanak sağlamak için bir yonga yüzeyinde birden fazla molekülün analizini sağlamak amacıyla mikro-desenlenmiş yonga ile tanınması hedeflenmiştir.

Bu çalışma için, tek sarmal ve tiyol sonlandırılmış *M. Tuberculosis* kompleksinin karakteristik dizilimine eşlenik bir oligodeoksinükleotid (ODN) prob kullanılmıştır. Çalışmanın daha önce 3 kanallı bir kompakt SPR sistemi olan SPREETA™ ile yapılmış olması nedeniyle, mikro desenlenmiş yüzeye kendiliğinden düzenlenme (self assembly) yoluyla prob immobilizasyonunun etkinliği ve elde edilen sensör yongalarının duyarlık, tekrarlanabilirlik vb. parametreler açısından performansı karşılaştırılmıştır (Duman ve ark., 2009).

Ayrıca sensör yongasının seçiciliği, farklı dizilime sahip hedefin yüzeye gönderilmesi ile de kontrol edilmiştir.

3.10.1. Deneysel çalışma

3.10.1.1 Mikro-desenlenmiş yüzeylerin oluşturulması

SPR yongası olarak SF10 cam slayt üzerine, fiziksel buhar birikim yöntemi ile kaplanmış Cr yapıştırıcı ve Au aktif film tabakalarından oluşan ve 532 nm ışık dalga boyunda 63° geliş açısında SPR verdiği bilinen yüzey kullanılmıştır.

Cam slaytlar kaplanmadan önce, organik kirliliklerin giderilmesi için (hacimce 1:3 oranında) derişik nitrik asit/su karışımında 30 dakika süresince kaynatılmış ve ardından saf su ile durulanmış ve 100 W plazma ile 30 dakika süresince işlem görmüştür.

Cam substrat, temizleme işleminin ardından HV (yüksek vakum) PVD (fiziksel buhar birikim) cihazında öncelikle 3 nm Cr ve ardından 32 nm Au ile kaplanmıştır. Kaplanan yüzeyler fotolitografi ile mikro-desenlenmiştir. Mikro-desenleme için uygun yüzey olarak 200 µm x 200 µm noktacık diziliimli maske kullanılmıştır. Fotolitografi ile desenleme çalışmaları Bölüm 3.3'te anlatıldığı şekilde ve bu bölümde belirtilen cihazla gerçekleştirilmiştir.

Fotolitografi ile oluşturulan desenler, prob immobilizasyonu ve bloklama ajanı immobilizasyonu sırasında yüzey morfolojisi ve kalınlıkları; Nanofilm EP3 Nulling Elipsometre (Nanofilm Technologie GmbH, Almanya) ile ölçülmüş ve gözlemlenmiştir.

3.10.1.2. ODN immobilizasyonu

Mycobacterium tuberculosis kompleksinin karakteristik dizilimine uygun (Çizelge G.1) SH sonlandırılmış probler TIB-MOLBIOL (Almanya)'den temin edilmiştir. MTB probu HS-(CH₂)₆-T₁₅ yapısında bir uzatma molekül grubu (spacer arm) içermektedir. (CH₂)₆ grubu, bloklama ajanı olarak kullanılacak olan merkaptto hekzanol ile yaklaşık aynı uzunluktadır ve molekül yapısı olarak esnek olmayan bir

gruptur. 15 T'lik uzatma ise, probun tanıyıcı kısmının yüzeyden uzaklaşmasını sağladığı gibi, proba esneklik vererek etkileşim şansını artırmaktadır.

Bir önceki çalışmada (Duman ve ark., 2009), PCR ürünü hedefin de kullanılmasına rağmen, çalışmanın bu basamağında PCR ürünü kullanımı tercih edilmemiştir. 209 baz çiftinden oluşan PCR ürünü, moleküller engelleme nedeniyle yüzeye sentetik hedeften daha az bağlanma eğiliminde olmasına rağmen, yüksek molekül kütlesi nedeniyle SPR'da daha yüksek sinyal verme eğilimindedir. Bu nedenle önceki çalışmada belirlenen ve daha yüksek sensör sinyali alınmasına neden olan PCR ürünü bu çalışmada kullanılmamış, sentetik hedef ile alınacak sonucun PCR ürünü ile de alınacağı düşünülmüştür.

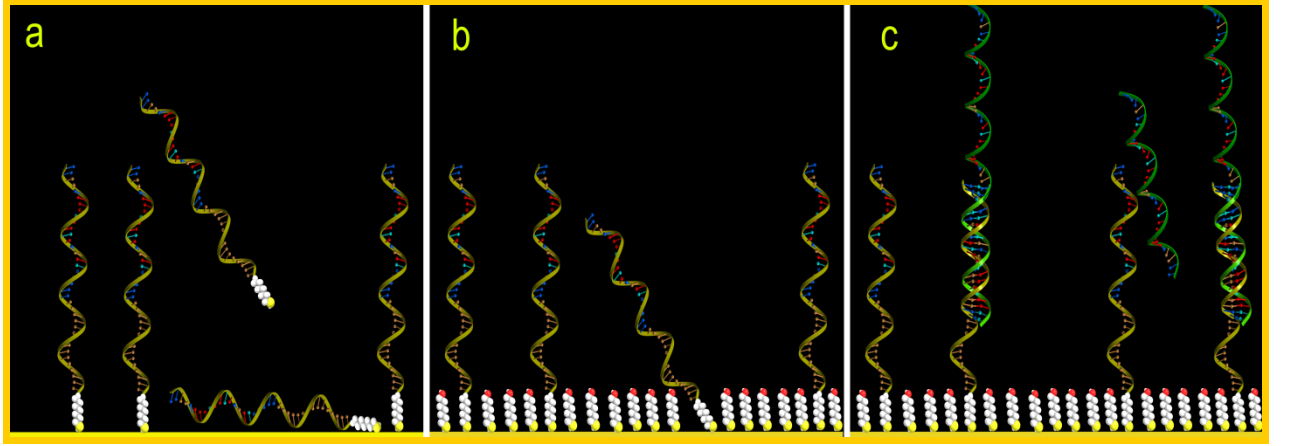
Sentetik ODN hedef dizilimi ile karşılaştırma amacıyla kullanılan ve ODN probun eşleniği olmayan hedef dizilimi Çizelge 3.10.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.10.1 – Çalışmada kullanılan ssODN hedef, prob ve eşlenik olmayan kontrol hedefi dizilimleri

Prob	Dizilim
MTB-hedef-ssODN	5'-C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC-3'
MTB-prob-ssODN	5'-(HS-(CH ₂) ₆ -(T) ₁₅ -GGG TGC ATG ACA ACA AAG TTG G-3'
Eşlenik olmayan hedef ssODN	5'-A GTC AAT GCG GTA AAC CCG ACT-3'

Desen yüzeyine ODN immobilizasyonu, farklı prob derişimlerinde (0,05 µM – 2,0 µM) 1 M KH₂PO₄ (pH 3,8) tamponu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Prob immobilizasyonu sonucu sensör tepkisi, SPR yapılandırmasındaki elipsometre ile incelenmiştir. Bağlanmanın hemen ardından, dengeye ulaşıldığında; boşta kalan altın yüzeyinin hedef ODN tarafından tercih edilmesini engellemek için bloklama ajanı olan MCH immobilize edilmiştir.

Önceki çalışmalar ile karşılaştırılabilmesi açısından MCH, pH 3,8 fosfat tamponu içerisinde 0 mM – 4 mM derişim aralığında hazırlanarak, bir önceki çalışmada optimum ODN miktarına sahip yüzeye gönderilmiştir. Bloklama ajanının bir amacı da yüzeye yatık olarak yönlenmiş ON problemlerin oryantasyonunu sağlamaktır (Şekil 3.10.1). MCH immobilizasyonunun ardından mikrodeseenlenmiş oligonükleotid problemlerden ve bloklama ajanı MCH'tan oluşan sensör yüzeyine, 0,05 μ M ila 2 μ M derişimde (fosfat tamponu pH 7,4) sentetik hedef ODN gönderilmiş ve etkileşim eş zamanlı olarak incelenmiştir.



Şekil 3.10.1 – (a) Prob immobilizasyonu, (b) Bloklama amaçlı MCH immobilizasyonu ve (c) Hedef ODN ile etkileşim

Kontrol açısından, optimum koşullarda prob immobilize edilmiş yüzeye eşlenik olmayan ODN hedef gönderilerek sensör tepkisi incelenmiştir.

3.10.2. Sonuçlar ve tartışma

3.10.2.1 Prob ve MCH immobilizasyonu

Oligonükleotid esaslı sensör hazırlamada en önemli basamak ODN'lerin doğru konformasyon ve derişimde yüzeye immobilize edilmesidir. Genellikle etkileşimin olduğu bazların yüzeyde açık ve bağlanmaya uygun olması için bir uzatma kolu görevini görececek bir molekül grubu kullanılır. Uzatma amaçlı molekül grubu olarak,

önceki çalışmalarda uygunluğu kabul edilen $-(CH_2)_6-T_{15}$ grubu kullanılmıştır (Duman, 2007). Burada kullanılan $(CH_2)_6$ grubu hem uzatma kolu olarak görev yapmakta, hem de moleküler etkileşim yoluyla bloklama ajanının tek tabaka oluşturmasını sağlamaktadır. Diğer taraftan, 15 adet T ise hem proba esneklik kazandırmakta, hem de hedef oligonükleotidin yüzeye afinitesini artırıcı bir rol oynamaktadır.

Tiyol grubu ile fonksiyonelleştirilmiş ODN probalar (ODN-SH) altın yüzeyine tiyol grubu üzerinden kolayca tek tabaka formasyonunda bağlanabilir. Ancak, işlemin kolay olmasına rağmen, iki temel sorunla karşılaşmak olasıdır:

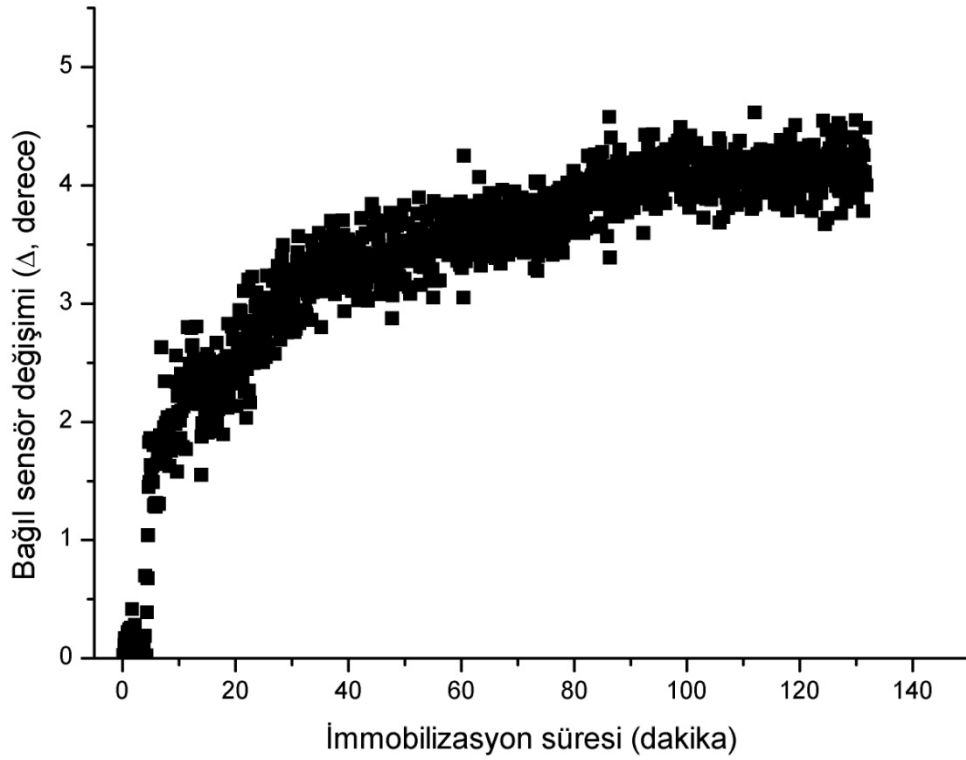
1. SH sonlanmış moleküllerin yüzeyde oldukça sıkı istiflenmiş tek tabaka oluşturduğu bilinmektedir, bu nedenle aşırı yığılma sterik engellemeye neden olabilir.
2. Esnek olan ODN probun uzunluğu arttıkça pürin ve pirimidin bazlarındaki azot nedeniyle altın yüzeyine spesifik olmayan şekilde immobilize olarak yan yatabilir (Herne ve Tarlov, 1997)

Dikey oryantasyonu sağlamak ve altın yüzeyine hedefin spesifik olmayan şekilde bağlanmasını engellemek için benzer çalışmalarda 6-merkapt 1-hekzanol (SH- $(CH_2)_6$ -OH) kullanılmıştır (Steel ve ark., 2000; Ito ve ark., 2007).

Bloklama ajanı olarak MCH'in uygunluğu nedeniyle, prob molekülü sentezi sırasında uzatma molekülü olarak $(CH_2)_6$ grubunun kullanılması, MCH immobilizasyonunda oldukça sıkı istiflenmiş bir tek tabakanın oluşumunu ve ODN problemleri arasına MCH'ların girmesi ile ODN problemlerin oryantasyonunun kolaylaştırılmasıdır (Şekil 3.10.1). Ayrıca MCH, SH gruplarından altın yüzeyine yüksek afinite ile bağlanırken açıkta kalan OH grubu nispeten hidrofilik bir yüzey sağlayarak spesifik olmayan etkileşimleri azaltmaktadır.

ODN doluluğu denge çalışması ile ve dengede kalınlıkların ölçülmesi yoluyla kontrol edilmiştir. ODN immobilizasyon süresinin, mikro-desenlenmiş alanlardaki yüzey kalınlığına etkisi 1 μ M ODN probun pH 3,8'de yüzeye immobilize edilmesi ve bağlanmanın eş zamanlı izlenmesi ile belirlenmiştir (Şekil 3.10.2). Dengeye ulaşma süresi belirlenirken 10 dakika, 30 dakika, 60 dakika ve 120 dakikada Δ değişimleri dikkate alınmıştır (Çizelge 3.10.2). 1.saatte Δ değişimi $(3,85 \pm 0,27)^\circ$,

2.saatte Δ değişimi ($4,14 \pm 0,19$)° olarak bulunmuştur. Bu nedenle, prob immobilizasyonu için 60 dakika surenin yeterli olduğu dnlmştur. ODN kalınlığı, elipsometrik olarak ölçülmüş ve 6 spot için (şekil 3.10.3) ortalama $2,23 \text{ nm} \pm 0,67 \text{ nm}$ olarak bulunmuştur. Kalınlık olarak yaklaşık 2 nm gibi düşük bir değerin çıkmasının sebebi, lmn çözücü bulunmayan kuru bir ortamda yapılması nedeniyle ODN probun yüzeye yatık olarak durması ve/veya muhtemelen mevcut azotlar üzerinden altın yüzeyinde yatık olarak duran proplar nedeniyleledir.

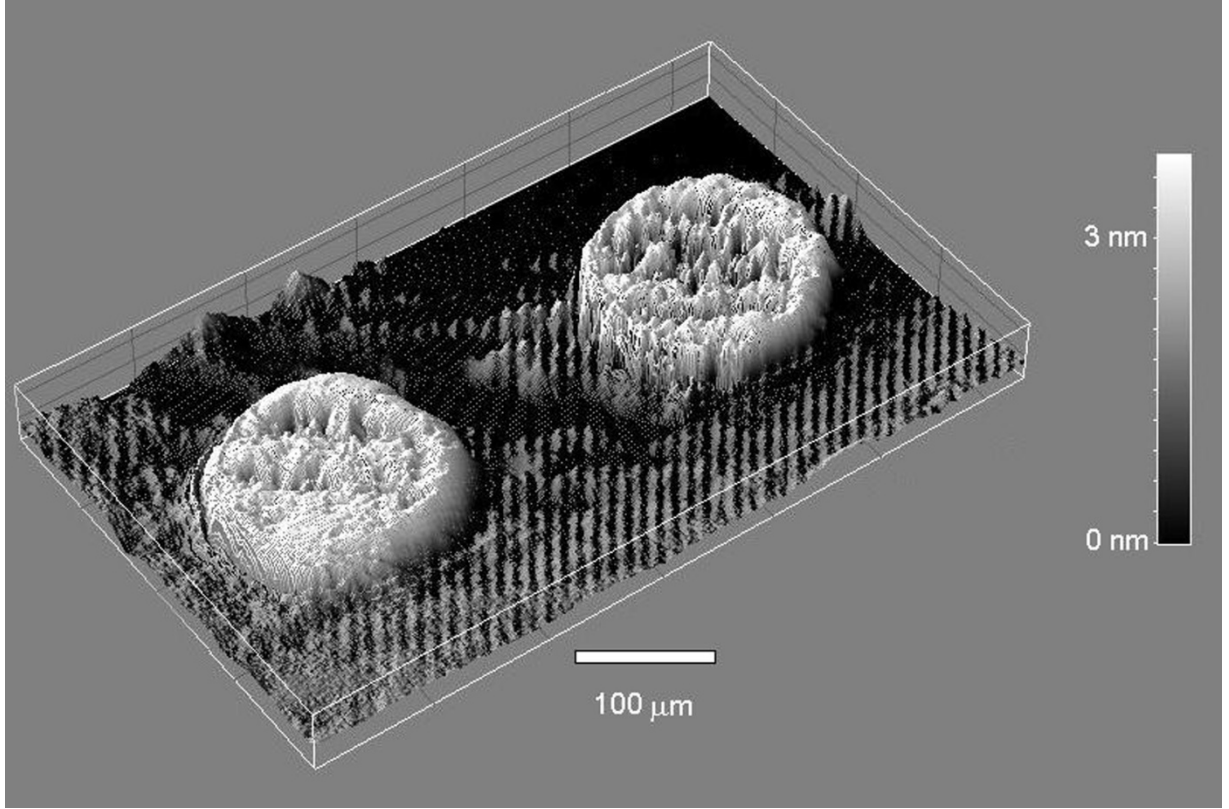


şekil 3.10.2 – Prob immobilizasyonu için sure optimizasyonu (1 μM MCH prob, pH 3,8 fosfat tamponu, oda sıcaklığı, akış hızı 5 $\mu\text{L}/\text{dakika}$, 1 spot için örnek, diğer spotlarda elde edilen değerler için ortalama $\leq 0,3^\circ$ 'lik bir standart sapma mevcuttur)

Çizelge 3.10.2 – Farklı sürelerde prob immobilizasyonu ile elde edilen sensör cevabı

Süre (dakika)	Sensör cevabı (Δ değişim, °)
10	1,59±0,24
30	3,04±0,16
60	3,85±0,27
120	4,14±0,19
Spot dışı	0,32±0,27

Prob molekül değişiminin immobilizasyona etkisi ise, 0,05 μ M – 2,0 μ M değişimdeki probun yüzeye immobilizasyonu ile belirlenmiştir. Dengeye gelmesi için 60 dakika beklenen örneklerin kalınlıkları elipsometrik olarak ölçülerek ODN değişimi optimize edilmiştir (Çizelge 3.10.3). Elipsometrik modelleme 4 bölge otomatik “nulling” prosedürüne göre yapılmış, modelde SF10/32nmAu/Organik tabaka/Hava tabakaları kullanılmış ve değerler 50 μ m x 50 μ m spot alanlarından, 6 farklı spotta 4 ayrı noktanın ortalaması olarak verilmiştir. ODN probu değişimi yüzeydeki birikime aşırı derecede etki etmemiştir. Yaklaşık 2 nm civarında yüzey doygunluğu elde edildiğinden, 1 μ M prob değişimi yeterli görülmüştür.



Şekil 3.10.3 – probODN (1 μM / 60 dakika) ve MCH (1 mM/ 30 dakika) immobilize edilmiş 200 μm çaplı spotların 3D elipsometrik görüntüsü.

Çizelge 3.10.3 – prob ODN derişiminin yüzeydeki formasyona etkisi.

ODN prob derişimi (μM)	Bağıl kalınlık (nm)
0,05	$1,24 \pm 0,32$
0,10	$1,80 \pm 0,29$
0,25	$1,91 \pm 0,41$
0,50	$2,12 \pm 0,37$
1,00	$2,23 \pm 0,67$
2,00	$2,46 \pm 0,21$

Bloklama ajanı MCH'in derişimi, 0,5 mM - 4mM MCH'in, desenlenmiş yonga yüzeyine doğrudan immobilizasyonu ile belirlenmiştir. Bloklama ajanı MCH immobilizasyonunda önceki denemelerde 30 dakika içerisinde dengeye ulaştığı bilindiğinden, bu çalışmada süre 30 dakika olarak belirlenmiştir (Çizelge 3.10.4). Çizelge 3.10.3'te görüldüğü gibi 1 mM MCH derişimi tek tabaka oluşumu için yeterlidir. MCH molekülünün VASP (Vienna Ab Initio Simulation Package) kullanılarak belirlenmiş teorik molekül uzunluğu 0,93 nm'dir. Elde edilen kalınlık değerine göre (1 mM için 1,21 nm $\pm$ 0,19 nm) MCH moleküllerinin sıkı istiflenmiş tek tabaka oluşturduğu söylenebilir.

Çizelge 3.10.4 – MCH immobilizasyonunda kullanılan MCH/etanol çözelti derişiminin yüzey formasyonuna etkisi

MCH prob derişimi (mM)	Bağıl kalınlık (nm)
0,05	0,97 $\pm$ 0,12
1	1,21 $\pm$ 0,19
2	1,29 $\pm$ 0,14
4	1,18 $\pm$ 0,12

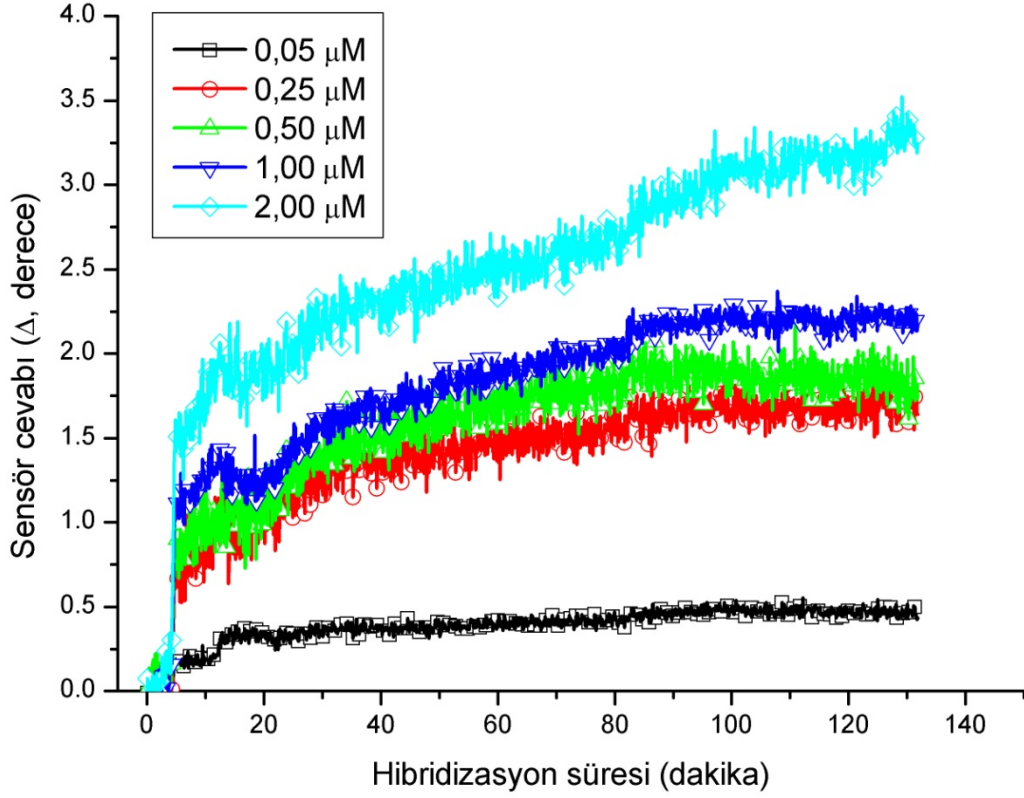
Belirlenen bloklama ajanı MCH derişimi 1 mM etanoldeki çözelti, prob immobilizasyonunun ardından yüzeyde MCH immobilizasyonu için kullanılarak (30 dakika) Au yüzeyin OH fonksiyonel grubu ile kaplanması sağlanmıştır. Prob immobilizasyonunun ve MCH immobilizasyonunun ardından kalınlık değeri elipsometrik olarak ölçülmüş ve 6 spot için ortalama 3,18 nm $\pm$ 0,32 nm olarak bulunmuştur. Herne ve Tarlov (1997) 25-merden oluşan olionükleotidlerin (tiyol fonksiyonel gruplu) tamamen uzatılmış halde(dik olarak yönlenmiş) kalınlığının, tamamen kaplanmış yüzeyde 16 nm'den fazla olacağını belirtmiştir. Bu değer, çalışmada ölçülen değerin üzerinde olmakla birlikte, bu düşük değer hem yüzeydeki nispeten düşük (tam doluluk olmaması) ODN prob derişimine, hem de oryantasyonu sağlamak için kullanılan MCH molekülünün proba göre nispeten küçük olmasına bağlı olabilir. Problemlerin yüzeyde dik olarak durdukları varsayılırsa doluluk oranının (tamamıyla sıkı istiflenmiş proba sahip yüzeye göre) %20'ler

civarında olduğu görülür. Ancak bu konuda kesin bir yargıda bulunmak mümkün değildir. Ayrıca, kalınlığın MCH immobilizasyonundan sonra artması, prob immobilizasyonunda yüzeyde boşlukların kaldığının da bir göstergesidir.

Literatürde, sık istiflenmenin ODN esaslı sensörlerde çok istenilen bir durum olmadığı görülmektedir. Sıkı istiflenme durumunda hedef ODN ile prob ODN arasındaki etkileşim substrat yüzeyindeki sterik engellemeler nedeniyle zayıf olabilir ve bu durumda hibridizasyon hızı ve miktarı oldukça düşer (Wang ve Bard, 2001).

3.10.2.2 Hedef ODN tayini ve sensörün denenmesi

Hazırlanan ODN probu immobilize edilmiş yüzey 0,05 μM – 2,0 μM derişime sahip hedef ODN ile etkileştirilerek hibridizasyon sonucu sensörden alınan cevap incelenmiştir. Önceki çalışmada (Duman ve ark., 2009), akış kanalları mikro-akışkan kanallar şeklinde ayrılmış 3 kanallı SPREETA™ sensör kullanılarak hibridizasyon çalışması yapılmıştır. Bu bölümde, akış tek kanaldan verilerek ve yüzeyde immobilize edilmiş problemlerin ayrıldığı mikro-desenli bir yüzeyde etkileşim incelenerek, bir SPR yongası üzerinde birden fazla (200 μm x 200 μm aralıklı noktasal hücreler ve mevcut SPRe-Elipsometre cihazı için 4x büyütmede aynı anda yaklaşık 16 spot) ODN prob- hedef etkileşmesinin incelenmesi amaçlanmıştır (Şekil 3.10.3). Bu amaçla tüm spotlara *Mycobacterium tuberculosis* kompleksinin karakteristik dizilimini tanıyan ODN problemler immobilize edilmiştir. Bu durumda beklenen, tüm spotlarda aynı sinyalin alınmasıdır. Hedef derişimine bağlı olarak sensör sinyalindeki değişim Şekil 3.10.4'te gösterilmiştir. Hedef derişiminin artması ile sensör tepkisi artmaktadır.



Şekil 3.10.4 – Hedef derişimine bağılı olarak sensör cevabının değişimi

Hibridizasyonun sonlanmasının ardından yüzeye gönderilen hibridizasyon tamponu ile tam olarak bağlanmamış moleküller yüzeyden uzaklaştırılmıştır (grafiklerde bu uzaklaştırma işlemi sırasında yüzeyden ayrılan molekül miktarının algılanamayacak kadar düşük olduğu için bu süre grafiklerde gösterilmemiştir).

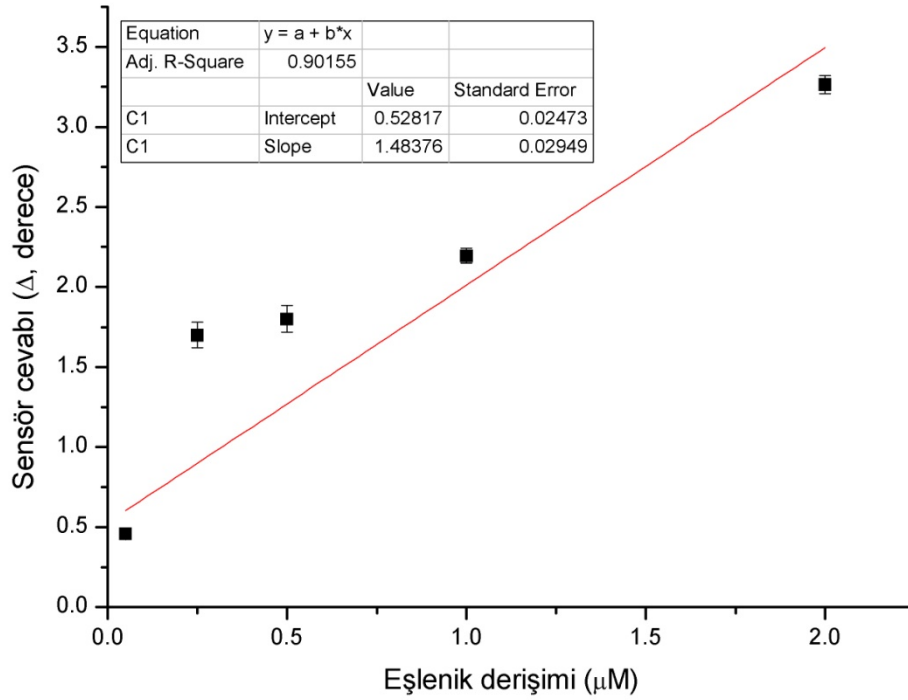
Sensör tepkisinin doğrusallığı (Çizelge 3.10.5), her bir derişimde dengedeki sinyalin değeri karşılaştırılarak incelenmiştir.

Çizelge 3.10.5 – Dengede alınan sensör cevapları

Eşlenik derişimi (μM)	Dengede alınan sensör cevabı, (Δ , derece)
0,05	$0,458 \pm 0,026$
0,25	$1,699 \pm 0,081$
0,50	$1,800 \pm 0,084$
1,00	$2,195 \pm 0,045$
2,00	$3,264 \pm 0,056$

Sensör cevabının doğrusallığı, R^2 0,90 olan bir doğru ile gösterilmiştir. Doğrusal çalışma aralığı nispeten yüksek derişimlerdir (Şekil 3.10.5). Şekil 3.10.5'te görüldüğü gibi, 0,5 μM sonrası sensör doğrusallığı daha yüksektir ($y = a + b \cdot x$ gibi bir doğru için a: 1,32571 ve b: 0,94431 olduğunda R^2 : 0,97 olmaktadır).

1 μM eşlenik ile hibridizasyonun ardından, kalınlıktaki değişim elipsometrik olarak incelendiğinde kalınlığın 6 spot için ortalama $4,21 \text{ nm} \pm 0,46 \text{ nm}$ olduğu bulunmuştur. Prob immobilizasyonunda yüzeyde düşük miktarda doluluk sağlanması nedeniyle (yaklaşık %20), ODN problara tam olarak hibridizasyon gerçekleşmiş olsa bile, kalınlık değerinin aşırı artması beklenmemektedir. Ito ve ark. (2007) ikili heliks sarmal ile sonuçlanan yüzey hibridizasyonunun sonuçta elde edilen yüzey kalınlığını çok fazla değiştirmediğini belirlemiştir.



Şekil 3.10.5 – Sensör tepkisinin doğrusallığı

Yüzeyin seçiciliği, optimum derişimde ancak yüzeydeki probun eşleniği olmayan ODN hedefin (Çizelge 3.10.1) fosfat tamponunda yüzeye gönderilmesi ile denenmiştir (1 μM hedef, pH 7,4 fosfat tamponu, 5 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ akış hızı, oda sıcaklığı). Dengeye ulaşma süresi sonunda elde edilen sinyal 6 spot için ortalama $0,1886 \pm 0,0124$ °'dir. ODN probun yalnızca eşleniğine spesifik olduğu ve hibridizasyon tamponu ile (pH 7,4) bu spesifikliğin korunduğu görülmektedir.

Benzer yüzeyin rejenerasyon ve raf ömrü gibi sensör performans özellikleri önceki çalışmalarda (Duman, 2007) belirlendiğinden, bu çalışmada bu parametreler incelenmemiştir. Hibridizasyon (sensör çalışma) sıcaklığı olarak oda sıcaklığının seçilmesi yine aynı çalışmada gerçekleştirilen 10 °C, 25 °C, 37 °C ve 45 °C sıcaklıkta hibridizasyon sinyali incelemesi sonucu kabul edilen bir değerdir. Yapılan çalışmalara göre, sıcaklığın artması ODN'de ikincil yapıların oluşmasına ve eşleniği ile gireceği hibridizasyon tepkimesinin azalmasına veya engellenmesine neden olmaktadır (Chen ve ark., 2007).

Çok kanallı SPR uygulamasında, akış kanallarının mikro-kanallar halinde bölünmesi ile, oluşacak akış sorunlarını ve sıcaklık dalgalanmalarını en aza indirmek ve aynı yonga yüzeyinde mikro spotlar kullanarak aynı anda birden fazla

moleköl tayinini gerçekleştirmek daha uygun bir yöntem olarak gözükmeKtedir. Elde edilen sonuçlar doğrusal ve hassas tepki veren mikro-desenlenmiş SPR yonga yüzeyinin, uygun mikrospotlama cihazı ile kullanılması ile yonga-laboratuvar (Lab-on-chip) uygulamasında kullanılabileceğini göstermiştir.

3.11. İzofthalik asit modifiye edilmiş altın yüzeylerin yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş (SPRe) içten tam yansımali elipsometri (TIRE) uygulamaları (SPRe-TIRE)

Çalışmanın bu bölümünde izofthalik asidin Au yüzeyine kovalent bağ yolu ile immobilize edilmesi sonucu elde edilen bakır duyarlı yüzeyin yüzey plazmon rezonansı ile güçlendirilmiş (surface plasmon resonance enhanced – SPRe) TIRE (SPRe-TIRE) sensörü olarak kullanılması denenmiştir.

Metal yüzeylerinin arildiazonyum tuzu kullanılarak elektrokimyasal indirgeme yoluyla modifikasyonu, karbon-metal kovalent bağının güçlü olması ve daha sıkı yerleşmiş kararlı tek tabakaların oluşturulabilmesi nedeniyle ilgi görmektedir (Allongue *et al.*, 1997)

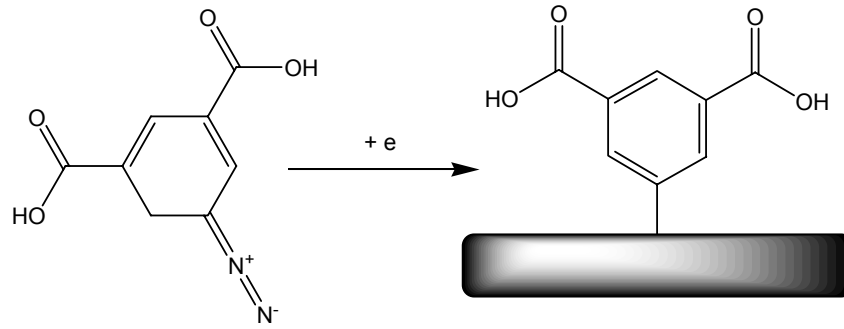
Çalışmanın bu bölümünde; 3,5-dikarboksil benzendiazonyum tetrafloroborat (veya 5-diazo-izofthalik asit tetrafloroborat) tuzu, 0,05 M tetrabütil-amonyum-tetrafloroborat (TBATFB) içeren asetonitril içerisinde elektrokimyasal olarak indirgenmiştir. Elde edilen yüzey, 3,5-dikarboksi fenil (izofthalik asit) pH duyarlı bir moleküldür ve çoğu geçiş metallerine özgü yüzey ligandı olarak bilinir. Elde edilen yüzey *iso*-(COOH)₂P-Au elipsometrik olarak karakterize edilmiş ve Cu²⁺ afinitesi SPR-e-TIRE yöntemiyle denenmiştir.

3.11.1 Deneysel çalışmalar

SPRe-TIRE uygulanmasında kullanılacak olan altın kaplı yüzeyler, 2,5 cm x 2,5 cm ölçülerinde kesilmiş SF10 cam slayt üzerine (n=1,78, 25 °C, 532 nm) fiziksel buhar kaplama yöntemiyle elde edilmiştir. Au-film kaplanacak cam slaytlar, organik kirliliklerin uzaklaştırılması amacıyla kaynamakta olan HNO₃ çözeltisinde (hacimce 1:3 sulu) 30 dakika süresince temizlendikten sonra oksijen plazma cihazında 30 dakika süresince işleme tabi tutulmuştur. Ardından fiziksel buhar birikim (PVD) cihazında 3 nm Cr (yapıştırıcı tabaka) ve 32 nm Au ile kaplanmıştır. Bu

kombinasyonun 532 nm dalga boyunda ve 63° geliş açısında SPR rezonansı verdiği bilinmektedir.

3,5-dikarboksil benzendiazonyum tetrafloroborat tuzu, 0,05 M tetrabütil-amonyum-tetrafloroborat (TBATFB) içeren asetonitril içerisinde elektrokimyasal olarak indirgenmiştir (Şekil 3.11.1). İndirgeme sonucunda elde edilen izoftalik asit immobilize edilmiş yüzey, temizlendikten sonra su ve etanol ile yıkanmıştır. Yüzeylerin kalınlık ölçümleri, Bölüm 3.6.1’de belirtilen cihaz kullanılarak 532 nm dalga boyunda ve 62° geliş açısında, elipsometrik olarak belirlenmiştir. Akış hücresi ile gerçekleştirilen SPRe-TIRE uygulaması ise 62° geliş açısında ve Cu^{2+} çözeltisi 5 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ akış hızında gönderilerek gerçekleştirilmiştir.

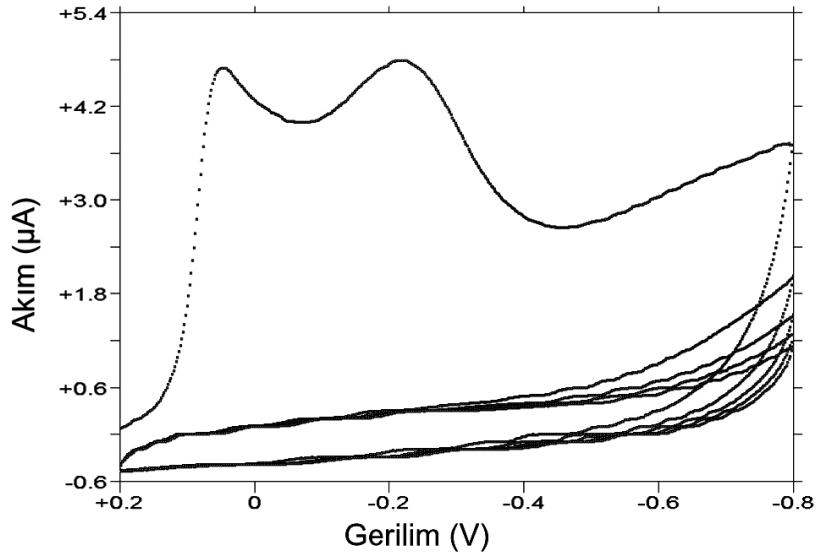


Şekil 3.11.1 – İzofthalik asit modifikasyonunun şematik gösterimi

3.11.2. Sonuçlar

3.11.2.1. IPA-Au yüzeyin hazırlanması

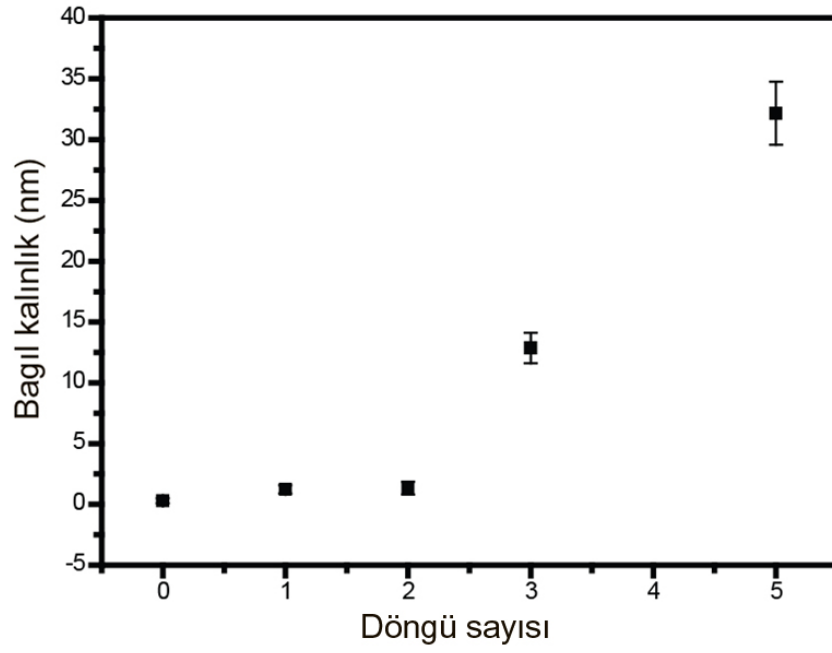
Altın yüzeyinde *iso*(COOH)₂PAu (IPA-Au) yüzeylerin oluşturulmasında elde edilen voltamogramlar Şekil 3.11.2’de gösterilmiştir.



Şekil 3.11.2 - IPA-DAS indirgemesine ait voltamogram.

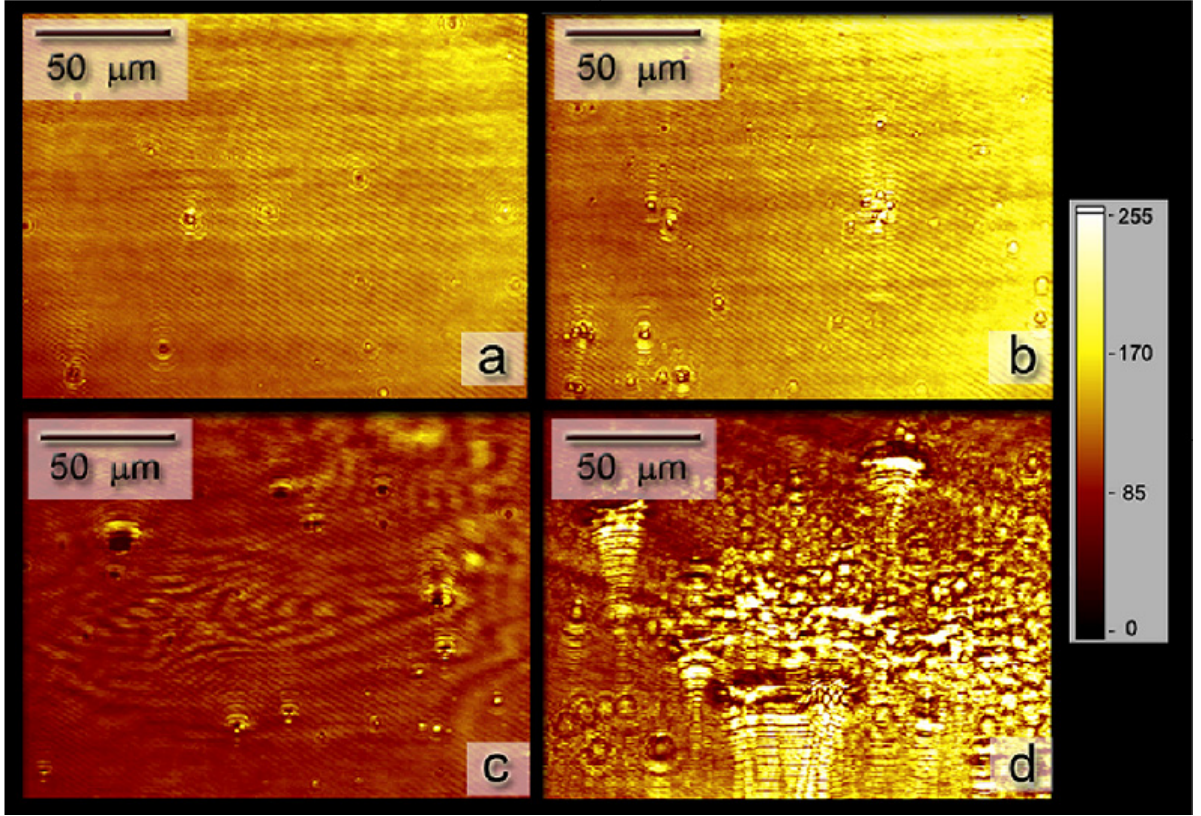
Şekil 3.11.2’de görülen tersinir olmayan katodik pikin IPA-DAS indirgenmesi ile oluşan radikalden ve bu radikalın kovalent olarak Au yüzeye bağlanmasından ortaya çıktığı düşünülmüştür. Ardışık taramalarda IPA-DAS indirgemesi, yüzeyin dolması nedeniyle engellenmiştir.

Şekil 3.11.3’te indirgeme döngülerine karşılık IPA tabakasının kalınlık değişimi görülmektedir. Kalınlık ölçümleri 50 µm x 50 µm alanda, 4 bölge otomatik sıfırlama işlemi ile elipsometrik olarak yapılmış, model parametreleri substrat (SF10)/Cr film/AuFilm/organik tabaka/hava için sırasıyla; 1,78; 3,04;0,414; 1,46 ve 1,00 olarak alınmıştır. Bilinen kalınlık değerleri Au:32 nm, Cr: 3 nm’dir. İlk bir kaç döngüde kalınlık artmamış, yüzey tek tabaka doygunluğuna ulaşmıştır. Aşırı indirgeme döngüsü sonucu ise moleküler birikim ortaya çıkmış ve yığılma nedeniyle kalınlık hızlı bir şekilde artmıştır (çoklu tabaka oluşumu). Bu durum 2 boyutlu elipsometrik görüntülerde de görülmektedir (Şekil 3.11.4).



Şekil 3.11.3 – İndirgeme döngüleri ile IPA tabakası kalınlığındaki değişim

Şekil 3.11.4'te görüldüğü gibi homojen olmayan yüzey nedeniyle çoklu birikim başlayan çekirdeklenmeler gözükse bile tek tabaka varsayımı 1 ve 2 döngü için geçerli sayılabilir. Döngü sayısı artırıldığında çekirdek oluşumlarının arttığı ve bu bölgede yığılmaların başladığı, Şekil 3.11.4 (c) ve daha yüksek döngüde çoklu tabakaların yayılması (Şekil 3.11.4 d) ile yüzey homojenliğinin oldukça bozulduğu görülmektedir.



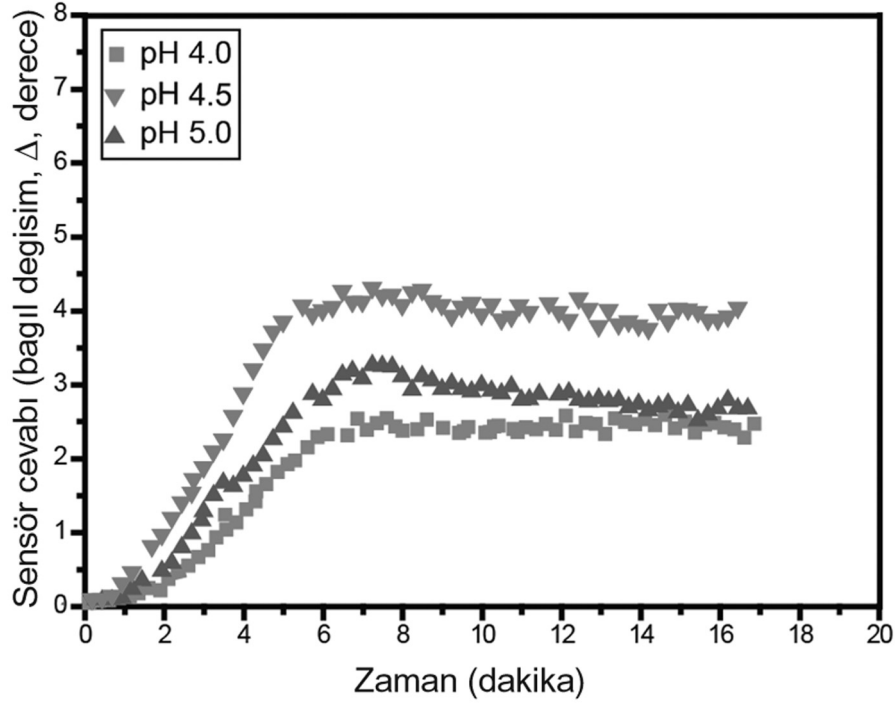
Şekil 3.11.4 - IPA-DAS indirgenmesi ile yüzey morfolojisindeki değişiklik (2 boyutlu elipsometrik görüntü) a) 1, b) 2, c) 3 ve d) 5 döngü için.

IPA-Au yüzeyine Cu^{2+} adsorpsiyonu 50 μL hacimli akış hücresinde Kretschmann geometrisine uygun yapılandırmaya sahip düzende gerçekleştirilmiştir. 60° SF10 prizma çoklayıcı ile ölçümler 62° geliş açısında (beklenen SPR açısının $-63^\circ - 1^\circ$ altı) alınmıştır. Deney sırasında optik emisiviteye bağlı değişimler ölçüleceğinden $\Delta(\text{delta})$ parametresi incelenmiştir.

3.11.3.2. Cu^{2+} adsorpsiyonuna ortam pH'ının etkisi

Asetat tamponunda 1×10^{-5} M Cu^{2+} çözeltisi, farklı pH'larda yüzeye gönderilerek, ortam pH'ının sensör tepkisi üzerine etkisi incelenmiştir. Şekil 3.11.5'te pH 4, pH 4,5 ve pH 5,0 için sensör tepkileri gösterilmiştir. Optimum pH, bağlanmanın daha

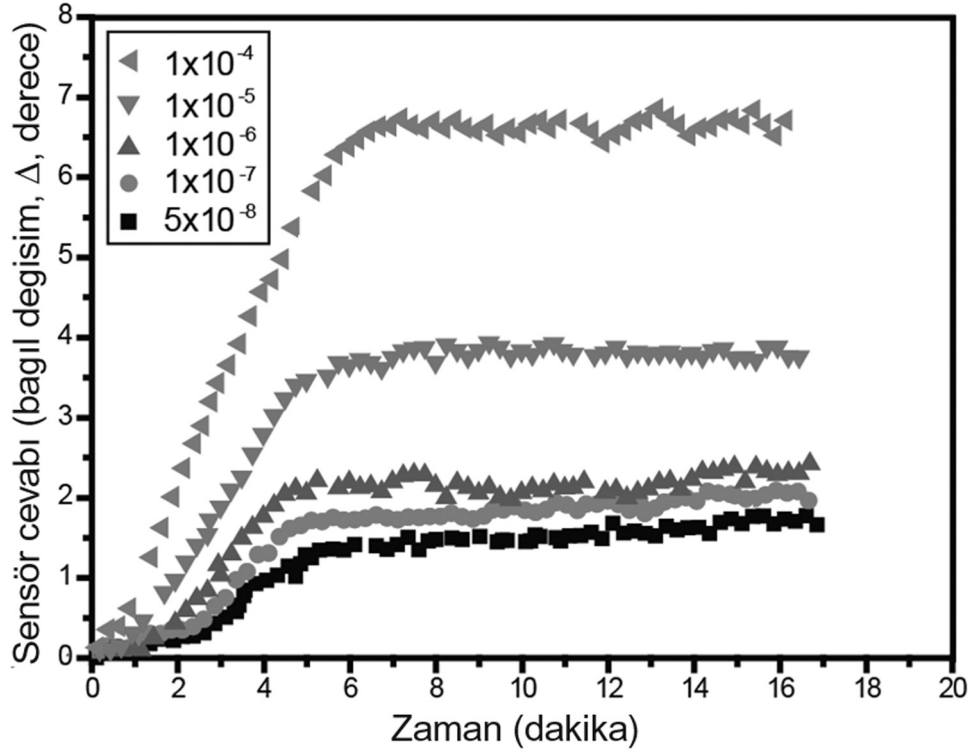
yüksek olduğu (ve dolayısıyla sensör tepkisinin daha yüksek olduğu) pH değeri olarak (pH 4,5) belirlenmiştir.



Şekil 3.11.5- Farklı pH'larda asetat tamponu içerisindeki Cu^{2+} çözeltisi ile elde edilen SPRe-TIRE sonuçları

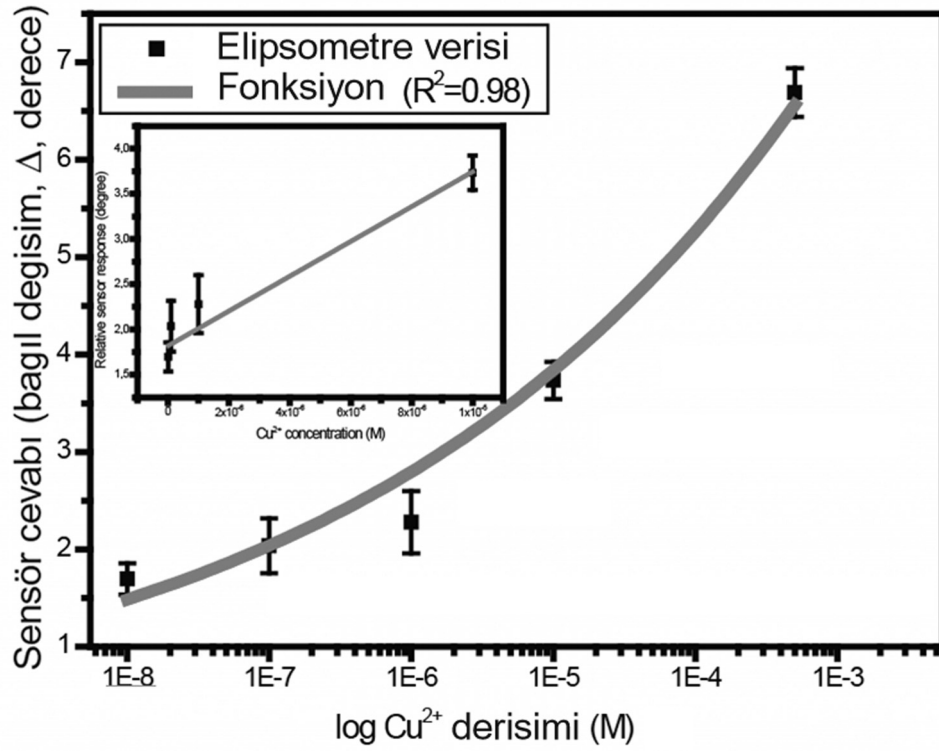
Sensör hassasiyeti ve doğrusallığı ile ilgili çalışmalar, belirlenen pH değerinde gerçekleştirilmiştir.

Farklı derişimlerdeki Cu^{2+} çözeltisi (asetat tamponu, pH 4,5) 10 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ akış hızında yüzeye gönderilmiş ve gerçek zamanlı sensör tepkisi alınmıştır. Bağlı sensör tepkisinin zamana bağlı değişimi Şekil 3.11.6'da gösterilmiştir. Sensör tepkisinin ölçüleceği çalışmada Cu^{2+} derişimi 1×10^{-4} M ila 1×10^{-8} M arasında seçilmiştir. Dengeye ulaşıldıktan sonra, asetat tamponu geçirilerek yüzey yıkanmış ve fiziksel olarak zayıf kuvvetlerle bağlı iyonların yüzeyden uzaklaştırılması sağlanmıştır.



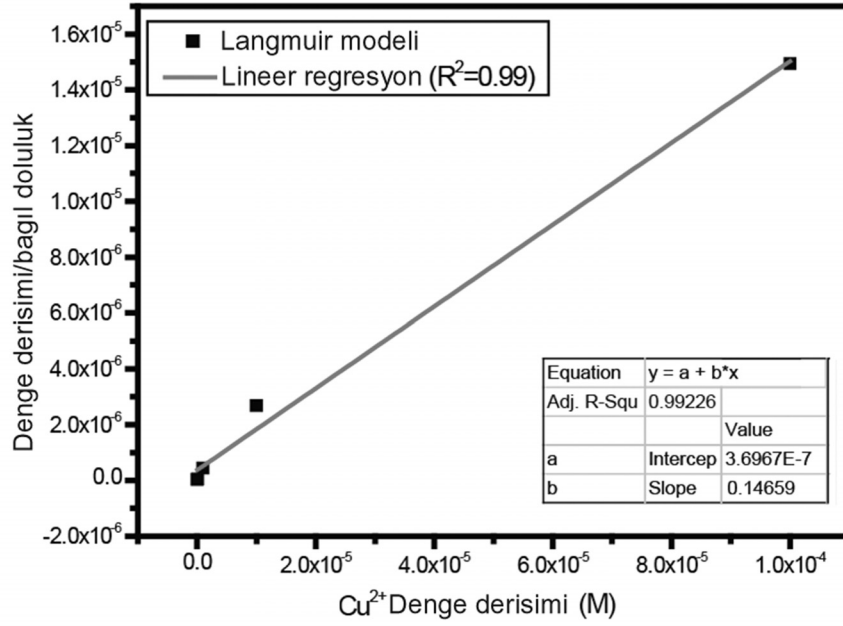
Şekil 3.11.6 - Farklı derişimlerdeki Cu^{2+} iyonu için SPRe-TIRE uygulamasından alınan sensör tepkileri (pH 4,5 asetat tamponu, oda sıcaklığı).

Dengedeki sensör tepkisi, derişime karşı grafiğe geçirildiğinde (Şekil 3.11.7) yarı logaritmik bir tepki alındığı görülmüştür. Sensör 1×10^{-6} M – 1×10^{-8} M aralığında doğrusal tepki vermiştir. Doğrusal bölgenin regresyon katsayısı $r^2 = 0,98$ olarak bulunmuştur.



Şekil 3.11.7 – Cu²⁺ derişimine karşılık dengede ulaşılan sensör tepkisi sonuçlarından elde edilen kalibrasyon grafiğı.

Denge derişimleri ile yüzey doluluğı, Langmuir modeline göre grafiğı geçirildiğinde Şekil 3.11.8’de gösterilen doğrusal değışim elde edilmiştir. Bu durum bağlanma karakterinin kompleks oluşturma yönünde olduğunu doğrular.



Şekil 3.11.8 - Cu^{2+} adsorpsiyonunun Langmuir modeline uygulanması.

Yalnızca dielektrik sabitinde k değerinin değişmesine neden olan iyon adsorpsiyonu, bu çalışmada başarılı bir şekilde gerçekleştirilerek SPRe-TIRE uygulaması ile eş zamanlı olarak gözlenmiştir. SPRe- TIRE uygulamasının bir avantajı olan bu durum, moleküler birikim olmayan yüzeylerde elektron mobilitesini değiştirebilecek herhangi bir fizikokimyasal sürecin de gözlenebileceğini göstermiştir.

Bu nedenle, mevcut çalışmanın uygulama alanlarına:

1. Yüzeyde enzim aktifliğinin kontrolü
2. Yüzeyde yükseltgenme indirgenme reaksiyonları
3. Yüzeyde elektron alışverişi
4. Yüzeye tutturulmuş katalizörlerin yaşlanma denemeleri vb. fizikokimyasal süreçler de ilave edilebilir.

4. YORUM

Biyosensörlerin spesifik hedefin miktarına bağlı olarak sürekli ve bazı durumlarda eş zamanlı veri üretebilmesi, hedef seçiciliğinin yüksek olması, özellikle belirli eşik değeri üzerinde “var-yok” tanısının hızlı olması gibi tercih edilen özelliklerinden dolayı, tez çalışmasında “biyosensör” olarak geliştirilebilecek sensörler üzerinde çalışılmıştır.

Sensör sistemlerinin tekrarlanabilirlik, duyarlık, tayin hızı ve güvenilirliğini artırmaya yönelik temel parametreler, bir sensörü oluşturan bileşenler temelinde gruplar halinde incelenmiştir.

Sensör bir “duyarlı” tabaka, bir transdüser (çevirici) ve bu transdüserden alınan verinin işlendiği ve güçlendirildiği elektronik birimden oluşur. Tez çalışmasına esas olan “optik temelli” transdüserlere sahip sensörlerin tercih edilmesi, tez çalışması sonucunda elde edilen bilgi birikiminin ucuz, taşınabilir, kitlesel üretime uygun, birden fazla türün analizinin yapılabilirdiği; “ihtiyaca yönelik” sensörlerin üretilmesinde ve geliştirilmesinde bir basamak olacağı düşüncesinden ortaya çıkmıştır.

Tezin “2. Genel Bilgiler” bölümünde belirtildiği gibi; mevcut olan transdüser sistemlerinden sahada kullanıma uygun olan “optik esaslı” sistemler, son 15 yılda ilgiyle izlenen ve gelişmiş çalışmaların son 10 yıldır sürdürüldüğü, “güncel”, “güvenilir” ve “geliştirmeye uygun” sistemlerdir.

Yüzey plazmon rezonans sensörleri ve elipsometrik sensörler, “reflektans” esaslı ölçüm sistemleridir. Her iki yöntem de, analizi yapılan örneğe zarar vermeyen bir analiz yöntemi olduğundan, çoklu doğrulama gereken analizlerde bir analiz basamağı olarak kullanıma da uygundur.

SPR, elipsometrik sistemlere oranla daha az duyarlı olmasına rağmen, küçültülebilme kapasitesine sahip bir analiz sistemidir. Bunun aksine, henüz küçültme ile ilgili çalışmalar gerçekleştirilmemiş olan elipsometrik sistemler ise, SPR sistemlerine oranla 10^3 ila 10^6 kat daha duyarlı bir sistemdir.

Tez çalışmasında her iki sistemde ayrı ayrı ve bütünleşik olarak denemeler yapılmıştır.

Bir biyosensörün duyarlı olan kısmı, biyomoleküler tanı bölgesi olup; gerek SPR, gerekse elipsometre sistemlerinde substrat yüzeyine “immobilize” edilir ve tanı, yüzey reaksiyonları ile gerçekleştirilir. SPR ile moleküler birikime cevap alınırken, elipsometre ile dielektrik sabiti ve moleküler birikim için sinyal alınabilir. Bu durum, elektron hareketlerinin gerçekleştiği, yükseltgenme-indirgenme tepkimelerinin olduğu veya katalitik sistemlerde de, moleküler birikim olmaksızın elipsometreden cevap alınmasını sağlar.

Tez çalışmasında SPR, Elipsometri ve SPR ile güçlendirilmiş elipsometri (SPRe-elipsometri) yöntemleri denenmiştir. Her bir çalışmada tayin sınırının çok düşük olmasına rağmen bu yöntemlerden SPRe-TIRE (bir başka deyişle içten tam yansımali elipsometri) yüzeyde iyon tayininde başarılı olarak kullanılmıştır.

Transdüser biriminin ardından, ikincil temel değişken “biyosensör” yongasıdır. Tez çalışmasında ağırlıklı olarak, sensör yongalarının substrat seçimi, hazırlık safhaları, immobilizasyon için yöntem seçimi ile immobilizasyon parametreleri ve immobilize edilen molekül grupları üzerinde çalışılmıştır.

Bu genel çalışma programına ilave olarak, tez çalışmasında elde edilen çıktılar aşağıdaki gibi ayrıntılandırılabilir. Tez kapsamında gerçekleştirilen ve 11 bölüm olarak incelenen çalışmaların genelinde elde edilen çıktılar; temel hedefler ve temel kazanımlar alt başlıkları şeklinde bu bölümde verilmiştir. Temel hedefler aşağıdaki şekilde sınıflandırılabilir: a) Yüzey plazmon rezonans (SPR) sensörünün optik yapılandırması (Bölüm 3.1) b) Taban malzeme seçimi (Bölüm 3.1, Bölüm 3.2, Bölüm 3.6) c) İmmobilizasyon teknikleri (Bölüm 3.6, Bölüm 3.7), d) Mikro-desenleme (Bölüm 3.3, Bölüm 3.4), e) Duyarlık artırıcı yöntemler (Bölüm 3.8, Bölüm 3.9, Bölüm 3.10 ve Bölüm 3.11) .

Bölüm 3.1’de gerek mevcut çalışmada, gerekse ileriki aşamalarda substrat seçiminde kullanılması amaçlanan; bir matematiksel yaklaşımla yansıma eşitliklerinin çözülmesi sonucu “reflektans” esaslı çalışan SPR ve elipsometrenin modellenmesi işlemi gerçekleştirilmiştir. Tezde, yalnızca tek düzlemdeki polarize ışık değişimini inceleyen bir yaklaşım kullanılarak, yalnızca SPR için reflektans eğrileri elde edilmiştir. Elipsometri için kullanılan modeller nispeten karmaşık olup

cihaz üretiminde temel basamaktır. Bu nedenle ticari açıdan muhtemel kayıplar olmaması için tez kapsamında verilmemiştir.

İzotropik malzemelerde ve uniform yüzeylerde modeller tam kesin sonuçlar vermektedir. Deneysel çalışmalarda oluşan ideal olmayan ortam ve yüzey bozuklukları nedeniyle modelleme ile deneysel çalışma arasındaki yakınlık, örneğin tez kapsamındaki bir çalışmada $\pm \% 0,6$ olarak bulunmuştur.

Bölüm 3.1’de elde edilen model ile yalnızca temel ve kolay ulaşılır taban malzemeleri için bir optimizasyon yapılmış olsa da; modelin farklı türde bileşen (substrat/metal tabakası/ organik tabaka) kombinasyonlarında da başarı ile uygulanması mümkündür. Ayrıca yine tez kapsamında verilmemiş olsa da, kinetik modellerin de uygulanması ile herhangi bir analizin “ideal” sonucunu belirlemek mümkündür.

Bölüm 3.2’de sensör yongalarının hazırlık ve üretim safhalarında uygulanacak temizlik yöntemleri karşılaştırılmıştır. Substratın cinsine ve kirlilik miktarına göre değişken olan bu yaklaşımların, iyi bir şekilde anlaşılması; duyarlık sınırı sub-nano olan SPR ile z-boyutu çözünürlüğü sub-nano olan elipsometre ve nanometre olan atomik kuvvet mikroskobu gibi yöntemlerde güvenilir ve tekrarlanabilir sonuçlar alınması açısından önemlidir. Temizleme için kirlilik miktarı belirli (bir başka deyişle üzerinde tek tabaka molekül immobilize edilmiş) substratlar kullanılmıştır. Bu yaklaşım, kalınlık ortalamalarında yüksek standart sapma değerlerine neden olmuşsa da (tek tabaka oluşumundan önce tüm yüzeylerin aynı yöntemle ilk temizliğinden dolayı), seçim sırasında istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar vermiştir. Deneysel hatanın miktarını belirleyecek referans temizlikte bir malzeme bulmak mümkün olmadığından bir karşılaştırma yapılamamış ve relatif temizlik değerlendirilmiştir. Uygulama esnasındaki kolaylık ta göz önüne alınarak bu bölümde, kuru yöntemlerin temizlik açısından uygun olduğuna karar verilmiştir.

Bölüm 3.3 ve Bölüm 3.4’te, bir yonga üzerinde birden fazla molekülün tayininin sağlanması için en uygun yöntem, taban malzemede mikrodeseenlenmiş algılama bölgeleri oluşturmaktır. Bu sayede mikro akışkan kanal yaklaşımından uzaklaşılarak, akıştan kaynaklanan sorunların en aza indirilmesi düşünülmüştür. Kullanılan cihazların (AKM hariç) düzlemsel (x-y) çözünürlükleri mikro-seviyede

olduğundan, desenlemenin mikro ölçekte yapılması uygun görülmüştür. Bölüm 3.3'te Ink-Jet litografi çalışmaları yapılmış ve teorik olarak 4 µm çözünürlüğe sahip sistemde uygulanabilir desen büyüklüğü 30 µm olarak belirlenmiştir. Sınırlardaki sapmalar, bazı durumlarda ± 10 µm'ye ulaşabilmektedir. Tek tabaka molekül immobilizasyon hızı, baskılama hızına eşit olan bu sistemle fabrikasyon kolaylığı olmasına rağmen, analiz bölgesine girebilecek desen sayısının artırılması amaçlandığından mikrodeseleme yöntemi olarak fotolitografi ile de çalışılmıştır. Fotolitografi çalışmaları, farklı desen ve boyutlardaki desenlerin, substrat yüzeyinde fotolitografik olarak oluşturulması ile gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.4). Sınırları belirli ve immobilizasyona uygun mikrodese boyutu 50 µm (desen) x 50 µm (aralık) olarak belirlenmiştir. Her iki sistem de (gerek Ink-Jet litografi, gerekse fotolitografi) el yapımı ünitelerdir.

Tezin bir sonraki basamağında, fotolitografi ile elde edilen desenlerden alınan SPR sinyali, mikrodese büyüklüğü ile karşılaştırılmıştır (Bölüm 3.5). Teoride, mikrodese alının sinyalin değişmemesi beklenirken, üretimden kaynaklanan sorunlar ve zorluklar nedeniyle, 20 µm desenli yüzeylerde alınması gereken sinyalin yaklaşık % 20'si oranında sinyal elde edilmiştir. Mevcut sistemde en uygun mikrodese boyutu olarak 100 µm tercih edilmiştir.

Bölüm 3.6'da temel substratlardan birisi olan ve kimyasal yapısı ucuz bir substrat olan cama benzeyen ancak yüzey kalitesi mükemmel bir substrat olan Si(001) yüzeyde, kendiliğinden düzenlenen tek tabakaların (SAM) oluşumu incelenmiştir. Amin sonlandırılmış tek tabakaların oluşturulduğu bu bölümde N(3-trimetoksipropil) dietilen amin (TPDA) kullanılmış ve tek tabaka için uygun immobilizasyon derişimi ve süresi sırasıyla 2 saat ve hacimce %2,0'lik etanol çözeltisi olarak bulunmuştur. Sürücü gücün ve alıkonma süresinin artırılması ile yüzeyde yığın oluşumu gerçekleştiği, çözeltide oluşan oligomerlerin yüzeye adsorplanarak çoklu ve uniform olmayan tabaka oluşturduğu gözlenmiştir. Ayrıca, yüzeyde yüksek enerji deformasyonlarının olduğu noktalarda başlayan bu çoklu tabaka birikiminin, adacıklar halinde gerçekleştiği ve derişim artışı ve alıkonma süresinin artırılması ile çapının ve yüksekliğinin arttığı görülmüştür.

Moleküllerin birbirini tanımasını sağlayan kuvvetler, çözücü tipine bağlı olduğundan; örneğin hidrojen bağları ile oluşan ve bir arada tutulan tek tabakalar su ve alkol gibi hidrojen bağı yapan çözücülerde kararlı olamaz. Bu nedenle çalışmanın bu basamağında, dielektrik sabiti 20 ila 2 arasında değişen (hidrofilikten hidrofobiğe) farklı çözücülerde tek tabaka oluşumu da incelenmiştir. TPDA-Si çifti için etanol, aseton gibi 20 ve üzerinde dielektrik sabitine sahip çözücülerde tek tabaka oluşumu gözlenmiştir. Benzen gibi hidrofobik çözücülerde ise, oligomer oluşumu gerçekleşmiş ve tek tabakanın yaklaşık 15 katı kalınlığında moleküler yığılma tespit edilmiştir.

Bölüm 3.7’de, çok basamaklı ve tabaka üstü tabaka yerleştirme yaklaşımı ile yüzey fonksiyonelleştirme çalışması gerçekleştirilmiştir. IgG’nin düzensiz immobilizasyonu ile spesifik antijene bağlanmayı sağlayan Fab bölgelerinin engellenmesi söz konusudur. Çalışmanın bu bölümünde Protein A kullanılarak IgG’nin yönlendirilmiş şekilde yüzeye immobilize edilmesine çalışılmıştır. Bu amaçla Si substrata sırasıyla 3-glisisidopropil trimetoksisilan (GPTS) tek tabakası immobilize edilmiş ardından 2-2’-(etilendioksi) dietilamin (EDA) kullanılarak yüzeye Protein A immobilize edilmiştir. En son basamakta ise floresanlı IgG immobilizasyonu ile yönlendirmenin gerçekleştirilip gerçekleştirilmediği kontrol edilmiştir. Çoklu tabakada, çözücü tipi, immobilizasyon süresi gibi değişkenler her bir basamak için ayrı ayrı optimize edilmiştir. Bu çalışmada ayrıca atomik kuvvet mikroskobu ile görüntüler alınmış ve EDA immobilizasyonu sırasında düşük derişimlerde bile oligomerleşme için çekirdeklenmenin oluştuğu gözlenmiştir.

Çalışmanın bir sonraki basamağında, alternatif sensör sistemi olan elipsometre kullanılarak, Bölüm 3.7’de elde edilen bilgi birikimi dahilinde fonksiyonelleştirilen yüzeye oligonükleotid prob immobilize edilerek DNA tanı sensörü yapılmıştır. Bölüm 3.8’de, 3-merkaptopropil trimetoksisilan (MPTS) ve 5’ucunda tiyol fonksiyonel grubu ve uzatma molekülü olarak 15 Timin bazı içeren oligonükleotid prob kullanılarak, tabaka üstü tabaka immobilizasyon yöntemi ile çalışmalar gerçekleştirilmiştir. MPTS ve ODN prob immobilizasyon süresi, çözücü tipi, vb. değişkenler optimize edilerek yüzeyde düzenli tabaka oluşumu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın bu bölümünde, çözücü etkisinin tek tabaka oluşumu üzerine etkisi olduğu bilindiğinden, dielektrik sabiti 33 ila 2,3 arasında değişen 7 tip çözücü

denenmiştir. Hidrofilitesi yüksek çözücü grupları ile MPTS'nin hidrofilik uç grubu çözünüp, uygun etkileşimle tek tabaka oluşumu sağlarken; hidrofobik çözücüler ile agregat ve çoklu tabaka oluşumu gözlenmiştir. 50 nM ODN hibridizasyonu sonucu 0,3 °'lık bir sensör sinyalinin elde edildiği bu çalışmada, kalibrasyon eğrisi 0 μ M – 2,5 μ M ODN derişiminde 0,96 regresyon katsayısı ile doğrusal çıkmıştır. Hibridizasyonun eş zamanlı olarak incelenmesi ile alınan sinyalin dengeye gelmesi (bir başka deyişle analizin tamamlanması) 20 dakikada gerçekleşmiştir.

Bölüm 3.9'da daha farklı bir yaklaşım denenerek, altın nanopartiküllerin SPR etkisi ile elipsometrik sensörün avantajlarının birleştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bölümde, cam substrat üzerine adımlı yüzey modifikasyon yöntemi ile altın nanopartiküller yerleştirilmiş ve bu partiküllerin içten tam yansıma elipsometrisinde (TIRE) hassasiyet artışına neden olup olmadığı incelenmiştir. 3-aminopropil trimetoksisilan (APTS) tek tabakası oluşumu için optimizasyon yapılmış ve cam yüzeyde yüzey bozukluklarının çok daha sık olması nedeniyle, agregat oluşumunun da silikon yüzeye göre daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Altın nanopartiküller, ayrı basamakta fonksiyonelleştirilmiş ve sonradan tek tabaka immobilize edilmiş yüzeye bağlanmıştır. Altın nanopartiküllerin immobilizasyon süresi uzatıldığında, partikül immobilizasyonun misel formunda gerçekleştiği gözlenmiştir. TIRE sensöründe BSA (sığır serum albümini), model biyomolekül olarak kullanılmıştır. Au nanopartikül (AuNP) immobilize edilmiş sistemde, AuNP bulunmayan sisteme göre relatif % 450 daha duyarlı bir sensör cevabı alınmıştır. Sinyaldeki artışın gerek LPR (lokalize plazmon rezonans) olgusundan, gerekse yüzey alanının relatif artışından gerçekleştiği düşünülmüştür.

Mikrodesenlenmiş SPR yüzeylerinde M. Tuberculosis oligonükleotid sensörü denemesi, fotolitografi ile oluşturulmuş 200 μ m'lik kuyucuklarda gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.10). Prob immobilizasyonun ardından, farklı derişimlerde eşlenik ile yüksek derişimde eşlenik olmayan hedef hibridizasyonu sonucu sensör tepkisi incelenmiştir. Bu bölümde prob immobilizasyonu, SH sonlandırılmış problemlerin kendiliğinden düzenlenmesi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. SH sonlanmış moleküller yüzeyde oldukça sıkı istiflenmiş bir formasyonda dizildiğinden, nispeten uzun prob moleküllerinin sterik engelleme oluşturmalarını engellemek amacıyla, düşük derişimde immobilizasyonun ardından merkaptotriazanol ko-immobilize

edilmiştir. Bu sayede, yüksek derişimde pürin ve pirimidin bazlarındaki azotun boşta kalan altın yüzeyi ile non-spesifik etkileşmesi de engellenmiştir. Ayrıca MCH kullanımı, nispeten rijit olan bu 6 karbonluk birimin, prob molekülüne de takılmış olması nedeniyle probun yüzeyde dik durmasını sağlamak açısından da önemlidir. Bu bölümde, sensör kalibrasyon eğrisi 0,90 regresyon katsayısına sahip bir doğru çıkmıştır. Sensörün doğrusal aralığı 500 nM – 2000 nM olarak belirlenmiştir ($R^2 = 0,97$). Kalınlık ölçümleri ile prob için yüzeyde toplam doluluk oranının % 20 olduğu bulunmuştur. Eşlenik olmayan ODN hedeflerin gönderilmesi ile 0,05 μM 'lık eşlenik hedefte elde edilen sinyalin yaklaşık 1/5'i sinyal elde edilmiş ve sensörün yüksek seçicilikte çalıştığı görülmüştür.

Son olarak, SPR ile güçlendirilmiş TIRE sensör uygulaması gerçekleştirilmiştir (Bölüm 3.11). 3,5-dikarboksil benzodiazonyum tetrafloroborat'ın elektrokimyasal olarak Au yüzeyde indirgenmesi ile oluşturulan iso-(COOH)₂P-Au (izoftalik asit) yüzey, sulu çözeltiden düşük derişimde Cu^{2+} iyonu tayininde kullanılmıştır. SPR sensörü kütleli birikime cevap veren (bir başka deyişle birikimle gerçekleşen kırılma indisi değişimine) bir sensör olmasına rağmen, TIRE sensör ile birleştirilerek 50 nM Cu^{2+} (pH 4,5) tayin sınırı elde edilmiştir. Ayrıca bu bölümde, tezin diğer kısımlarında kullanılan kendiliğinden düzenlenen tek tabaka yaklaşımı yerine alternatif bir yaklaşım (elektrokimyasal indirgeme) kullanılarak, yüzey immobilizasyon tekniklerinin esnekliği de gösterilmiştir. Çoklu indirgeme döngülerinde, yüzeydeki homojen olmayan noktalardan tabaka birikiminin olduğu elipsometrik analizlerle gösterilmiştir. SPRe-TIRE sensörünün 1×10^{-8} M ila 1×10^{-6} M arasında regresyon katsayısı 0,98 olan bir doğrusal tepki verdiği görülmüştür. Deney sonucu, Langmuir adsorpsiyon izotermine uygun sonuçlar vermiş olup, kompleks oluşumlu adsorpsiyon oluşumunun bir göstergesi olarak kabul edilmiştir.

SPRe-TIRE uygulaması dielektrik sabitindeki değişimlere duyarlı olduğundan, bu yöntemin yüzeyde elektron mobilitesinin değiştiği herhangi bir fizikokimyasal sürecin izlenebilmesinde kullanılabileceği görülmüştür. Tez çalışmasının sonunda: 1) yüzey immobilizasyon teknikleri ile taban malzeme seçimi ve uygulamasındaki esneklik; 2) tabaka oluşumlarının kontrolü ve düzenlenmesindeki esneklik; 3) mikrodeseleme konularındaki esneklik ile 4) optik sistemlerin kombinasyonlarındaki avantajlar nedeniyle, SPR (yüzey plazmon rezonansı), LPR-

TIRE (lokalize plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri; tez kapsamında yeni yaklaşım), TIRE (içten tam yansımali elipsometri), SPRe-TIRE (yüzey plazmon rezonans ile güçlendirilmiş içten tam yansımali elipsometri; tez kapsamında nispeten yeni ve geliştirilmiş yaklaşım) esaslı optik sensörlerin uygulamada başarılı olduğu ve uygulama konularının oldukça esnek olduğu görülmüştür. Özellikle SPRe-TIRE uygulama alanlarına, yüzeyde enzim aktivitesinin eş zamanlı kontrolü, destek materyalindeki katalizörlerin etkinliğinin kontrolü ve yükseltgenme/indirgenme reaksiyonlarının eş zamanlı olarak yüzeyde incelenebilmesinin eklenebileceği öngörülmüştür.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Agbor, N.E., Cresswell, J.P., Petty, M.C. ve Monkman, A., 1997, An optical gas sensor based on polyaniline Langmuir-Blodgett films, *Sensors and Actuators B*, 41: 137-141
- Alftan, K., 1998, Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering, *Biosensors and Bioelectronics*, 13: 653-663
- Allain, LR., Stratis-Cullum, DN ve Vo-Dinh, T., 2004, *Anal Chim. Acta.*, 518: 77
- Allongue, P., Delamar, M., Desbat, B., Fagebaume, O., Hitmi, R ve Pinson, J., 1997, *J. Am. Chem. Soc.*, 119: 201
- Arwin, H., 2000, Ellipsometry on thin organic layers of biological interest: characterization and applications, *thin solid Films* 377-378: 48-56
- Arwin, H., 2001, Is ellipsometry suitable for sensor applications, *Sensors and Actuators A* 92: 43-51
- Aspness, DE., in ed. by E.D. Palik., 1985, *Handbook of Optical Constants of Solids*, Academic Press, Orlando
- Bae, YM., Oh, BK., Lee, W., Lee, WH ve Choi, JW., 2005, *Biosens Bioelectron* 21:103
- Bae, Y.M., Oh, B., Lee, W., Lee, W.H ve Choi, J., 2004, Immunosensor for detection of *Yersinia enterocolitica* based on Imaging ellipsometry, *Anal Chem.*, 76, 1799-1803
- Bain, C.D, Troughton, E.B., Tao, Y.Y., Eval, J., Whitesides, G.M. ve Nuzzo, R.G., 1989 Formation of monolayer films by spontaneous assembly of organic thiols from solution onto gold, *J.A.Chem.Soc.*, 111: 321

- Barnes, W.L. ve Sambles, J.R., 1987, Thin Langmuir-Blodgett films studied using surface plasmon polaritons, *Surface Sci.*, 183: 189-200
- Barron, JA., Young, HD., Dlott, DD., Darfler, MM., Krizman, DB ve Ringeisen BR., 2005 *Proteomics*, 5: 4138
- Bianchi N., Rutigliana, C., Tomossetti, M., Feriotto, G., Zerzato, F ve Gambari, G., 1997, Biosensor technology and surface plasmon resonance for real time detection of HIV-1 genomic sequences amplified by polymerase chain reaction, *Clin. Diag. Virol.*, 8:199-208
- Boardman, A.D. (Ed), 1982, *Electro Magnetic Surface Modes*, John Wiley and Sons
- Boozer, C., Yu, Q., Chen, S., Lee, C., Homola, J., Yee, S ve Jiang, S., 2003, Surface fictionalization for self-referencing surface plasmon resonance (SPR) biosensors by multi-step self assembly, *Sensors and Actuators B*, 90: 22-30
- Çaglayan, MO., Sayar, F., Demirel, G., Garipcan, B., Otman, B., Çelen, B., Pişkin, E., Stepwise formation approach to improve ellipsometric biosensor response, 2009, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* xx (2009) xxx–xxx (Article in press)
- Chen, WY., Taylor, A., Jiang, S ve Chang, GL., 2007, 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* 125: 607-614.
- Cheung, MKL., Trau, D., Yeung, KL., Carles, M ve Sucher, NJ., 2003, *Langmuir* 19: 5846.
- Chinowsky, TM., Quinn, JG., Barholomew, DU., Kaiser, R. ve Elkind, JL., 2003, Performance of the Spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity sensor, *Sensor and Actuators B*, 6954: 1-9
- Deisingh, A., 2003, Biosensors for microbial detection, *Microbiologist*, 6: 30- 33

- Delorme N., Bardesau, JF ve Bulou, A., 2005, Poncin-Epaillard F. Azobenzene containing monolayer with photoswitchable wettability. *Langmuir*, 21:12278-82.
- Demirel, G., 2006, Si(100) Yüzeyler Üzerinde Kendiliğinden Düzenlenen Biyolojik Aktiviteye Sahip Tabakaların Tasarımı, Doktora Tezi, Gazi Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 9-15s.
- Demirel, G., Caglayan, MO., Garipcan, B., Piskin, E., 2008, A Novel DNA biosensor based on ellipsometry, *Surface Science* 602: 952–959
- Demirel, G., Caglayan MO., Garipcan B., Duman M., Piskin E., 2007, *Mater Sci Eng C* (submitted)
- Demirel, G., Caykara, T., Akaoglu, B., Cakmak, M., 2007, *Surf Sci* (submitted)
- Demirel, G., Çakmak, M., Çaykara, T., Ellialtıoğlu, Ş., 2007, Chemisorption of 3-aminopropyltrimethoxysilane on Si(001)-(2x2). *J Phys Chem C*; 111:15020-5.
- Duman, M., 2007, PhD thesis, Design and application of SPR based DNA-chips for detection of pathogenic microorganisms, Hacettepe University, Chemical Engineering Department, Bioengineering Division,(2007)
- Duman, M., Çağlayan, MO., Demirel, G ve Pişkin, E., Detection of Mycobacterium tuberculosis Complex Using SPR Based Sensors Carrying Self-Assembled Nano-Overlayers of Probe Oligonucleotide, 2009, Yayına gönderildi
- Duschl, C., Sevi, LA ve Vogel, H., 1996, *Biophysic J.* 70:1985-1995
- Elkind, JL., Stimpson, DI., Strong, AA., Bartholomew, WD ve Melendez, JL., 1999, Integrated analytical sensors: the use of the TISPR-1 as a biosensor, *Sensors and Actuators B*, 54:182-190
- Elwing, H., 1989, *Biomaterials* 19: 397-406
- Ferral, R., 1958, Predicted radiation of plasma oscillations in metal films, *Phy. Rev.*, 11: 1214-1222

- Ferriotto, G., Bargetti, M., Mschiati, C., Bianchi, N ve Gambari, R., 2002, Biosensor technology and surface plasmon resonance for real-time detection of genetically modified roundup ready soybean gene sequences, *J. Agric. Food. Chem.*, 50: 955-962
- Geades, NJ., Martin, AS., Caruso, F., Urquhart, RS., Furlong, DN., Somoles, JR., Than, KA ve Edgar, JA., 1994, *J. Immunol. Methods*, 175: 149-160
- Georgiads, R., Peterlinz, KA., Rohn, JW., Petersen, AW ve Grassi, JH., 2000, Surface plasmon resonance spectroscopy as a probe of in-plane polymerization in monolayer organic conducting films, *Langmuir*, 17: 673-678.
- Green, RJ., Davies, J., Davies, MC., Roberts, CJ ve Tendler, SJP., 1997, *Biomaterials*, 18: 405-414
- Hebner, TR., Wu, CC., Marcy, D., Lu, MH. ve Sturm JC., 1998, *App. Phys. Let.*, 72: 519.
- Heinzl, J. ve Hertz, CH., 1985, Ink-Jet Printing, *Adv. Electron Electron Phys.*, 65: 91.
- Herne, TM ve Tarlov, MJ., 1997, Characterization of DNA Probes Immobilized on Gold Surfaces, *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8916-8920.
- Ho, CM ve Tai, YC., 1998, *Annual Review of Fluid Mechanics*, 30: 579-612.
- Homola, J., Ctyroky, J., Skalsky, M., Hardilova, J. ve Kolarova. P., 1997, A surface plasmon resonance based integrated optical sensor, *Sens. & Actu. B.*, 38-39: 260-290.
- Hozumi, A., Yokogawa, Y., Kameyama, T., Sugimura, K., Hayashi, K., Shirayama,, H., Takai, O., 2001, *J. Vac. Sci. Technol. A* 19, 1812
- Ito, M., Nakamura, F., Tamada, K., Ushijima, KHA., Lau, A ve Knoll, W., 2007, Enhancement of Surface Plasmon Resonance Signals by Gold Nanoparticles on High-Density DNA Microarrays, *J. Phys. Chem. C*, 111: 11653-11662.

- Jackson, J.D., 1962, Classical Electrodynamics, Wiley, NewYork
- Jenkins, ATA., Richard, F., Buckling, A., Clarke DJ ve Jauris, K., 2004, Study of the attachment of *Pseudomonas aeruginosa* on gold and modified gold surfaces using surface plasmon resonance, *Biotechnology Progress*, 20: 1233-1236
- Jiang, T., Minunni, M., Wilson, P., Zhang, J., Turner, APF ve Mascini, M., 2005 DetectionTP53 mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 20: 1939-1945
- Jorry, M.J., Bradberry, G.W., Cann, P.S. ve Sambles, J.R., 1995, A surface plasmon based optical sensor using acousto-optics, *Meas. Sci. Technol.*, 6: 1193-1200
- Jung, C., Yee, S ve Kuhn, K., 1993, 'Integrated optics wave-guide modulator based on surface plasmon resonance, *J. Light Wave Technology*, 12: 1801- 1806.
- Kajenski, P.J., 1997, Tunable optical filter using long-range surface plasmons.. *Opt Eng* . Vol 36, NO. 5, 1537-1541.
- Kanno, S., Yanagida, Y., Haruyama, T., Kobatake, E ve Aizawa, M., 2000, *J Biotechnol* 76:207
- Kano, H ve Kawata, S., 1994, Surface-plasmon sensor for absorption-sensitivity enhancement, *Appl. Opt.*, 33: 5166-5170.
- Karlsson, R., 2004, SPR for molecular interaction analysis: a review of emerging application areas, *J. Of Molecular Recognition*, 17: 151-161
- Klaus, JW., Sneh, O., George, SM., 1997, *Science*, 278: 1934-1936.
- Kolomenski, A.A., Gersshon, P ve Schuessler, H.A., 1997, Sensitivity and detection limit of concentration and adsorption measurements by laser-induced surface-plasmon resonance, *Appl. Opt.*, 36: 6539-6547.
- Komeda, T. ve Nishioka, Y., 1997, *Appl. Phys. Lett.* 70, 3398.

- Kowazumi, H., Gobi, KV, Ogina, K., Meeda, H ve Miura, N., 2005, Compact surface plasmon resonance (SPR) immunosensor using multichannel for simultaneous detection of small molecule compounds, *Sensors and Actuators B*, 1932- 1938
- Kretschmann, E. ve Raether, H., 1968, Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light, *Z. Naturforsch*, 23a, 2135-2136
- Kulkarni, SA., Mirji, AB., Mandale, RP. ve Vijayamohanan, KP, 2005, *Mater. Lett.* 59, 3890
- Lafas, S ve Johnsson, B., 1990, *J. Chem. Soc. Chem. Com.* 116: 1526-1528
- Lavers, C.R. ve Wilkinson, J.S., 1984, A waveguide-coupled surface-plasmon sensor for an aqueous environment, *Sensors and Actuators B*, Vol. 22: 75-81.
- Lee W., Oh, BK., Bae, YM., Paek, SH., Lee, WH ve Choi, JW., 2003, *Biosens Bioelectron* 19:185
- Lenigk, R., Carles, M., Ip, NY ve Sucher, NJ., 2001, *Langmuir* 17: 2497.
- Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dune, L., Quinn, J., Chakraborty, T ve O'Kennedy, R., 2003, *Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water, Enzyme and Microbiol. Technology*, 32: 3-13
- Leonard, P., Hearty, S., Quinn, J. ve O'Kennedy, R., 2004, A generic approach for the detection of whole *Listeria monocytogenes* cells in contaminated samples using surface plasmon resonance, *Biosensors and Bioelectronics* 19: 1331-1335
- Li, A., Yang, F., Ma, Y ve Yang, X., 2007, *Biosens Bioelectron* 22:1716 16.
- Liedberg, B., Nylander, C ve Lundstrom, I., 1983, *Sensors & Actuators*, 4: 229-304
- Liedberg, B., Nylander, I ve Lundström, I., 1995, *Biosensing with surface plasmon resonance- how it all started, Biosensors and Bioelectronics*, 10: 1-9.
- Linda, S., Jung, K.E., Charles, T.C., Patrick, S.S., Sinclair, S.Y., Victor, P. ve Gabriel, P.L., 1999, Surface plasmon resonance measurement of binding and

- dissociation of wild-type and mutant streptavidin on mixed biotin-containing alkylthiolate monolayers, *Sensors and Actuators B*, 54: 137-144
- Linford, MR., Fenter, P., Eisenberger, MP., Chidsey, CED., 1995, Alkyl monolayers on silicon prepared from 1-alkenes and hydrogenterminated silicon. *J Am Chem Soc*;117:3145-55
- Love, CJ., Estroff, AL., Kribel, KJ., Nuzzo, GR ve Whitesides, MG., 2005, *Chemical Review*, 105: 1103-1169.
- Lu, B., Smyth, MR ve O’Kennedy, R., 1996, *Anal. Chem.*, 121: R29-R32
- Hu, M., Noda, S., Okuba, T., Yamaguchi, Y ve Komiyama, H., 2001, *Appl. Surf. Sci.* 181: 307.
- Maboudian, R., 1998, *Surface Science Reports*, 30: 207-270.
- Major, RC. ve Zhu, XY., 2001, *Langmuir*, 17: 5576-80.
- Malicka, J., Gryczynski, I., Gryczynski, Z. ve Lakvich, JRç, DNA hybridization using surface plasmon coupled emission, *Anal Chem*, 2003, 75: 6629-6633
- Margheri, G., Mannoni, A. ve Quercioli, F., 1997, High-resolution angular and displacement sensing based on the excitation of surface plasma waves, *Appl. Optics*, 36: 4521-4525
- Marinakos, SM., Chen, S ve Chilkoti, A., 2007, Plasmonic detection of a model analyte in serum by a gold nanorod sensor. *Anal Chem* 79: 5278-83.
- Mariotti, E., Minunni, M. ve Mascini, M., 2002, Surface plasmon resonance biosensor for genetically modified organisms detection, *Analytica Chimica Acta*, 453:165-172
- Martin, OM., Yu, L ve Mecozzi, S., 2005, *Chem. Commun.* 39, 4964
- Matsubara, K., Kawata, S. ve Minami, S., 1988, Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement, *Appl. Opt.*, 27(6) 1160- 1163

- Millat, MC., Martin F., Bousquet, D., Sabillei, B ve Levy, Y., 1995, Sens. Actuators, 29: 268-276
- Myachi, H., Yano, K., Ikebukuro, K., Kono, M., Haoshina, S ve Arube, I., 2000, Application of chimeric RNA-DNA oligonucleotides to the detection of pathogenic microorganisms using surface plasmon resonance, Analaytica Chemica Acta, 407: 1-10
- Nakagawa, H., Saito, I., Chinzci, T., Nakeoki, Y ve Iwata, Y., 2005, The merits/demerits of biochemical reaction measurements by SPR reflectance signal at a fixed angle, Sensors&Actuators B, 108: 722-777
- Nakamura, R., Myourama, H., Ikobuhero, K., Sasaki, S., Nagato, R., Korube, I ve Pedersen, H., 1997, Anal.Chem 69:4649-4653
- Nelson, BP., Grimsurd, TE., Liles, MR., Goodman, RM ve Corn, RM., 2001, Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA hybridization adsorption onto DNA microarrays, Analytical Chemistry, 73: 1-7
- Nenninger, GG, Tobiska, P, Homola J, Yee, J, Long-range surface plasmons for high-resolution surface plasmon resonance sensors, Sensors and Actuators B, (2001), 74: 145-151
- Nylander, C., Liedberg, B. ve Lind, T., 1982, Gas detection my means of surface plasmon resonance, Sensors and Actuators, 3: 79-88.
- Nie, HY., Walzak, MJ., McIntyre, NS., 2006, J. Phys. Chem.B 110, 21101
- Obando, LA., Gentlemen, DJ., Halloway, JR ve Booksh, KS., 2004, Manufacture of robust surface plasmon resonance fiber optic based dip-probes, Sensors and Actuators B, 100: 439-449
- Oh, B., Kim, Y., Lee, W., Bao, YM., Lee, WH ve Chai, J., 2003, Immunosensor for detection of Lagianella pneumophila using surface plasmon resonance, Biosensors and Bioelectronics, 18: 605-611

- Oh, K., Kim, YK., Park, KW., Lee, WH ve Choi, J., 2004, Surface plasmon resonance immunosensor for the detection of Salmonella Typhimurium, Biosensors and Bioelectronics, 19: 1497-1504
- Otto, A., 1968, Excitation of non-radiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection, Z. Phys. 216: 398-410
- Parikh, AN., Schivley, MA., Koo, E., Seshadri, K., Aurentz, D., Mueller, K., 1997, n-Alkylsiloxanes: from single monolayers to layered crystals. The formation of crystalline polymers from the hydrolysis of n-octadecyltrichlorosilane. J Am Chem Soc;119:3135-43.
- Peterlinkz, KA ve Georgiadis, R., 1996, Langmuir, 12. 4731-4740
- Phelps, J.M. ve Taylor, D.M., 1996, Determining the relative permittivity and thickness of a lossless dielectric overlayer on a metal film using optically excited surface plasmon polaritons, J. Phys. D: Appl. Phys. 29: 1080-1087
- Piwonski, I., Grobelny, J., Cichomski, M., Celichowski, G. ve Rogowski, J., 2005, Appl. Surf. Sci. 242: 147.
- Poksinski, M ve Arwin, H., 2003, In situ monitoring of metal surfaces exposed to milk using total internal reflection ellipsometry, Sensors and Actuators B, 94: 247-252
- Poksinski, M ve Arwin, H., 2004, Protein monolayers monitored by internal reflection ellipsometry, Thin Solid Films, 455-456: 761-721
- Poole, CP ve Owens, FJ., 2003, Introduction to Nanotechnology, John Wiley & Sons, Inc., United State, 1-8.
- Pothak, SS ve Savelkoul, HFJ., 1997, Immunol. Today, 18:464-467
- Press, WH., Flannery, BP., Teukolsky, S.A ve Vetterling, W.T., 1988, Numerical Recipes, Cambridge University Press, Cambridge

- Raether, H., Surface plasma oscillations and their applications, 1977, (Francombe ve Hoffmann Ed.), Physics of Thin Films, Vol 9, Academic Press, New York, 145-261
- Raviglione, MC. ve O'Brien, R.J., in: D.L. Kasper, E. Braunwald, A.S. Fauci, S.L. Hauser, D.L. Longo, J.L. Jameson, K.J. Isselbacher (Ed.), 2004, Tuberculosis, Harrison's Principles of Internal Medicine, 16th ed., McGraw-Hill Professional, 953–966.
- Rich, R.L. ve Myszka, D.G., 2000, Advances in surface plasmon resonance biosensor analysis. Curr. Opin. Biotechnol. 11, 54-61
- Ritchie, R.H., 1957, Plasma losses by fast electrons in thin films, Phys. Rev., 106: 874-881
- Ritchie, R.H., 1973, Surface plasma oscillations of a degenerate electron gas, 34, 1-19.
- Robertson, W.M. ve Fullerton, E., 1989, Reexamination of the surface-plasma-wave technique for determining the dielectric constant and thickness of metal films, JOSA B, Vol. 6. No.8, 1584-1589.
- Rothenhausler, B., Duschil, C. ve Knoll, W., 1988, Plasmon surface polariton fields for the characterization of thin films, Vol. 159, 323-330.
- Sambles, J.R., Bradbery, G.W. ve Fuzi, Y., 1991, Optical excitation of surface plasmons: an introduction, Contem. Phys., 32: 173-183
- Sasaki, S., Nagata, R., Hack, B. ve Kurube, I., 1998, Anal. Chim. Acta., 368: 71-76
- Sigal, G.B., Bamdad, C., Barberis, A., Strominger, J., Whitesides, G.M., 1996, Anal Chem 68:490
- Silin, V., Plant, A., 1997, Biotechnological applications of surface plasmon resonance, Tibtech, 15:353-359
- Smith, K.R., Lewis, A.P. ve Weiss, S.P., 2004, Progress in Surface Science, 75: 1-68.

- Southern, EM., Case-Green, SC., Elder, JK., Johnson, M., Mir, KU., Wang, L., ve Williams, JC., 1994, *Nucleic Acids Res.*, 22, 1368-1373.
- Spangler, BD., Wilkinson, EA., Murphy, JT ve Tyler, BJ., 2001, Comparison of Spreeta (R) surface plasmon resonance sensor and a quartz crystal microbalance for detection of E.coli heat-labile enterotoxin, *Analytica Chimica Acta*, 444: 149-161
- Sugimura, H., Hozumi, A., Kameyama, T ve Takai, O., 2002, *Surf. Interface. Anal.* 34, 550
- Steel, RL., Levicky, TM., Herne ve Tarlov, MJ., 2000, Immobilization of Nucleic Acids at Solid Surfaces: Effect of Oligonucleotide Length on Layer Assembly, *Biophys. J.* 79: 975-981.
- Thiel, JA., Foulos, GA., Jordan, CE., Corn, RM ve Smith, L., 1997, In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surface, *Analytical Chemistry*, 69: 4948-4956
- Tompkins HG, A user guide to ellipsometry, Academic Press, NewYork, 1993
- Tortech, L., Mekhalif, Z., Delhalle, J., Guittard, F ve Geribaldi, S., 2005, *Thin Solid Films* 491, 253
- Tsai, P.Y ve Mengsu, Y., 2004, Surface plasmon resonance study of molecular recognition between polymerase and DNA containing various mismatches and conformational changes of DNA-protein complexes, *Biosensors and Bioelectronics*, 19: 1209-1218
- Turner, A.P.F., Karube, I. ve Wilson, G.S., 1987, *Biosensors: Fundamentals and applications*, Oxford, Oxford University Press
- Ulrich, K., Katerkamp, A., Renneberg, R., Spener, F. ve Camman, K., 1996, Sensing fatty acid binding protein with planar and fiber optical surface plasmon resonance spectroscopy devices, *Sensors & Actuators B*, 32: 149-155

- Wang, A., Tang, H., Cao, T., Salley, SO ve Simon, KY., 2005, J Colloid Interf Sci 291:438
- Wang, R., Tombelli, S., Minnuni, M., Sipiriti, MM ve Mascini, M., 2004, Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing, Biosensors and Bioelectronics, 20: 967-974.
- Wang, J ve Bard, AJ., 2001, Monitoring DNA immobilization and hybridization on surfaces by Atomic Force Microscopy force measurements, Anal. Chem. 73:2207.
- Weadburry, RG., Wendin, C., Clendenning, J., Furlong, CF., Melendez, J., Elkind, J., Bartholomew, D ve Brown, S., 1998, Biosensors and Bioelectronics, 13: 1117-1126
- Westphal, P ve Bornmann, A., 2002, Biomolecular detection by surface Plasmon enhanced ellipsometry, Sensors and Actuators B, 84: 278-282
- Wheelan, RJ., Wohland, T., Neumann, L., Huang, B., Kabilha, B ve Zare, RN., 2002, Analysis of biomolecular interactions using a miniaturized surface plasmon resonance sensor, Analytical Chemistry, 74: 4570-4576.
- Wilber, JL. ve Whitesides, GM., 1999, Nanotechnology, G. Timp, ed., Springer-Verlag, Germany.
- Wink, T., Vanzuilen, SJ. ve Vanbennelam, WP., 1997, Analyst 122: R43-R50
- Woodburry, RG., Wendin, C., Clendenning, J., Melendez, J., Elkind, J., Bartholomew, D., Brown, S ve Turlong, CE., 1998, Construction of biosensors using a gold-binding polypeptide and a miniature integrated surface plasmon resonance sensor, Biosensors and Bioelectronics, 13: 1117-1126
- World Health Organization (WHO), Research for action-understanding and controlling tuberculosis in India, (2000) p.33.

- Yang, JH., Song, KS., Zhang, GJ., Degawa, M., Sasaki, Y., Ohdomari, I., Kawarada, H., 2006, Langmuir 22:11245
- Ying, P., Yong, Y., Gang, J ve Zulai, T., 2003, Competitive protein adsorption studied with atomic force microscopy and imaging ellipsometry. Colloid Surf B; 32:1-10.
- Zhang, Z., Wang, H., Ye, P., Shen, Y ve Fu, X., 1993, Low-power and broadband optical bistability by excitation of surface plasmons in doped polymer film, Appl. Opt.. Vol. 32. No. 24
- Zhang, F ve Srinivasan, MP.,2004, Langmuir 20, 2309
- Zhu, XY., Mulder, JA ve Bergerson, WF, 1999, Langmuir, 15: 8147-8154.

EK

SPR EĞRİLERİNİN ELDE EDİLMESİ İÇİN KULLANILAN MATLAB RUTİNİ

```
clc;
```

```
% Fresnel yansıma eşitlikleri kullanılarak SPR spektrumu modeli
```

```
%=====
```

```
fprintf ('3 Tabakalı Kompleks Fresnel SPR Benzestirme Programı / 290606/ Rev  
1');
```

```
% Bu örnekte yalnızca altın tabakası için pol-fit yapılmaktadır.
```

```
%=Au kırılma indisi verileri
```

```
%nfitau=[1.034280083650685e-018 -9.393384648062710e-015  
3.559912034480375e-011 -7.095378439199873e-008 7.771566674031558e-005  
-4.360627933364691e-002 9.833351788000456e+000];%Complied from Corn  
%% alternatif
```

```
%kfitau=[1.501913326761430e-022 3.513179495316330e-015 -  
2.342334887005757e-011 6.113864494137533e-008 -7.800397144125699e-005  
5.634910683265963e-002 -1.309525881886629e+001]; %Complied from Corn  
%%alternatif
```

```
%%
```

```
%lambda1=[100 103 105 107 109 111 113 115 117 119  
122 124... 1640 1645 1650];%verilerin tamamı verilmemiştir
```

```
%nau=[1.4400e+000 1.3900e+000 1.3800e+000 1.3600e+000 1.3500e+000  
1.3400e+000 .....5.4530e-001 5.4850e-001 5.5180e-001 5.5510e-001  
5.5850e-001 5.6180e-001 5.6520e-001 5.6870e-001 5.7220e-001 5.7570e-001  
5.7930e-001 5.8290e-001 5.8660e-001]; %verilerin tamamı verilmemiştir
```

```
%kau=[7.3000e-001 7.1000e-001 7.1000e-001 7.2000e-001 7.3000e-001  
7.4000e-001 7.6000e-001.....1.1245e+001 1.1283e+001 1.1322e+001
```

```

1.1360e+001    1.1398e+001    1.1436e+001    1.1474e+001    1.1512e+001];
%verilerin tamamı verilmemiştir

%=====

%Fiziksel sabitler ve değişkenler
array_index = 0;
c = 3e08;
wavelength =6.32e-07;% Kullanılan lazerin dalga boyu, m olarak
%=====

%Başlangıç açıları ve adım
start_angledeg = 30.00; %Girdi derece cinsinden, hesaplamalarda rad
end_angledeg = 85.00;
anglestepdeg = .01;
%=====
thickness2 = 50e-09; %metal tabakası

%=====

nof1=1.58; %(dış ortam veya SPR durumunda Kretschmann prizma)

kof1=0;

index1=nof1 - (kof1) * i;%SF10 @ 25 degree C

%=====
=====

% açılar ve açısal frekans hesaplanması

start_angle = start_angledeg *(pi / 180);

anglestep = anglestepdeg *(pi / 180);

end_angle = end_angledeg *(pi / 180);

w=2*pi*c/wavelength;

%=====

%%interpolasyonla kırılma indisi - gold layer

```

```

%%wavenm= wavelength *(1e9);

%%n2=interp1(lambda1,nau,wavenm,'spline');%istenildiğinde devreye sokulabilir

%%k2=interp1(lambda1,kau,wavenm,'spline');

%%index2 = n2 - i*(k2);%defines refractive index of the layer

nof2=0.4578;

kof2=2.2535;

index2 = nof2 - (i*(kof2));%metal tabakanın kırılma indisi değerleri


nof3=1.33;

kof3=0;

index3 = nof3 - (i*(kof3));% analizi yapılan tabakanın kırılma indisi, kinetik
çalışmada zamanın fonksiyonu olarak girilebilmektedir.

%=====

% Her bir tabakadaki geliş açısının hesaplanması

for theta = start_angle:anglestep:end_angle;

array_index = array_index + 1;

theta1 = theta;

theta2=asin((index1*sin(theta1))/(index2));

theta3=asin((index2*sin(theta2))/(index3));

costheta2=cos(theta2);

costheta3=cos(theta3);


betus=2*pi*(thickness2/wavelength)*index2*cos(theta2);

```

```

%=====

% Fresnel eşitliği q teriminin hesaplanması

subp1=(index2*cos(theta1))-(index1*cos(theta2));
subp2=(index2*cos(theta1))+(index1*cos(theta2));
subp3=(index3*cos(theta2))-(index2*cos(theta3));
subp4=(index3*cos(theta2))+(index2*cos(theta3));

react1=(subp1)/(subp2);
react2=(subp3)/(subp4);

%%if (imag(react1) > 0)
%%react1 = react1 * neg;
%%end

%%if (imag(react2) > 0)
%%react2 = react2 * neg;
%%end%kontrol amaçlı kullanılabilir

%=====

% Fresnel katsayılarının hesaplanması

Renum=react1+(react2*exp(-2*i*betus));
Redenum=1+(react1*react2*exp(-2*i*betus));
Rprod=abs(Renum/Redenum);

% Refraktivitenin hesaplanması

R=Rprod^2;

```

```

%R=Renum/Redenum;

xaxis(array_index) = theta1;

reflection(array_index) = R;

end

%=====

[rmin,xmin] = min(reflection);%SPR Minimumunun bulunması

xmin = (start_angle + (xmin * anglestep)) * (180/pi);


[rmax,xmax] = max(reflection);%kritik açının "shark fin" bulunması

xmax = (start_angle + (xmax * anglestep)) * (180/pi);


thetadiff = xmax-xmin;

refdiff = rmax-rmin;


xaxis = xaxis * (180/pi);

plot(xaxis,reflection);

title('Geliş açısının fonksiyonu olarak Işık şiddeti');

xlabel('Geliş açısı (derece)');

ylabel('Işık şiddeti');

axis([30 85 0 1]);

%%Parametrelerin yazdırılması

%%ptext1 = sprintf('T1:%2.2em R1:%2.2e',thickness1,index1);

%%ptext2 = sprintf('T2:%2.2em R2:%2.2e',thickness2,index2);

```

```
%%ptext3 = sprintf('T3:%2.2em R3:%2.2e',thickness3,index3);
```

```
wavelengthu= sprintf('=%2.2em',wavelength);
```

```
mindat = sprintf('xmin:%2.5f Rmin:%2.5f',xmin,rmin);
```

```
maxdat = sprintf('xmax:%2.5f Rmax:%2.5f',xmax,rmax);
```

```
%R min'ince öğütülmüş katı verilmesi
```

```
mindat
```

```
%%text(5, .85, ptext1);
```

```
%%text(5, .80, ptext2);
```

```
%%text(5, .75, ptext3);
```

```
text(5, .50, '\rm \lambda_i');
```

```
text(8,.50,wavelengthu);
```

```
text(5,.45,mindat);
```

```
text(5,.325,maxdat);
```

```
CC=[rmin,array_index];
```

```
%Matris olarak sonuçların kaydedilmesi
```

```
A=[xaxis;reflection]';
```

```
csvwrite ('sprdata.csv',A);
```

```
csvwrite ('sprdata3.csv',CC);
```

```
%=====
```

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mustafa Oğuzhan ÇAĞLAYAN

Doğum Yeri/ Yılı: ANKARA/ 25.04.1975

Eğitim ve Akademik Durumu:

Ph.D. 2003-2009 Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD.

Ph.D. 2002-2003 Ankara Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD. (Tamamlanmadı)

M.Sc. 1999-2002 Cumhuriyet Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD.

M.Sc. 1997-1999 Gazi Üniversitesi Kimya Mühendisliği ABD. (Tamamlanmadı)

B.Sc. 1991-1997 Hacettepe Üniversitesi Kimya Mühendisliği Bölümü

1989-1991 Ankara Atatürk Lisesi

Yabancı Dili: İngilizce

İş Tecrübesi:

2003-2009 Hacettepe Üniversitesi (35. Madde Araştırma Görevlisi)

2005-2008 Türk Standartları Enstitüsü, Petrol İhtisas Grubu (Grup Üyesi)

1999-2003 Cumhuriyet Üniversitesi (Araştırma Görevlisi)

1997-1999 TARMAY Ltd. Şti. (Yönetici Asistanı)

1996-1997 FETA Eğitim Araçları ve Dış Ticaret Ltd. Şti. (İthalat Sorumlusu)

SCI Kapsamındaki dergilerde yayımlanmış makaleler:

Caglayan MO., Sayar F, Demirel G, Garipcan B, Otman B, Çelen B, Pişkin E, Stepwise formation approach to improve ellipsometric biosensor response, **Nanomedicine**, 5: (2009) 152–161

Caglayan MO, Optimization of activation conditions of locally available clays for cottonseed oil bleaching: characterization and performance evaluation, **J. Food Process Engineering**, (2009), Basımda

Demirel G, Caglayan MO., Garipcan B, Pişkin E, A novel DNA biosensor based on ellipsometry, **Surface Science** 602 (2008) 952–959

Demirel G, Caglayan MO., Garipcan B, Duman M, Pişkin E, Formation and Organization of Amino Terminated Self-assembled Layers on Si(001) Surface, **Nanoscale Res Lett** (2007) 2:350–354

Demirel G, Caglayan MO., Garipcan B, Duman M, Pişkin E, Oriented immobilization of IgG on hydroxylated Si(001) surfaces via protein-A by a multiple-step process based on a self-assembly approach, **Journal of Materials Science** (2007), Volume 42, Number 22

Caglayan MO, Determination of Al(III) activation conditions for white bentonite used for cottonseed oil bleaching by robust design, (2006), **J Sci Food Agric** 86:453–458

Caglayan MO, Kafa S, Yigit N, Al-Pillared Clay for Cottonseed Oil Bleaching: An Optimization Study, (2005), **JAOCs** 82, 599–602