

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**İNSAN PAPİLLOMA VİRÜS TEŞHİSİ İÇİN NANOTEL-POLİMER FIRÇA
HİBRİT SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Mehmet Utku BADAK
DANIŞMAN: Doç. Dr. Adem ZENGİN
II. DANIŞMAN: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ

VAN-2021

T.C.
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

**İNSAN PAPİLLOMA VİRÜS TEŞHİSİ İÇİN NANOTEL-POLİMER FIRÇA
HİBRİT SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN: Mehmet Utku BADAĞ

Bu çalışma 117M058 No'lu proje olarak TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

VAN-2021

KABUL VE ONAY SAYFASI

Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda Doç. Dr. Adem ZENGİN danışmanlığında, Mehmet Utku BADAK tarafından sunulan “İnsan Papilloma Virüs Teşhisi için Nanotel-Polimer Fırça Hibrit Sistemlerin Hazırlanması” isimli bu çalışma Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği'nin ilgili hükümleri gereğince 05/01/2021 Tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği ile başarılı bulunmuş ve Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK

İmza:

Üye: Prof. Dr. Tekin ŞAHAN.

İmza:

Üye: Prof. Dr. Selçuk GÜMÜŞ

İmza:

Üye: Doç. Dr. Eylem TURAN

İmza:

Üye: Doç. Dr. Adem ZENGİN

İmza:

Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/....../..... tarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır

İmza

Enstitü Müdürü

TEZ BİLDİRİMİ

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

Mehmet Utku BADAK



ÖZET

İNSAN PAPİLLOMA VİRÜS TEŞHİSİ İÇİN NANOTEL-POLİMER FIRÇA HİBRİT SİSTEMLERİN HAZIRLANMASI

Mehmet Utku BADAĞ

Doktora Tezi, Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Adem ZENGİN

II. Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nahit Aktaş

Ocak 2021, 99 sayfa

Bu çalışmada, ilk olarak farklı boylarda metal vasıtalı kimyasal aşındırma yöntemi ile silisyum nanoteller hazırlanmıştır. Daha sonra yüzeylere iyodosilan bağlandıktan sonra yüzeyde başlatılan tersinir katalizlenmiş zincir transfer polimerizasyonu ile poli(N-akriloil-L-valine) sentezlenmiştir. Hazırlanan polimer kaplı yüzeyler toplam yansıtımlı FT-IR spektroskopisi, XPS, elipsometre ve TEM gibi çeşitli yüzey analiz yöntemleri ile karakterize edilmiştir. Yüzeylere daha sonra ilk prob ss-DNA bağlanmış ve yüksek yoğunlukta DNA bağlanması için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Hazırlanan sensörün hem yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) hem de yüzeyde güçlendirilmiş floresans (SEF) temelli olması için hem boyar madde hem de Raman etiketi ihtiva eden çekirdek kabuk yapısında altın-silika nanopartikülleri hazırlanmıştır. Prob ss-DNA bağlı yüzeylere, insan papilloma virüs DNA iplikçığı ile ilk hibridizasyon gerçekleştirilmiş ve ardından etiket DNA bağlı altın-silika nanopartikülleri ile sandviç hibridizasyon protokolü uygulanmıştır. Hazırlanan sensörün insan papilloma virüs (İPV) teşhisinde 1.4 fM gibi düşük tespit değerine, en az bir ay kararlılık ve en az 4 sefer tekrar kullanım özelliğine sahip olduğu belirlenmiştir. Bununla birlikte belirli bir derişim aralığında (0.1 nM-0.1 µM) hibridizasyonun floresans mikroskobu ile hem kalitatif hem de kantitatif olarak takip edilebileceği belirlenmiştir. Dizayn edilen sensör ile ticari olarak satın alınan kan eş değer madde içerisinde yüksek geri kazanım oranları (%98-%101) ile İPV teşhis edilebileceği gösterilmiştir. Sonuç olarak hazırlanan sensörün İPV teşhisi için klinik uygulamalarda kullanım alanı bulacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: DNA hibridizasyonu, Polimer fırça, Tersinir zincir transfer katalizlenmiş polimerizasyon, Yüzeyde güçlendirilmiş floresans, Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi,

ABSTRACT

PREPARATION OF NANOWIRE-POLYMER BRUSH HYBRID SYSTEMS FOR DIAGNOSIS OF HUMAN PAPILLOMA VIRUS

Mehmet Utku BADAK

Ph. D. Thesis, Chemistry Engineering Science

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Adem ZENGİN

II. Supervisor: Prof. Dr. Nahit AKTAŞ

January 2021, 99 pages

In this study, firstly silicon nanowires of different sizes were prepared via metal-assisted chemical etching method. After iodosilane was attachment on the surfaces, poly(N-acryloyl-L-valine) was synthesized by surface-initiated reversible catalyzed chain transfer polymerization. The prepared polymer grafted surfaces were characterized by various surface analysis methods such as total reflection FT-IR spectroscopy, XPS, ellipsometer and TEM. Then, probe ss-DNA was attached on the surfaces and optimization studies were performed for high density of DNA binding. Gold-silica nanoparticles in the core-shell structure containing both dye and Raman label were prepared in order to be based on both surface-enhanced Raman spectroscopy, (SERS) and surface-enhanced fluorescence (SEF). First hybridization was carried out between human papilloma virus (HPV) DNA strand and probe ss-DNA and the sandwich hybridization protocol was then applied with gold-silica nanoparticles containing label ss-DNA. It was determined that the prepared sensor had a low detection value of 1.4 fM, stability of at least one month and reuse of at least 4 times for human papilloma virus diagnosis. Moreover, it has been determined that the hybridization can be qualitatively monitored by fluorescence microscopy at a certain concentration range (0.1 nM-0.1 μ M). It has been shown that HPV can be diagnosed with high recovery rates (98%-101%) in commercially available blood equivalent substance with the designed sensor. As a result, it is thought that the prepared sensor will find use in clinical applications for the diagnosis of HPV.

Keywords: DNA hybridization, Polymer brush, Reversible chain transfer catalyzed polymerization, Surface enhanced fluorescence, Surface enhanced Raman spectroscopy



ÖN SÖZ

TÜBİTAK tarafından desteklenen bu tez kapsamında elde edilen sonuçlar ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır. Tez kapsamında silisyum nanotel sentezlendikten sonra yüzeyde başlatılan tersinir zincir katalizlenmiş polimerizasyon yöntemi ile silisyum polimer fırça/nanotel hibrit sistemi hazırlanmıştır. Bu hibrit sistem üzerinde “sandviç hibridizasyon” protokolü uygulanarak insan papilloma virüs teşhisi için yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi ve yüzeyde güçlendirilmiş floresans temelli biyosensör tasarımı gerçekleştirilmiştir. Doktora tez çalışmam ve yüksek öğrenimim boyunca bilgisini, tecrübesini ve değerli zamanını esirgemeyerek; her fırsatta yardımcı olan değerli hocalarım Doç. Dr. Adem ZENGİN’e ve Prof. Dr. Nahit AKTAŞ’a en içten dileklerimle teşekkür ederim. TEM ve SEM analizleri konusunda Prof. Dr. Zekiye SULUDERE’ye, el tipi SERS analizleri konusunda Prof. Dr. Uğur TAMER’e, spektrofotometre konusunda Doç. Dr. Eylem TURAN’a katkı ve emekleri için teşekkürü borç bilirim. Bu çalışmayı 117M058 No’lu proje olarak destekleyen TÜBİTAK’a teşekkür ederiz.

2021

Mehmet Utku BADAĞ



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ÖN SÖZ.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ	3
2.1. Polimer Fırçalar	3
2.2. Kontrollü/Yaşayan Polimerizasyon.....	6
2.2.1. RCTP polimerizasyonu.....	9
2.3. İnsan Papilloma Virüsü	10
2.4. İPV Sensörleri	11
2.4.1. Elektrokimyasal İPV sensörleri	11
2.4.2. Optik İPV sensörleri	16
2.4.3. Piezoelektrik İPV sensörleri	18
2.5. Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri	19
2.5.1. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)	19
2.5.2. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi.....	20
2.5.3. Elipsometri.....	22
2.5.4. Su değme açısı ölçümleri.....	23
2.5.5. Floresans mikroskobu	23
2.5.6. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS)	24
2.5.7. Yüzeyde güçlendirilmiş floresans (SEF)	25
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	27
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	27
3.2. N-Akriolil-L-Valin (AVAL) Sentezi.....	27
3.3. Silisyum Nanotel Sentezi.....	28
3.4. Silisyum Nanoteller Üzerine İyodosilan (IPTS) Tek Tabakaların Hazırlanması	29

	Sayfa
3.5. Silisyum Nanotel Yüzeyler Üzerinde Polimer Fırça Hazırlanması.....	29
3.6. PAVAL Bağlı Yüzeylere Prob ss-DNA Bağlanması	30
3.7. Prob ss-DNA Bağlı Yüzeyler Üzerinde İPV DNA Bağlanması.....	30
3.8. SERS/SEF Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Eşlenik ss-DNA Bağlanması	31
3.9. Sandviç Hibridizasyon Protokolü.....	32
3.10. Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri	33
3.10.1. X-Işınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)	33
3.10.2. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi	34
3.10.3. Elipsometre	34
3.10.4. Su değme açısı ölçümleri	34
3.10.5. Floresans mikroskobu	34
3.10.6. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS)	34
3.10.7. Polimerlerin mol kütlesi tayini	35
3.10.8. Taramalı elektron mikroskobu (SEM).....	35
3.10.9. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM).....	35
4. BULGULAR VE TARTIŞMA.....	37
4.1. N-Akriolil-L-Valin (AVAL) Sentezi.....	37
4.2. Monomerin Karakterizasyonu	37
4.2.1. FTIR analizi	37
4.2.2. ¹ H-NMR (DMSO, 300 MHz) analizi.....	38
4.3. Silisyum Nanotel Sentezi.....	39
4.3.1. Silisyum nanoteller üzerine iyodosilan tek tabakaların hazırlanması.....	45
4.3.2. Si-NT yüzeyler üzerinde polimer fırça hazırlanması.....	50
4.4. PAVAL@Si NT Üzerine prob ss-DNA'nın Kovalent Bağlanması	62
4.4.1. Prob ss-DNA derişiminin etkisi	63
4.4.2. Prob ss-DNA adsorpsiyon süresinin etkisi	65
4.5. SERS/SEF Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	71
5. SONUÇ.....	89
KAYNAKLAR.....	91
ÖZ GEÇMİŞ.....	99

ÇİZELGE LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Aşılama parametrelerinin polimerleşme süresi ile değişimi	59
Çizelge 4.2. Literatürdeki İPV teşhisi tasarlanan analiz sistemlerin karşılaştırılması....	79
Çizelge 4.3. Kan eşdeğer maddeden İPV DNA örneklerinin hazırlanan sensör ile geri kazanımı	86



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Artan aşılama yoğunluklarına göre üç tipik polimer fırça konfigürasyonunun şematik gösterimi.....	3
Şekil 2.2. Polimer fırça hazırlama teknikleri a) yüzeye aşılama yöntemi b) yüzeyden aşılama yöntemi.....	5
Şekil 2.3. Tersinir aktivasyonun şematik gösterimi (b, c, d) ve RCTP yöntemindeki tersinir aktivasyonun gösterimi.....	8
Şekil 2.4. DNA algılama sensörünün şematik gösterimi.....	12
Şekil 2.5. Gerçek örneklerde İPV tespiti için DNA biyosensörünün hazırlanma adımları	13
Şekil 2.6. İlk olarak 5'-ucu tiyollenmiş İPV özgü prob-tek sarmal DNA immobilizasyonu.....	14
Şekil 2.7. Ss-DNA / AuE ve ds-DNA / AuE'nin imalat aşamalarını ve aynı zamanda hematoksilen etiketi ile etkileşimlerini gösteren şematik diyagramlar	15
Şekil 2.8. Poli(metil metakrilat) esaslı mikro sistemlerin üzerine kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile hazırlanan altın kaplı yüzey ve altın kaplı yüzey üzerinde 4-aminotiyofenol ile kendiliğinden düzenlenen tek tabaklar.	16
Şekil 2.9. X-ışınları fotoelektron spektroskopisinin çalışma prensibi.....	20
Şekil 2.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisinin çalışma prensibi. ..	21
Şekil 2.11. Elipsometri çalışma prensibi.	22
Şekil 2.12. Su değme açısı.....	23
Şekil 3.1. AVAL monomerinin kimyasal yapısı.	28
Şekil 3.2. SERS/SEF aktif nanopartiküllerin şematik gösterimi.....	32
Şekil 3.3. Yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi.	33
Şekil 4.1. AVAL monomerinin FTIR spektrumu.....	38
Şekil 4.2. AVAL'a ait ¹ H-NMR spektrumu.	39
Şekil 4.3. Silisyum nanotellerin oluşma mekanizması.	41

Şekil	Sayfa
Şekil 4.4. (a) Temiz ve (b) Gümüş nanopartikül kaplı silisyum yüzeylerin SEM görüntüleri.....	42
Şekil 4.5. Farklı aşındırma süreleri ile elde edilen yüzeylerin SEM görüntüleri (Aşındırıcı derişimi: 0.4 M).	43
Şekil 4.6. Farklı aşındırıcı derişimi kullanılarak elde edilen yüzeylerin SEM görüntüsü (Aşındırma süresi: 60 dakika).	44
Şekil 4.7. Bekletme süresine ile silisyum yüzeylerin su değme açısı ve elipsometrik tabaka kalınlığının değışimi.	46
Şekil 4.8. IPTS derişimi ile silisyum yüzeylerin su değme açıları ve elipsometrik tabaka kalınlıklarının değışimi.	47
Şekil 4.9. (a) Modifiye edilmemiş ve (b) IPTS bağı Si NT yüzeylerin FTIR spektrumları.	49
Şekil 4.10. (a) Modifiye edilmemiş ve (b) IPTS bağı Si-NT yüzeylerin XPS spektrumları.	49
Şekil 4.11. IPTS bağı Si-NT yüzeylerin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları.....	50
Şekil 4.12. Dönüşümün polimerleşme süresince değışimi.	51
Şekil 4.13. Çözelti polimerleşmesine ait yarı-logaritmik kinetik eğrisi.	52
Şekil 4.14. Polimerin mol kütlelerinin ve PDI değerlerinin dönüşümle değışimi.	54
Şekil 4.15. Farklı polimerleşme sürelerine ait GPC kromatogramları.	55
Şekil 4.16. Polimer tabaka kalınlığının polimerleşme süresince değışimi.	56
Şekil 4.17. Elipsometrik kalınlığın polimerin mol kütlesi ile değışimi.....	58
Şekil 4.18. Farklı polimerleşme sürelerine ait PAVAl kaplı Si NT'ye ait XPS spektrumları.	60
Şekil 4.19. Polimer fırçalara ait yüksek çözünürlük XPS spektrumları (Polimerleşme süresi: 16 saat).	61
Şekil 4.20. Polimer fırça aşılınmış yüzeylerin (a) Düşük büyütme, (b) Yüksek büyütme SEM görüntüleri ile (c) TEM görüntüsü.	62

Şekil 4.21. (a) R6G modifiye prob ss-DNA derişimlerine karşılık elde edilen SERS spektrumları ve (b) 1510 cm^{-1} referans alınarak farklı prob ss-DNA derişimlerine karşı SERS şiddetindeki değişim.....	64
Şekil 4.22. R6G etiketli prob ss-DNA farklı derişimlerine karşı elde edilen floresans görüntüleri.	65
Şekil 4.23. (a) R6G modifiye prob ss-DNA farklı adsorpsiyon sürelerine karşılık elde edilen SERS spektrumları ve (b) 1510 cm^{-1} referans alınarak farklı prob ss-DNA adsorpsiyon sürelerine karşı SERS şiddetindeki değişim.	66
Şekil 4.24. R6G etiketli prob ss-DNA farklı adsorpsiyon sürelerine karşı elde edilen floresans görüntüleri (Skala: $100\text{ }\mu\text{m}$).	67
Şekil 4.25. Prob ss-DNA bağlı yüzeyler için 15 farklı yerden elde edilen SERS spektrumları.	68
Şekil 4.26. Prob ss-DNA bağlı yüzeylerin farklı bekletme sürelerine karşılık elde edilen SERS spektrumları.....	69
Şekil 4.27. Optimum koşullarda prob ss-DNA bağlı yüzeylerin XPS genel spektrumu (a) ve (b) C 1s, (c) O 1s, (d) N1 s, (e) P 2p yüksek çözünürlük XPS spektrumları.....	70
Şekil 4.28. (a) MBA@Au, (b) $100\text{ }\mu\text{L}$ TEOS, (c) $200\text{ }\mu\text{L}$ TEOS ve (d) $300\text{ }\mu\text{L}$ TEOS ilavesi ile elde edilen partiküllerin TEM görüntüleri.	71
Şekil 4.29. Sentezlenen partiküllerin (a) UV-vis ve (b) Floresans spektrumları.....	73
Şekil 4.30. Sentezlenen partiküllere ait SERS spektrumu.....	74
Şekil 4.31. Her bir modifikasyondan sonra nanopartiküllere ait (a) UV-GB absorbans spektrumları ile (b) floresans emisyon spektrumları.	75
Şekil 4.32. Farklı zaman aralıklarında etiket ss-DNA bağlı partiküllerin (a) UV-GB absorbans spektrumları (b) floresans emisyon spektrumları, (c) SERS spektrumları ve (d) 3 ay bekletme süresi sonrasında elde edilen TEM görüntüsü.	76
Şekil 4.33. (a) Farklı derişimlerde İPV DNA ile etkileştirilmiş yüzeylerin SERS spektrumları, (b ve c) 1081 cm^{-1} referans alınarak $\log ([\text{DNA}])$ karşı SERS şiddetlerindeki değişim	78
Şekil 4.34. Farklı İPV DNA derişimleri ile gerçekleştirilen hibridizasyon sonrası elde edilen floresans mikroskop desenleri.....	80

Şekil	Sayfa
Şekil 4.35. Farklı hedef ss-DNA türlerine karşı elde edilen SERS şiddetleri.	81
Şekil 4.36. Sandviç hibridizasyona ait rastgele seçilen 15 farklı bölgeye ait SERS spektrumları	82
Şekil 4.37. Sandviç hibridizasyona ait rastgele seçilen 15 farklı bölgeye ait floresans şiddetinin değişimi	83
Şekil 4.38. Hazırlanan sensörün rejenerasyon sayısı ve kararlılığının incelenmesi.....	84
Şekil 4.39. (a) 4. Rejenerasyon ve 1 ay bekletmeden sonra elde edilen floresans deseni ile (b) aynı yüzeylerin sandviç hibridizasyonunda kullanımı sonucu elde edilen floresans deseni.....	85



SİMGELER VE KISALTMALAR

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

Kısaltmalar

Açıklama

AB	Ayrılma birleşme
AIBN	Azobisisobütironitril
AT	Atom transfer
ATRP	Atom transfer radikal polimerleşme
AVAL	Akrilolil-l-valin
DMF	Dimetilformamit
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DT	Dejenaratif zincir transfer
EDCV	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent assay
eV	Elektrovolt
fM	Femtomolar
FITC	Fluoresein isotiyosiyanat
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
GPC	Jel geçirgenlik kromatografisi
GPTS	3-glisidoksipropil trimetoksisilan
HC	Hidrojen yakalama
¹H-NMR	Proton nükleer manyetik rezonans
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HRP	Yaban turpu peroksidaz
IPTS	3-iyodopropil trimetoksisilan
İPV	İnsan papilloma virüs
KDTT	Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar
kV	Kilovolt
LOD	Tayin edebilme sınırı

Kısaltmalar

Açıklama

LOQ	Tayin edebilme limiti
MACE	Metal vasıtalı kimyasal aşındırma
MB	Metilen mavisi
MBA	Merkaptobenzoik asit
NHS	N-hidroksisüksinimit
NIS	N-iyodosüksinimit
nM	Nanomolar
NMP	Azotoksit vasıtalı polimerleşme
NMR	Nükleer manyetik rezonans
NP	Nanopartikül
NT	Nanotel
PAVAL	Poli akriloil-l-valin
PBS	Fosfat tampon çözeltisi
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PDI	Polidisperslik indeksi
PE-I	Feniletil iyodür
QCM	Kuvars kristal mikroterazi
RAFT	Tersinir katılma ayrılma zincir transfer polimerleşme
RCTP	Tersinir zincir transfer katalizlenmiş polimerleşme
RNA	Ribonükleik asit
RT	Tersinir zincir transfer
R²	Korelasyon katsayısı
R6G	Rodamin 6G
SEF	Yüzeyde güçlendirilmiş floresans
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Yüzeyde güçlendirilmiş raman spektroskopisi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TEOS	Tetraetilortosilikat
THF	Tetrahidrofuran

Kısaltmalar**Açıklama****TMB**

Tetrametilbenzidin

UV-GB

Ultraviyole-görünür bölge

XPS

X-ışınları fotoelektron spektroskopisi





1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, nanometre ölçeğindeki (1 ile 100 nanometre boyut aralığındaki) yapıların kontrolü ile malzemelerin, cihazların ve sistemlerin oluşturulması ve tasarlanması ile ilgilenen; kimya, fizik, mühendislik ve biyoloji konularını kapsayan disiplinler arası bir araştırma alanıdır. Nanoteknoloji, tümörlerin ve kanser biyobelirteçlerinin erken saptanması için gerekli tanı kitlerinin ve geleneksel tekniklerin kullanılmasıyla elde edilmesi mümkün olmayan tedavi yaklaşımlarının geliştirilmesi de dâhil olmak üzere birçok uygulama alanına sahiptir. Hızla gelişmekte olan nanoteknoloji aynı zamanda çeşitli teknolojilerin gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Nanoteknolojinin ilerlemesi ile birlikte yüzeylerin fizikokimyasal özelliklerinin kontrol edilebilme şansı artmaktadır. Özellikle yüzey karakterizasyon yöntemlerinin gelişmesi ile yüzeylerin özelliklerini kontrol etmek daha da kolaylaşmakta ve sonuçta biyo-malzemelerin uygulama sahasındaki yüzey işlevselliği kontrol altına alınmaktadır. Nanoteknoloji ile paralel bir ilerleme kaydeden moleküler biyoloji ve nanobiyoteknoloji alanlarında yapılan çalışmalar sayesinde günümüzde biyolojik sistemlerin çalışması ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir (Ebrahimi ve ark., 2019).

Nanobiyoteknoloji; biyoteknoloji ve nanoteknolojinin eşsiz bir birleşimi olarak tanımlanabilir. Nanobiyoteknoloji, nanomolekülleri biyolojik sistemlere dâhil eden veya daha fazla erişim ve etkinlik elde etmek için biyoteknoloji çözümlerini nanometre boyutuna indirgeyen konularla ilgilenir. Bu nedenle nanobiyoteknoloji; bilgi teknolojisi ve nanoteknolojinin en yeni uygulamalarını çağdaş biyolojik konulara entegre ederek, biyoteknoloji alanında mevcut fikir ve anlayışı yeniden şekillendirme potansiyeline sahiptir. Özellikle canlı bir hücrede gerçekleşen birçok reaksiyonun doğrudan ya da dolaylı olarak izlenmesine olanak sağlamaktadır ve nano-ölçekte görüntüleme ajanları sayesinde birçok biyolojik olay takip edilebilmektedir. Canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlardan özellikle antijen-antikor etkileşimi, DNA hibritleşmesi, enzim-substrat ilişkileri günümüzde birçok çalışmaya esin kaynağı olmuştur. Özellikle nanobiyoteknolojinin sunduğu imkânlar çerçevesinde canlı bir hücrede gerçekleşen reaksiyonlar taklit edilerek birçok yeni nesil ve nano-ölçekte malzemeler üretilmiş ve sonuçta hastalıkları erken, hızlı ve güvenilir bir şekilde tespit eden oldukça işlevsel nano-biyomoleküler algılayıcılar üretilmiştir. Hazırlanan bu algılayıcıların nano-ölçekte

işlevsel olması sonucu günümüzde oldukça kompleks olan teşhis/tanı analiz cihazlarının yerini daha küçük, daha hafif ve hızlı analiz cihazları almıştır (Kewal, 2005).

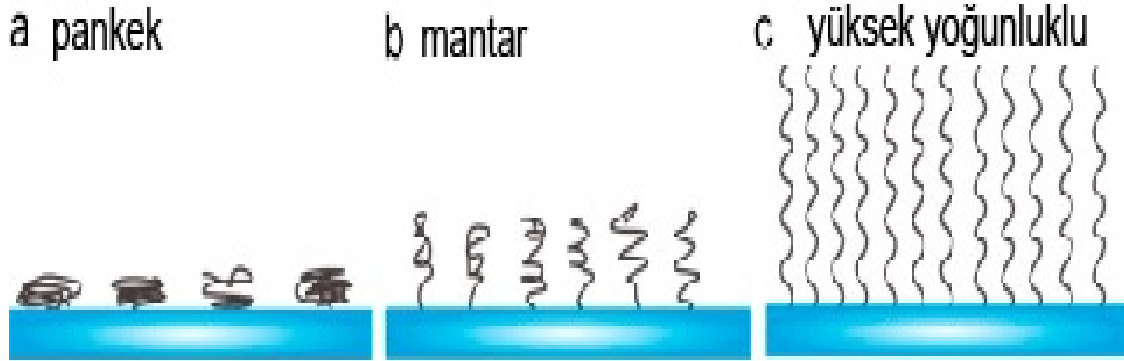
Günümüzde nanoteknolojinin gelişmesiyle atılan en önemli adımlardan biri de hastalıkların erken teşhisine imkân veren birçok yeni nesil biyosensör tasarlanabilmesidir. Bir biyosensör, temel olarak belirli bir yüzey (silisyum, altın vb.) ve immobilize edilmiş prob molekül (antikor, DNA, enzim vb.) ikilisinden oluşmaktadır. Biyosensörler, immobilize edilmiş olan hedef molekül (hastalık etkeni molekül) ile eşlenik molekül arasında meydana gelen spesifik etkileşimler sonucu olası fizikokimyasal değişimlerin (iletkenlik, kırılma indisi, film kalınlığı gibi) belirli bir tarayıcı ile işlenerek anlamlı sinyallere dönüştürülmesi şeklinde çalışırlar. Sonuç olarak prob molekül/hedef molekül etkileşiminin hangi noktalarda meydana geldiği dolayısıyla biyomolekülün türü belirlenerek hücre içinde oluşan biyo-işaretçi moleküllerinin belirlenmesi ile hastalıkların erken ve hızlı bir şekilde teşhisi sağlanmış olur (Zhang ve ark., 2009).

Bilindiği üzere, kanserle mücadelede, savaşın yarısı erken tanı sayesinde kazanılmaktadır. Aksi takdirde binlerce hücre çoğalmış ve belki de metastaz yapmış olacaktır. Bu nedenle, hastalığın erken ve doğru teşhisine olanak sağlayan etkili yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Dolayısıyla, kanser araştırmalarında nanobiyoteknolojinin kullanılması, yeni kanser tanı stratejilerinin geliştirilmesi için umut vaat etmektedir. Hali hazırda birçok tıbbi tarama ve testte nanobiyoteknolojiden yararlanılmasına rağmen, klinik olarak kanserin erken ve doğru teşhisi hala önemli bir sorundur. Bunun en önemli sebebi hazırlanan sensör ya da çiplerin hastalık etkeni molekülün kanda veya dokularda belirli bir derişime ulaşmadan sinyal alınmamasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle özellikle kansere sebep olan organik moleküllerin ve/veya organizmaların kandaki ya da dokulardaki çok düşük derişimlerde dahi teşhis edebilecek biyosensörlere ihtiyaç duyulmaktadır. Günümüzde birçok biyoçip ve biyosensörler farklı yöntemlerle hazırlanmaktadır. Bu yöntemlerden biri altın, cam, silikon gibi yüzeyler üzerinde hazırlanan ve nano seviyede uygun modifikasyonlardan sonra biyolojik aktivite de gösteren polimerik fırça esaslı biyosensörlerdir. Hazırlanan polimerik fırçalar sayesinde oldukça kullanışlı ve yüksek hassasiyette ölçümler yapan yeni biyoçipler tasarlanabilmektedir. Yüzey ve yüzeylere özgü moleküllerin çeşitliliği ile geniş bir tasarım sunması, tasarımın kolay ve düşük maliyetli olması sebebiyle polimerik fırçalar nano-malzeme üretiminde oldukça cazip hale gelmiştir (Hu ve ark., 2011).

2. KAYNAK BİLDİRİŞLERİ

2.1. Polimer Fırçalar

Belirli kimyasal türlerin tespiti, ölçümü ve izlenmesi için analitik cihazların kullanılması ve geliştirilmesine benzer olarak biyoloji alanında, biyolojik türlerin tespiti ve ölçümü için çeşitli biyosensörler geliştirilmiştir. Biyosensörlerin amacı temel olarak, bir biyolojik tanıma elemanının kullanılmasıyla, bir biyolojik maddenin veya biyolojik madde grubunun konsantrasyonu ile orantılı olan anlamlı sinyaller üretmektir. Biyosensörler bu özellikleri sayesinde sağlık, gıda, tıp, tarım gibi oldukça geniş bir kullanım alanına sahiptir. Nanoteknolojideki ilerleme, biyosensör uygulamaları için çeşitli polimerik nanoyapıları tasarlama ve üretme fırsatları sağlamıştır. Ayrıca polimerik malzemelerle modifiye edilmiş yüzeylerin biyo-teşhis alanında, düşük tespit limiti, yüksek hassasiyet, iyi stabilite ve kararlılık gibi avantajlar sunduğu bilinmektedir. Bu bağlamda, yüzey özelliklerini geliştirmek üzere bir malzemenin yüzeyinde yapısal esnekliğe, kimyasal/biyolojik afiniteye ve biyouyumluluğa sahip polimer fırçalar (Şekil 2.1) hazırlanabilmektedir (Bhalla ve ark., 2016; Olivier ve ark., 2012).



Şekil 2.1. Artan aşılama yoğunluklarına göre üç tipik polimer fırça konfigürasyonunun şematik gösterimi (Yang ve Zhaou, 2017).

Biyosensörlerde destek malzemesi olarak kullanılan yüzey üzerine biyomolekül bağlanması ara molekül aracılığı ile gerçekleşmektedir. Yüzeylere, ara moleküllerin bağlanmasında tercih edilen kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar (KDDT) gibi klasik yöntemler temel olarak, spesifik bir organik molekül ile yüzey arasında meydana gelen

etkileşimlere dayanmaktadır. Bu etkileşimler sonucu yüzeyler üzerinde organik moleküle ait tabakalar oluşmaktadır (Miura ve ark., 2008; Johnson ve ark., 2003). Bu yöntem her ne kadar hazırlanması bakımından kolay olsa bile, mekanik dayanımının düşük olması, biyomolekül bağlanması esnasında moleküler kırılmaların meydana gelmesi ve tabaka oluşumunun ardından gerekli olan kimyasal dönüşümlerin oldukça zor gerçekleşmesi gibi çeşitli dezavantajlara sahiptir. Bu dezavantajlarından ötürü, klasik yöntemlerle hazırlanan biyosensörlerin hassasiyetleri oldukça düşük olmaktadır (Endo ve ark., 2005). Bu tür dezavantajların üstesinden gelmek için biyomolekül bağlanmadan önce ara bağlayıcı olarak polimer fırçalar kullanılabilir. Belirli bir yüzey üzerinde gergin polimerik tabakalar olarak tanımlayabileceğimiz polimer fırçalar sayesinde yüzeyler üzerinde oldukça esnek yapılar oluşturularak biyomolekül bağlanma esnasında meydana gelebilecek moleküler kırılmaların önüne geçilebilir. Bunun yanı sıra polimer fırçaların fonksiyonel grup çeşitliliğinin fazla ve film morfolojilerinin kontrol edilmesinin kolay olması gibi avantajları vardır (Pirri ve ark., 2006; Zelikin ve ark., 2007).

Polimer fırçalar iki yöntemle hazırlanabilir:

- Fiziksel adsorpsiyon
- Kimyasal adsorpsiyon

Fiziksel adsorpsiyon genel olarak elektrostatik, hidrofobik/hidrofilik etkileşim ve hidrojen bağı gibi kovalent olmayan zayıf etkileşimleri içerir. Bu sayede; polimerler, yüzey üzerine adsorbe olarak polimer fırçaları oluşturmaktadır. Günümüzde, fiziksel adsorpsiyon yöntemi her ne kadar tabaka-tabaka polimer filmlerin oluşturulmasında tercih edilse de bu yöntemle hazırlanan polimer fırçalar düşük bağlanma yoğunluğu ve zayıf termal stabilite gibi dezavantajlara sahiptir.

Polimer fırçaların hazırlanmasında kullanılan diğer bir yöntem de kimyasal adsorpsiyon yöntemidir. Bu yöntem yüzeye aşılama ve yüzeyden aşılama olmak üzere iki alt başlığa ayrılmaktadır (Krishnamoorthy ve ark., 2014).

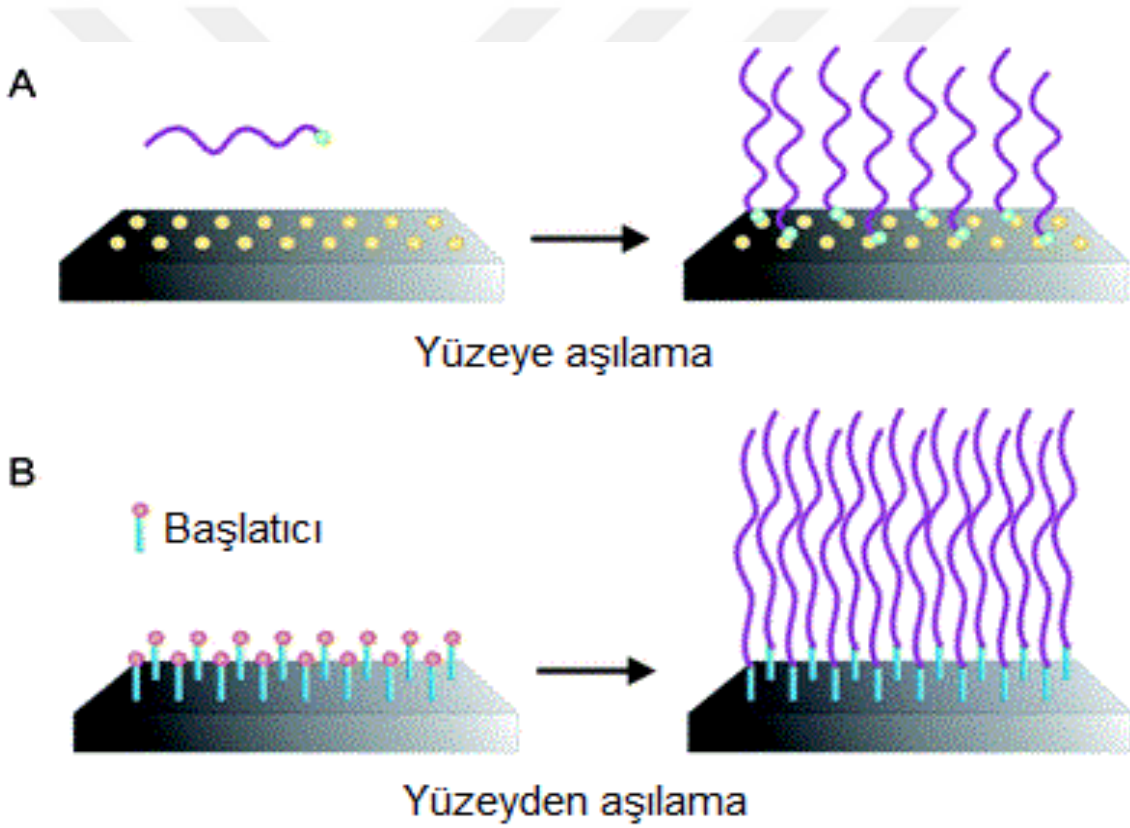
2.1.1. Yüzeye aşılama yöntemi

Bu yaklaşımda, daha önceden sentezlenmiş, iyi tanımlanmış ve karakterize edilmiş polimerlerin sahip olduğu fonksiyonel gruplar vasıtasıyla yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlanır. Bir başka deyişle; yüzey, uygun kimyasal grup ve polimerin uç grubu ile fonksiyonelleştirilir. Ardından, polimerin kimyasal olarak adsorplanması,

polimer çözeltisine daldırılmasıyla gerçekleştirilir. Adsorbe olan polimerin diğer polimer zincirinin adsorpsiyonunu kolaylaştıracak yönde düzenlenememesine neden olur ve entropiden kaynaklı düşük bağlanma yoğunluğuna sahip polimerik fırçalar elde edilir (Yang ve Zhou, 2017).

2.1.2. Yüzeyden aşılama yöntemi

İlk olarak Prücker ve Rühe tarafından tarif edilen bu yöntemde, polimerizasyon mekanizmasına bağlı olarak seçilen uygun başlatıcı yüzeye kovalent olarak bağlanır ve monomerin yüzey üzerinde polimerleştirilmesi sağlanır (Higaki ve ark., 2017).



Şekil 2.2. Polimer fırça hazırlama teknikleri a) yüzeye aşılama yöntemi b) yüzeyden aşılama yöntemi (Zhou ve ark., 2011).

Yüzeye aşılama yönteminde, entropiden kaynaklı düşük yüzey derişimli polimerik fırçalar elde edilirken, yüzeyden aşılama yönteminde ise monomerin büyüyen aktif polimer zincirine difüzlenmesinin kolay olması neticesinde daha yüksek yüzey derişime sahip ve homojen yüzeyler elde edilmektedir. Her ne kadar yüzeye aşılama

yöntemi, yüzeyden aşılama yöntemine göre sentez işlemi açısından daha kolay olsa da makromoleküllerin genel olarak yüzey üzerinde adacıklar şeklinde yerleşmesine ve sonuç olarak homojen olmayan yüzey morfolojisine sahip polimerik fırçaların ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla da hazırlanacak olan biyosensörün hassasiyetini önemli ölçüde düşürmektedir. Bununla beraber, sık istiflenmiş ve zincir boylarının birbirine hemen hemen eşit uzunlukta olması, hazırlanacak olan polimer fırça esaslı biyosensörün hassasiyetini önemli ölçüde artıracaktır (Fischer, 2001; Fukuda, 2004; Goto, 2004).

Polimerik fırçalar, yüzeyde başlatılan çeşitli polimerleştirme teknikleri ile sentezlenebilmektedir. Bu teknikler arasında yer alan “kontrollü/yaşayan” polimerizasyon teknikleri; kütle, yapı ve mol kütle dağılımının kontrolünde ve yüzeyde homojen olarak dağılmış fırçaların üretimde büyük öneme sahiptir. Ayrıca, zincir uzunluklarının birbirine yakın olması (heterojenlik indeksinin 1’e yakın olması) için kontrollü/yaşayan polimerizasyon yöntemlerinden sıklıkla yararlanılmaktadır.

2.2. Kontrollü/Yaşayan Polimerizasyon

Gerek biyolojik sistemlerde gerekse sentetik (yapay) malzemelerde olası herhangi bir etkileşim ara yüzeylerde meydana gelmektedir. Bu nedenle “biyo-ara yüzeyler” ve bununla ilişkili biyolojik sistem-malzeme arasındaki etkileşimler, biyo-malzemenin çalışmasında oldukça büyük öneme sahiptir. Bununla birlikte bu etkileşimlerin kontrol edilebilmesi de elde edilecek biyo-malzemenin in vivo ve/veya in vitro çalışmalarda performansı da doğrudan etkilemektedir. Temel olarak, bir biyo-ara yüzey DNA, RNA, protein, antikor gibi bir biyomolekül ile bir katı yüzeyin (cam, altın, silisyum, mika vs.) etkileşmesi ile hazırlanabilirken kompleks ara yüzeyler, membran, virüs ya da hücre gibi daha büyük biyolojik sistemlerin organik, inorganik veya yapay herhangi bir malzeme ile etkileştirilmesi sonucunda hazırlanır. Bu açıdan bakıldığında, biyolojik sistemler ve yüzey arasındaki etkileşimlerinin etkinliği yüzeyin kimyasal yapısı, ıslanabilirliği, topografik yapısı gibi kimyasal ve fiziksel özellikler tarafından belirlenmektedir. Bundan dolayı biyo-malzeme tasarımında kullanılacak olan yüzeyin özelliklerinin kontrolü ve düzenlenebilmesi oldukça önemlidir. Bu bağlamda, yaşayan radikal polimerleşme yöntemleri, düşük heterojenlik indeksine sahip polimerlerin sentezi için yaygın olarak kullanılan yöntemlerdir. Temel olarak yaşayan polimerleşme yöntemleri sönümlenmiş türlerin (Polimer-X) yaşayan Polimer• türlere dönüşümünü sağlayan tersinir aktivasyona

dayanır (Şekil 2.3.). Mol kütlesinin ve heterojenlik indeksinin iyi bir şekilde kontrolü için çok sayıda aktivasyon-deaktivasyon çevriminin olması gerekmektedir (Fischer, 2001; Fukuda, 2004; Goto, 2004). Son zamanlarda bazı kalay, germanyum, fosfor ve azot bileşikleri tersinir aktivasyon için katalizör olarak kullanılmasıyla yeni tür yaşayan polimerleşme yöntemi geliştirilmiştir (Goto ve ark., 2006, 2007, 2008a, 2008b). Bu bileşiklerin tersinir şekilde işleyen aktivatör olarak kullanılması yeni bir aktivasyon-deaktivasyon mekanizmasının da ortaya çıkmasını sağlamıştır.

Birçok yaşayan polimerleşme yöntemi mekanistik açıdan üç ana sınıfa ayrılır: Ayrılma-birleşme (AB), dejenaratif zincir transfer (DT) ve atom transfer (AT) mekanizmalarıdır.

AB mekanizmasında; Polimer-X türler termal olarak ya da fotokimyasal olarak Polimer• radikali ile ortamda kararlı bir şekilde durabilen X• radikali (oluşan bu radikal ortamdaki diğer radikaller ile değil sadece ve sadece aktif büyüyen polimer zinciri ile reaksiyon oluşturması istenir) oluşturulur. Bu tür kararlı radikal oluşturarak ayrılma-birleşme mekanizmasını kusursuzca yürüten radikallere örnek olarak (2,2,6,6-tetrametilpiperidinil-1-oksi) ve (N-ter butil-1-dietilfosfono-2,2-dimetilpropil nitroksit) gibi azot-oksid bileşikler örnek olarak verilebilir (Georges ve ark., 1983). Bu kararlı radikal bileşiklerin kullanılması ile yapılan polimerleşme yöntemine ise azotoksit vasıtalı polimerleşme (NMP) denir.

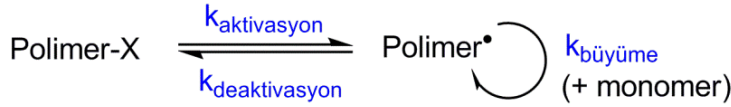
DT mekanizmasında; aktif olarak büyüyen Polimer^l• makroradikalin Polimer-X ölü türlerine atak yapması ile başlar. Bunun sonucunda aktif olan Polimer• radikali ile PolimerI-X ölü türleri oluşur. Görüldüğü gibi bu mekanizma X türünün yer değiştirme reaksiyonudur. Bu mekanizmaya uyan iki tür polimerleşme yöntemi vardır: (1) Emülsiyon polimerleşmesinde sıklıkla kullanılan ve polimerin mol kütlesi kontrolü sağlamada etkin olan iyot vasıtalı polimerleşme (Matyjaszewski ve ark., 1995) ve (2) RAFT polimerleşmesindeki zincir dengesi basamağı dejenaratif transferi içerir.

AT basamağında ise bir metal geçiş kompleksi (genelde bakır kompleksleri) ile ölü türde bulunan X grubunu (genelde klor ya da brom) kopararak aktif olarak büyümeye hazır Polimer• radikaline dönüştürür. Bu mekanizma atom transfer radikal polimerleşmesinin (ATRP) temelini oluşturur.

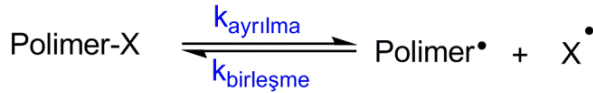
RT mekanizmasında ise ortamda serbest radikal polimerleşme başlatıcısı (benzoil peroksit, azobis isobütironitril gibi), monomer, deaktivatör (GeI₄, PI₃ ve N-

iyodosüksinimit gibi) ve düşük mol kütleli alkil iyodürler (1-feniletıl, PE-I iyodür gibi) kullanılır. Serbest radikal başlatıcısı ile oluşturulan aktif uçlu makroradikaller ilk olarak deaktivatörler ile reaksiyona girerek Polimer-I ölü türlerini oluşturur. Örneğin deaktivatör olarak GeI_4 kullanıldığında bu reaksiyon sonucunda $\text{GeI}_3^\bullet$ radikalini oluşturur ki bu radikal daha sonra aktivatör olarak görev yapar. $\text{GeI}_3^\bullet$ radikali ortamda bulunan düşük mol kütleli alkil iyodürden iyot atomunu etkili bir şekilde koparır bunun sonucunda $\text{PE}^\bullet$ radikali ya da Polimer $^\bullet$ radikali oluşur. Daha sonra bu radikal sayesinde tersinir aktivasyon-deaktivasyon başlatılmış olur.

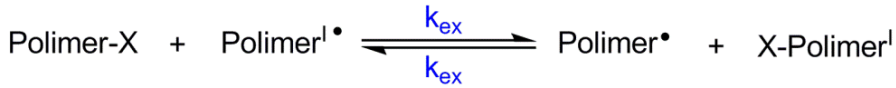
(a) Tersinir aktivasyon (genel gösterim)



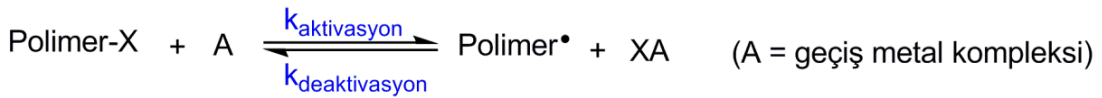
(b) Ayrılma-Birleşme (AB)



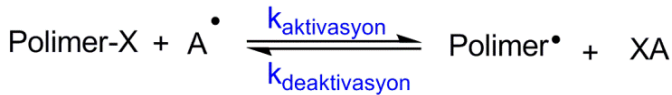
(c) Dejeneratif (yer değiştirme) zincir transferi (DT)



(d) Atom transfer (AT)



(e) Tersinir zincir transfer (RT)



(X = iyot ve XA = GeI_4 , PI_3 , N-iodosüksinimit)

Şekil 2.3. Tersinir aktivasyonun şematik gösterimi (b, c, d) ve RCTP yöntemindeki tersinir aktivasyonun gösterimi (Gotto ve ark., 2008).

2.2.1. RCTP polimerizasyonu

RCTP yöntemi literatürde çok yeni olması nedeniyle bu polimerleşme hakkında bilgiler oldukça kısıtlıdır. RCTP yönteminde en önemli basamak kullanılacak olan deaktivatör (bir başka deyişle katalizör ya da zincir transfer ajanı) seçimidir. Stirenik monomerler için GeI_4 , R_2PH ($\text{C}=\text{O}$) gibi bileşikler kontrolü sağlamada en iyi deaktivatörlerdir. Metakrilat(amit) türü monomerler için GeI_4 , tolil- GeI_3 , PI_3 , N-iyodosüksinimit deaktivatörleri kontrolü sağlamada en etkili bileşiklerdir (Wolpers ve ark., 2011). RCTP yöntemi ile hazırlanan polimerlerin uç grubunda iyot atomu bulunduğundan bu polimerleşme yöntemi ile ortama yeniden deaktivatör, alkil iyodür ve monomer ilavesi ile kopolimer sentezi de gerçekleştirilebilir (Gotto ve ark., 2008). ATRP yönteminde sentez sonrasında yüzey üzerinde metal safsızlıklarının kalması, ATRP ve NMP yöntemlerinde asit ve amin grubu içeren monomerlerin direkt polimerleştirilememesi, RAFT yönteminde ise hazırlanan polimerlerin oldukça keskin kokulu olmasının yanı sıra uç grubunda tiyokarboniltiyol bileşiklerinin zamanla oksitlenerek bozulması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Diğer yöntemlerle kıyaslandığında RCTP yönteminin avantajları şöyle sıralanabilir:

- ATRP’de geçiş metal kompleksleri katalizör olarak kullanılırken RCTP’de ucuz organik maddeler katalizör olarak kullanılır. Ayrıca RCTP’de katalizör aynı zamanda zincir transfer ajanı olarak görev yapar.
- RCTP tekniğinde aktivatör polimerizasyon ortamında üretilir.
- RCTP tekniğinde elde edilen polimerler çoğunlukla renksizdir. Bir başka deyişle saflaştırma işlemine gerek yoktur.
- RCTP tekniğindeki kullanılan zincir transfer ajanları ucuz, zehirlenme gücü düşük ve kokusuzdur.
- RAFT tekniğine göre en önemli avantajı zincir transfer ajanlarının yüksek reaktifliğe, organik çözücülerdeki çözünürlüğünün yüksek olması ve havaya karşı toleranslı olmasıdır.

Tüm bu avantajları nedeniyle, tez kapsamında polimer fırça hazırlamak için RCTP yöntemi tercih edilmiştir. Ayrıca yapılan kapsamlı literatür taraması sonucunda, silisyum yüzeyler üzerinde başlatılan RCTP yöntemi ile polimer fırça sentezine rastlanılmamıştır. Bu açıdan bakıldığında, yüzeyde başlatılan RCTP yöntemi silisyum nanotellerde polimer fırça hazırlanması ilk olma özelliğini taşımaktadır (Bompart ve ark., 2015).

2.3. İnsan Papilloma Virüsü

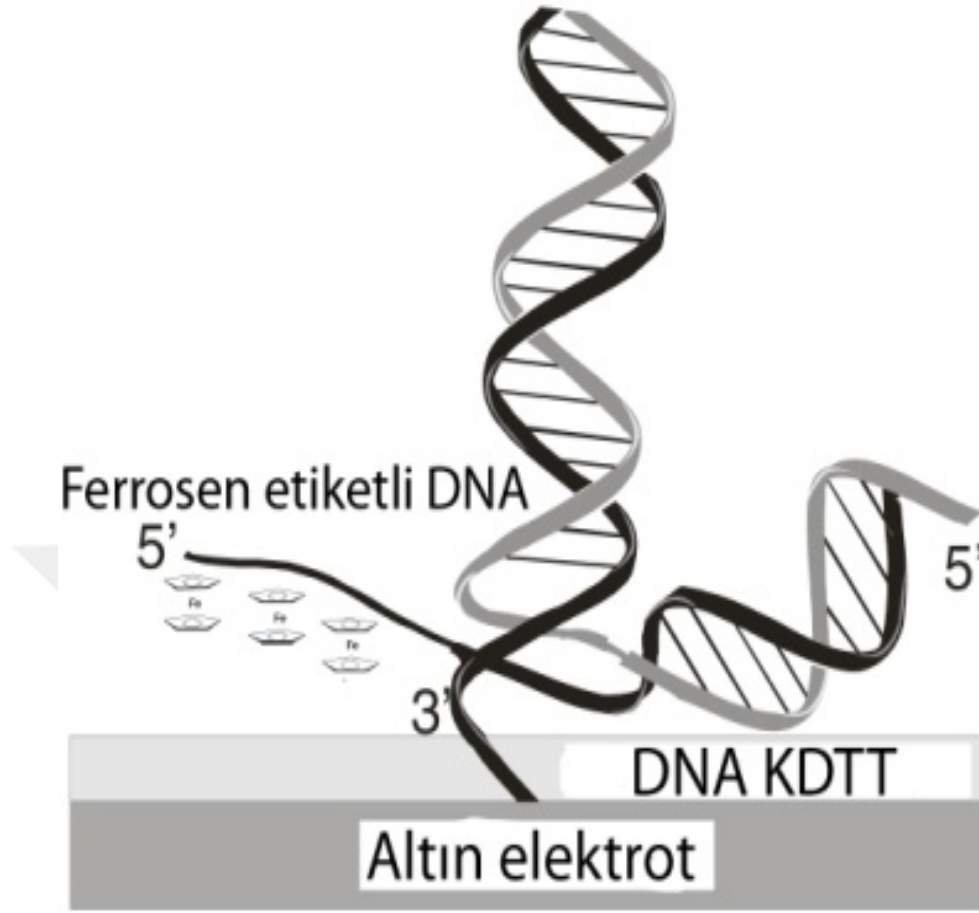
İnsan papilloma virüsü (İPV), insan papilloma virüs papillomavirus ailesine üye, deri ve mukozal yüzeylerdeki bazal epitelyal hücrelerini enfekte eden bir çeşit DNA virüsüdür. 1970'li yıllarla beraber İPV ve kanser ilişkisi üzerinde çalışmalar başlamıştır. Elde edilen bulgularla beraber günümüzde önemli bir bilgi birikimi sağlanmıştır. Şimdiye kadar yüzden fazla HPV tipi tesit edilmiştir. İPV; serviks, penis, vajina, vulva, anüs, ağız, orafarinks ve diğer mukozal bölgeleri tutarak, bu bölgelerde kanser oluşumuna sebep olabilmektedir. Özellikle serviks kanseri olgularının hemen hemen tümünde İPV DNA izole edilmektedir. İPV enfeksiyonu her yaşta görülebilmektedir. Hatta genç sağlıklı çocuklarda da görüldüğü çeşitli çalışmalarda kanıtlanmıştır. 30 yılı aşkın süredir yapılan çalışmalar sonucunda, insan papilloma virüs (İPV) ve kanser arasındaki ilişki net olarak ortaya konulmuştur (Güner ve Taşkiran, 2007). İPV'nin günümüzde özellikle baş-boyun, serviks, vulva, vajina, anüs ve penis kanserlerine yol açtığı yapılan çalışmalar ile detaylı bir şekilde açıklanmıştır (Cutts ve ark., 2007). Özellikle serviks kanserinin oluşmasında %99.7'lik bir oranla İPV sorumludur (Ceyhan, 2007). Halk arasında rahim ağzı kanseri olarak bilinen serviks kanseri, kadınlarda meme kanserinden sonra en çok görülen kanser tipi olup dünya genelinde her iki dakikada bir ölüme sebep olmaktadır (Akhan, 2007). Bu durum, İPV'nin erken teşhis edilmesinin önemini de göstermektedir. İPV'nin 200'den fazla tipi bulunmakla birlikte klinik olarak üç alt sınıfta gruplandırılmıştır: kanser açısından düşük riskli İPV'ler (6, 11, 40, 42, 43, 44, 54, 55 ve 62); olası yüksek riskli İPV'ler (26,53 ve 66) ve yüksek riskli İPV'ler (16 başta olmak üzere 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 56, 58, 59, 68, 73 ve 82) (Dehn ve ark., 2007; Montoyoma ve ark., 2004). İPV'ler insanlara cinsel yolla, kontamine yüzeylerden, ciltteki lezyonlardan ve doğum kanalından olmak üzere direkt veya indirekt olarak çeşitli yollarla bulaşabilmektedir (Milde-Langosch ve ark., 2000; Stanley ve ark., 2007). Yapılan çalışmalarda cinsel olarak aktif kadınların %75'inde İPV varlığı bildirilmektedir. Ayrıca genital İPV enfeksiyonu geçiren bireylerin eşlerinde de %60-66 oranında ortalama 3 ay gibi bir süre sonrasında genital İPV lezyonları görülmektedir (Stanley ve ark., 2007). Bu özelliklerinin yanı sıra özellikle İPV taşıyan anneden doğan çocuklarında yaşamları süresince kansere özellikle nazofarenks (üst yutak) kanserine yakalanma riskinin artmış olduğu rapor edilmiştir (Scott ve ark. 2001).

2.4. İPV Sensörleri

Kanser oluşumu açısından oldukça tehlikeli olan bu tip virüslerin tayini için erken, hızlı, hassas ve güvenilir bir şekilde tayin edebilecek bir biyosensöre ihtiyaç duyulmaktadır. Yapılan literatür çalışmalarında, İPV teşhisi için çeşitli elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik biyosensörler geliştirildiği görülmüştür (Mehrotra, 2016).

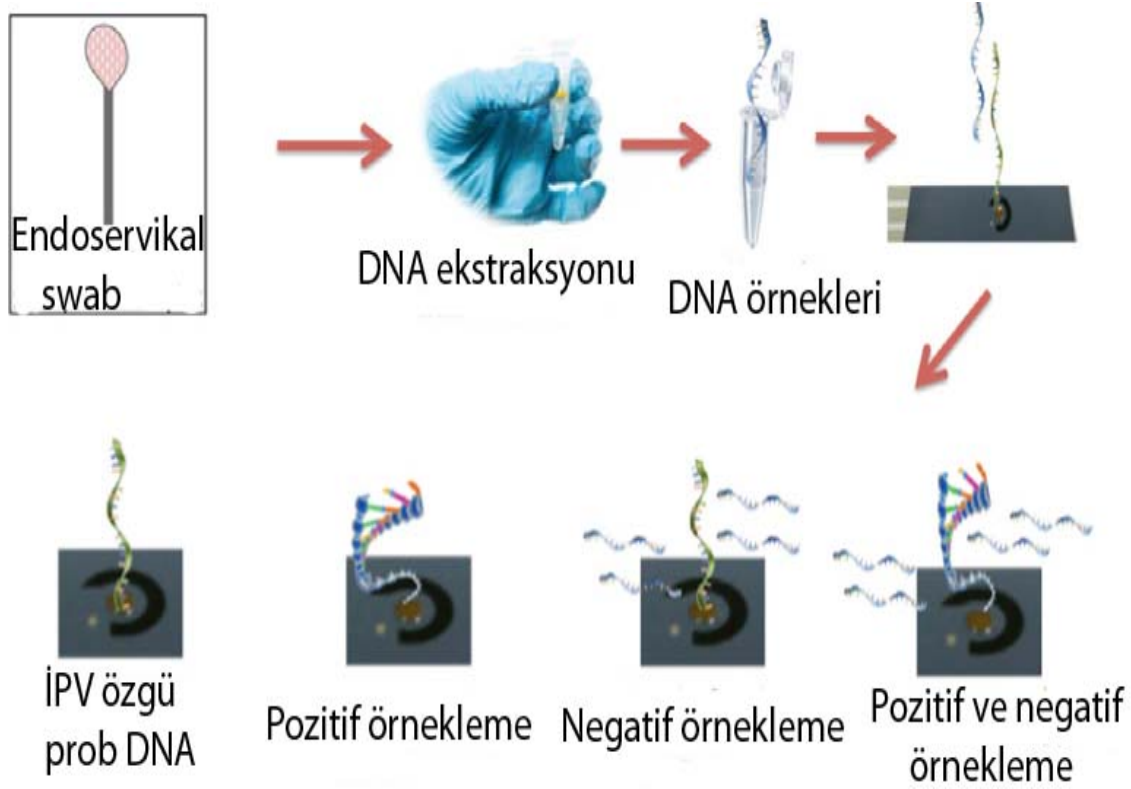
2.4.1. Elektrokimyasal İPV sensörleri

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik reaksiyonun gerçekleştiği bir yüzey ile kalitatif-kantitatif ölçüm yapılmasına olanak sağlayan elektrokimyasal dönüştürücüden (transducer) oluşan biyosensörlerdir. Bununla birlikte elektrokimyasal biyosensörlerde dönüştürücüden gelen sinyalleri anlamlı sinyallere dönüştürüp okunmasını sağlayan elektroanalitik yöntemlere (potansiyometri, amperometri, voltametri gibi) ihtiyaç vardır. Vernon ve grubunun yaptıkları bir çalışmada altın elektrot yüzeyine İPV'ye özgü prob-tek sarmal DNA'nın kendiliğinden düzenlenen tek tabakaları (KDTT) oluşması sağlamışlardır. Daha sonra eşlenik ve bir ucu ferrosen etiketli tek iplikçik DNA ile hibridizasyon gerçekleştirmişler ve meydana gelen değişimleri dönüşümlü voltametri ile incelemişlerdir. Çalışmalarında 21 farklı İPV DNA'sı kullanarak hazırladıkları biyosensörün seçiciliğini araştırmışlardır (Vernon ve ark., 2003). Yapılan bu çalışmanın en büyük dezavantajı analiz süresinin 2-8 saat gibi uzun süre almasıdır. Bununla birlikte hazırlanan sensörün gerçek örnek içerisinde tayin edebilme özelliğinin olup olmadığı tartışılmamıştır.



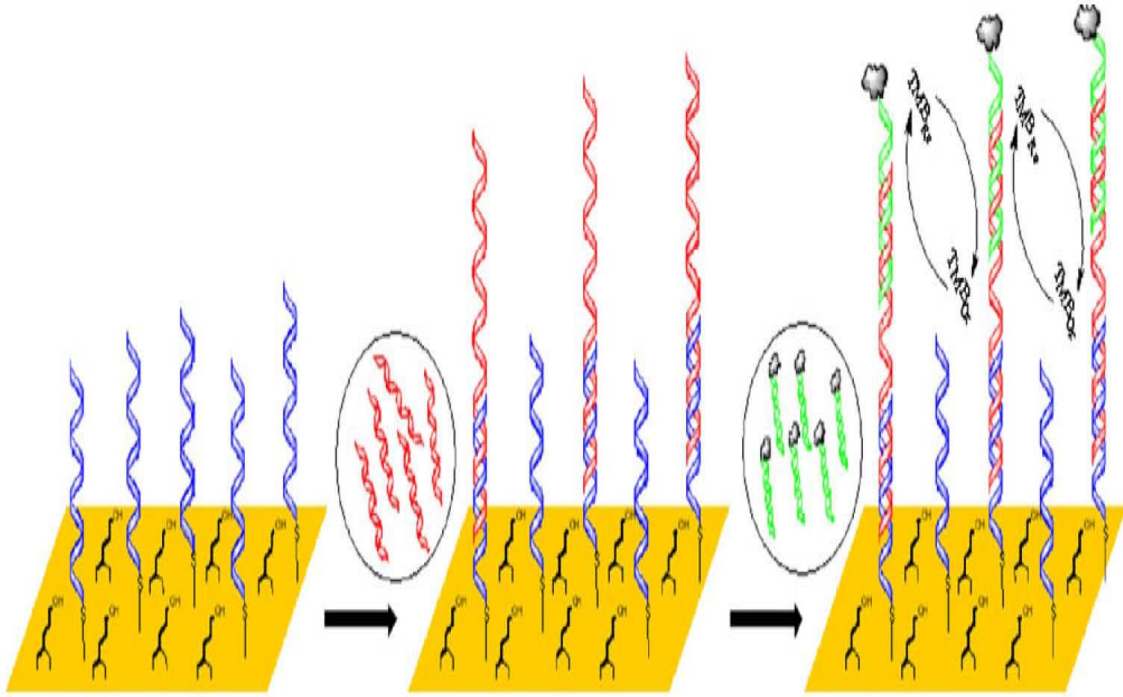
Şekil 2.4. DNA algılama sensörünün şematik gösterimi (Vernon ve ark., 2003).

Campos-Ferreira ve arkadaşlarının hazırladıkları İPV teşhisine yönelik elektrokimyasal biyosensörde ilk olarak L-sistein molekülünün altın elektrot yüzeyinde KDTT oluşturulmuş ve ardından metilen mavisi (MB) etiketli prob-tek sarmal DNA kovalent olarak bağlamışlardır. Ardından, hibridizasyon gerçekleştirilerek İPV teşhisinde kullanılabilirliğini diferansiyel puls voltametrisi ile incelemişlerdir. Hazırladıkları sensörün fosfat tampon (PBS, pH 7.4) içerisindeki LOD değerini 18.13 nM olarak rapor etmişlerdir. Daha sonra, İPV ile enfekte olmuş kadınlardan elde edilmiş swab örneklerinden izole edilmiş ve PCR ile çoğaltılmış DNA örneklerinde İPV tayin edilebilirliğini göstermiştir (Campos-Ferreira ve ark., 2013). Çalışmanın gerçek örnek uygulamasının olması bir avantaj iken hazırlanan sensörlerin kararlılığının ve tekrar kullanım sayısının ne olduğu hakkında bilgiler içermemektedir. Bununla birlikte elektrokimyasal olarak tayin edebilmek için PCR örneklemesine ihtiyaç duyulması çalışmanın en büyük dezavantajıdır.



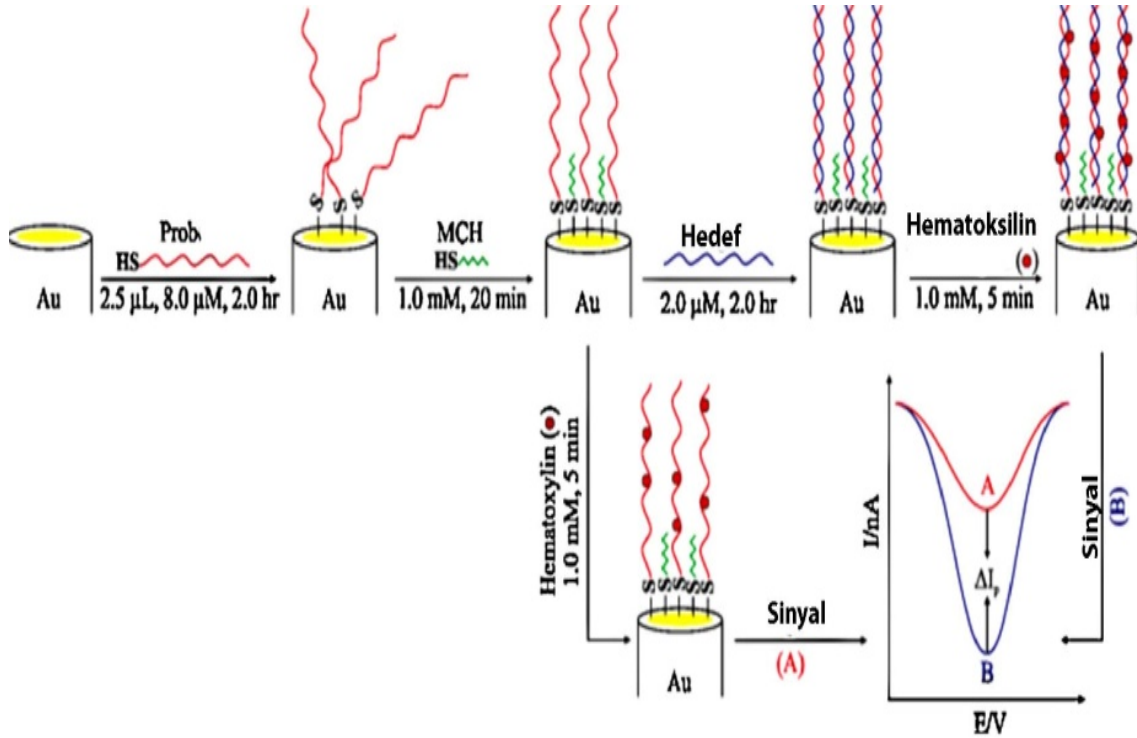
Şekil 2.5. Gerçek örneklerde İPV tespiti için DNA biyosensörünün hazırlanma adımları (Campos-Ferreira ve ark., 2013).

Civit ve grubunun yaptıkları bir çalışmada altın elektrotlar üzerine ilk olarak 5'-ucu tiyollenmiş İPV özgü prob-tek sarmal DNA immobilize etmişler ve ardından altın elektrot üzerine DNA bağlanmamış bölgeleri bloke etmek ve eşlenik DNA sarmalının altın elektrot ile etkileşimini minimuma indirmek için elektrot yüzeyindeki boş bölgeleri dithiol 1 (DT1, 10-(3,5-bis((6-merkaptohexzil)oksi)fenil)-3,6,9-trioksadekanol) ile modifiye etmişlerdir. Ardından, İPV hedef tek sarmal ile yüzeyler üzerinde hibritleşme gerçekleştirmişlerdir. Daha sonra, hazırlanan sensörün elektrokimyasal biyosensör olmasını sağlamak amacı ile HRP (horseradish peroxidase) etiketli tek sarmal DNA ile ikincil bir hibridizasyon gerçekleştirmişlerdir. Ortama enzimin substratı (tetrametilbenzidin, TMB) ilave edilerek meydana gelen elektrokimyasal reaksiyonu dönüşümlü voltametri ile incelemişler ve ortalama tayin etme süresini 1 saat ve hazırlanan sensörün LOD değeri yaklaşık olarak 0.5 nM olarak rapor etmişlerdir (Civit ve ark., 2012). Bununla birlikte hazırlanan sensörün stabilitesi, kullanım sayısı ve gerçek örnek uygulaması hakkında herhangi bir bilgi bulunmamaktadır.



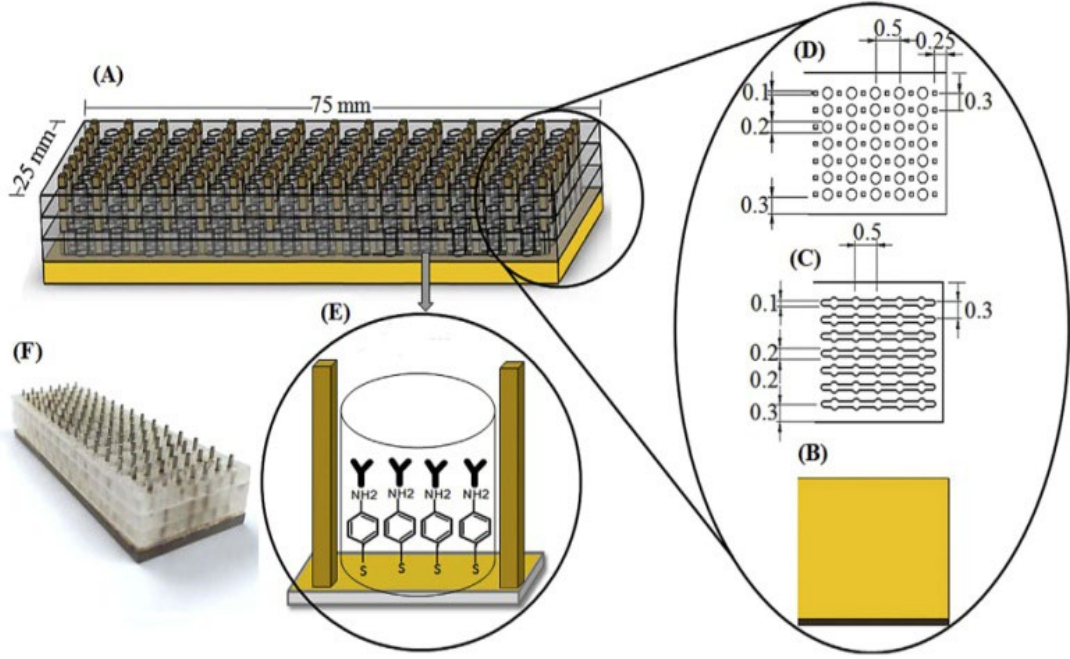
Şekil 2.6. İlk olarak 5'-ucu tiyollenmiş İPV özgü prob-tek sarmal DNA immobilizasyonu (Civit ve ark., 2012).

Nasirizadeh ve arkadaşlarının tasarladıkları elektrokimyasal biyosensörde ise ilk olarak altın elektrotlar üzerine ilk olarak İPV özgü prob-tek sarmal DNA bağlamışlar ve DNA bağlanmadan kalan boş bölgeleri de 6-merkaptohexanol (MCH) ile modifiye etmişlerdir. Daha sonra hedef DNA ile hibridizasyon gerçekleştirmişler ve redoks aktif madde olarak hematoksinin kullanmışlardır. Hibridizasyon öncesi ve sonrası elektrokimyasal davranışı dönüşümlü voltametri ve diferansiyel puls voltametri ile karakterize etmişlerdir. 1.5 saatlik hibridizasyon sonrasında sensörün LOD değerini 3.8 nM olarak rapor etmişlerdir (Nasirizadeh ve ark., 2011). Hazırlanan sensörün seçiciliğini farklı dizilimde DNA iplikçikleri kullanarak araştırmalarına rağmen sensörün kullanım sayısı, stabilitesi ve gerçek örnek uygulaması hakkında herhangi bir bilgi rapor etmemişlerdir.



Şekil 2.7. Ss-DNA / AuE ve ds-DNA / AuE'nin imalat aşamalarını ve aynı zamanda hematoksilen eteki ile etkileşimlerini gösteren şematik diyagramlar (Nasirizadeh ve ark., 2011).

Urrego ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada poli(metil metakrilat) esaslı mikro sistemlerin üzerine kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile nanoboyutta altın tabakalar oluşturduktan sonra altın tabakası üzerine 4-aminotiyofenol ile kendiliğinden düzenlenen tek tabakaları oluşturmuşlardır. Daha sonra bu tabaka üzerine İPV özgü monoklonal antikor (mAb 5051) kovalent olarak bağlanmış ve daha sonra İPV ile muamele edilerek elektrokimyasal empedans spektroskopisi, dönüşümlü voltametri, atomik kuvvet mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu ile karakterize etmişlerdir (Urrego ve ark., 2015). Çalışmada sensörün stabilitesi, seçiciliği, kullanım sayısı ve LOD değeri gibi biyosensörler için oldukça önemli olan parametrelerden bahsedilmemiştir. Bununla birlikte böyle bir sensörün hazırlanması özel ekipmanlar gerektirmesi ve toplam deney süresi dikkate alındığında oldukça uzun vakit alması gibi dezavantajları da mevcuttur.



Şekil 2.8. Poli(metil metakrilat) esaslı mikro sistemlerin üzerine kimyasal buhar biriktirme yöntemi ile hazırlanan altın kaplı yüzey ve altın kaplı yüzey üzerinde 4-aminotiyofenol ile kendiliğinden düzenlenen tek tabaklar (Urrego ve ark., 2015).

Literatürde mevcut elektrokimyasal İPV sensörleri görüldüğü gibi birbirine oldukça benzerdir. Her ne kadar elektrokimyasal sensörlerde sinyal alınma süresi kısa olsa dahi sensörlerin kullanım sayısının belirtilmemesi, gerçek örnek uygulamalarının oldukça kısıtlı olması ve sensörün stabilitesi gibi parametreleri incelenmemesi gibi eksiklikler mevcuttur. Bununla birlikte hazırlanan sensörlerin LOD değerleri dikkate alındığında PCR'den elde edilecek olan LOD değerlerine çok yakındır (DNA dizilimine bağlı olarak yaklaşık 0.5-5 nM). Bu açıdan bakıldığında elektrokimyasal sensörler PCR gibi kompleks yöntemlere göre avantaj sağlasa dahi hassasiyet konusunda ilerleme kaydetmemiştir.

2.4.2. Optik İPV sensörleri

İPV teşhisinde elektrokimyasal sensörlerin yanı sıra optik sensörler de kullanılmaktadır. Özellikle optik sensörlerde İPV teşhis için farklı boyar madde kullanımı ve çeşitli floresans etiketlerinin kullanılması optik sensörleri elektrokimyasal sensörlere üstün kılmaktadır. Bununla birlikte optik sensörlerin çoğunda İPV'nin kantitatif tayin

edebilme kapasitesi elektrokimyasal sensörlere göre oldukça düşüktür. Optik biyosensörlerde absorpsiyon, floresans, fosforesans, yansıtma gibi temel özellikler kullanılır. Josefsson ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada sulu çözelti içerisinde serviks kanserine sebep olan yüksek riskli İPV türlerinden İPV 16,18,31,33,35 türlerini floresans-PCR ikili sistemi ile incelemişlerdir. Bu türlerin bir ucuna floresans etiket boyar maddesi, diğer ucuna floresans sönmölendirici (quencher) boyar madde ile modifiye etmişler ve PCR sırasında meydana gelen kopyalama reaksiyonları sırasında floresans değişimlerini incelemişlerdir (Josefsson ve ark., 1999). Hazırlanan bu sensörün örnek hazırlama süresinin oldukça uzun olması ve PCR gibi oldukça kompleks ve pahalı bir tekniğin kullanılması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bununla birlikte, elde edilen sensörün sadece kalitatif amaçlı kullanım özelliğinin olması da büyük bir dezavantajdır. Pal ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada silikon yüzey üzerinde fotonik kristal hazırlamışlar ve hazırlanan sistemin İPV teşhisinde kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Çalışmalarında fotonik kristal üzerinde meydana gelen biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda (antikor-antijen etkileşimi) kristalin kırılma indisindeki değişimler inceleyerek sensörün kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Sensörün LOD değerini 1.5 nM olarak rapor etmişlerdir (Pal ve ark., 2013). Çalışmalarında gerçek örnek olarak %10'luk serum örneği kullanmışlar ve sensörün hassasiyetle ölçüm yaptığını belirtmişlerdir. Ancak çalışmalarında seçicilik, stabilite gibi parametrelerden bahsetmemişlerdir. Her ne kadar hazırlanan sensörün kantitatif yapma özelliği olsa da fotonik kristal hazırlama aşamalarında elektron-demet litografi, reaktif iyon aşındırma gibi pahalı tekniklerin kullanılması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Yu-Hong ve grubunun yaptıkları bir çalışmada İPV teşhisi için manyetik nanopartikül-kuantum nokta ikili sistem kullanarak floresans spektroskopisine dayalı bir biyosensör tasarlamışlardır. Çalışmalarında PCR'den elde edilen DNA örnekleri içerisinde eşlenik DNA ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacık ve kuantum nokta ayrı ayrı ilave ederek hibridizasyon gerçekleşmesi sağlanmıştır. Daha sonra dış bir manyetik alan ile (mıknatıs) ortamdan ayrılan hibritleşmiş ürünü floresans spektroskopisi ile karakterize etmişlerdir (Yu-Hong ve ark., 2011). Çalışmalarında sensörün analitik performansı hakkında herhangi bir bilgi rapor edilmemiş olup sadece kalitatif çalışma yapılmış olması çalışmadaki en büyük eksikliklerdir. Palantavida ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada ultra-parlak mezoporöz silika nanoparçacıklar (75 nm) üzerine 3-aminopropil trimetoksisilan ile modifiye ettikten sonra

amin tabakası üzerine folik asit kovalent olarak bağlamışlar ve sağlıklı ve kanser hastalarından elde edilen servikal örneklerle nanopartikülleri etkileştirmişlerdir. Daha sonra kanserli hücreler ile sağlıklı hücrelerin floresans mikroskopunda verdikleri farklı renklerle ile İPV teşhisinde kalitatif bir sensör tasarlamışlardır (Palantavida ve ark., 2013).

Literatürdeki mevcut optik İPV biyosensörler kalitatif amaçlı kullanımda oldukça pratik olmasına rağmen İPV pozitif olan bireylerde tedavinin nasıl gerçekleştirileceği bir başka deyişle tedavide kullanılacak olan yöntemin ve ilaç dozlarının nasıl ayarlanacağı konusunda İPV derişimi kilit rol oynamaktadır. Bu nedenle kalitatif tayinin ardından kantitatif tayinin gereksinimi optik sensörlerin kullanım alanını sınırlamaktadır.

2.4.3. Piezoelektrik İPV sensörleri

Elektrokimyasal reaksiyon sonucu elektrot yüzeyinde meydana gelen kütle değişimlerine göre sinyal oluşturan sensörlere piezoelektrik sensörler denilmektedir. Bu tip sensörlerde sıklıkla kullanılan kuartz kristal mikroterazi (quartz crystal microbalance, QCM) sensörleridir. Bu sensörler piezoelektrik kristal substrat üzerindeki rezonatör sayesinde uygulanan mekanik gerilime karşı elektrik yükü toplama esasına dayanır. Fu ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada kuartz kristalin üzerine İPV özgü tek sarmal DNA bağladıktan sonra eşlenik tek sarmal DNA ile hibritleşme gerçekleştirmişler ve elde edilen sensörün serviks kanseri tanısı almış İPV'li hastaların biyopsi materyalinde inceleme yapmışlardır. Elde edilen sensörün LOD değerini 25 μ M olarak rapor etmişlerdir (Fu ve ark., 2004). Dell'Atti ve grubu kuartz kristalin üzerine 11-merkaptoundekanol ile modifiye ettikten sonra streptavidin proteinini (biyotini spesifik olarak tanıyan dört özdeş bölgeye sahip protein) kovalent bağlamışlar ve ardından biyotin ile modifiye prob-tek sarmal DNA ile etkileştirmişlerdir. Ardından hedef DNA ile hibritleşme gerçekleştirilip hem İPV teşhisi hem de genotip çalışması yapmışlar ve sensörün LOD değerini 50 nM olarak rapor etmişlerdir (Dell'Atti ve ark., 2007).

QCM tabanlı İPV sensörleri her ne kadar elektrokimyasal İPV sensörleri ile benzer olsa da hassasiyetleri elektrokimyasal sensörlere göre oldukça düşüktür. Rapor edilen LOD değerlerine bakıldığında hastalığın erken teşhisine olanak vermeyeceği anlaşılmaktadır. Bir başka deyişle QCM sensörleri hastalığın ilerleyen evrelerinde yani

İPV derişimi oldukça yüksek olduğunda pozitif sinyal rahatlıkla elde edilebilir. Bu durum QCM sensörlerinin klinik olarak kullanılabilirliğini kısıtlayan en önemli parametredir.

Bu çalışmada, İPV teşhisine yönelik polimer fırça esaslı SERS ve SEF tabanlı bir biyosensör dizaynı gerçekleştirilmiştir. Tez kapsamında hazırlanan biyosensörün, mevcut biyosensörlerde (optik, elektrokimyasal ve piezoelektrik) bulunan dezavantajların üstesinden gelecek düzeyde olduğu düşünülmektedir. Bunun sonucu olarak, hazırlanan biyosensörün klinik açıdan kullanılma potansiyelinin de bulunduğu düşünülmektedir.

2.5. Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri

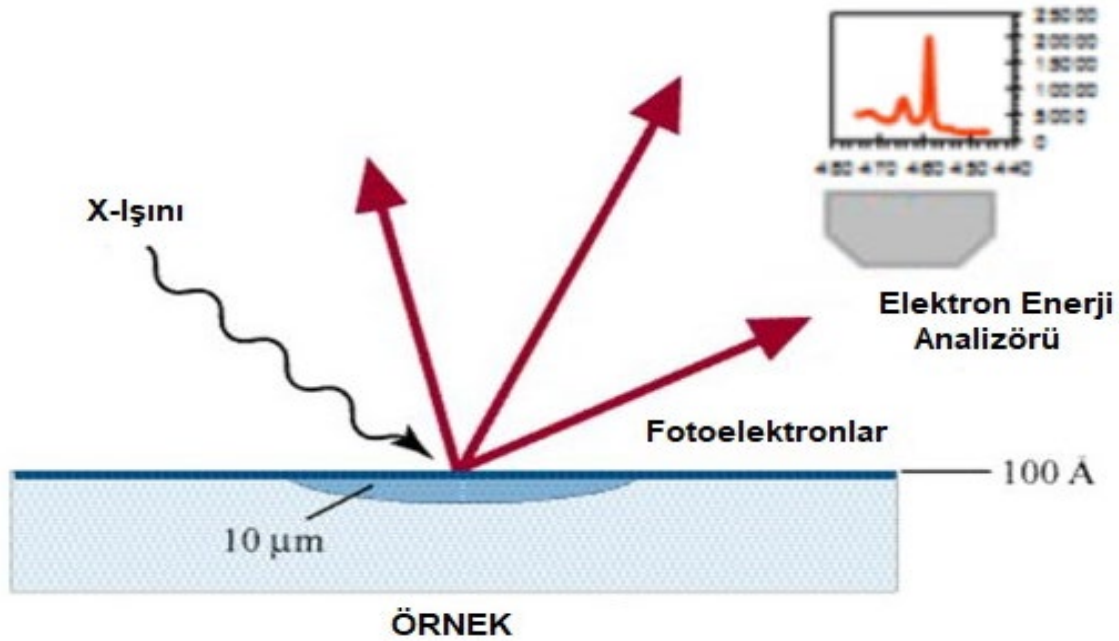
Yüzeylerin kimyasal, fiziksel ve morfolojik özellikleri (ıslanabilirlik, optik, yapışkan, mekanik gibi) malzeme sentezinde çok önemli bir rol oynamaktadır. Bu nedenle, yüzey karakterizasyonu malzeme bilimi için çok önemlidir ve çeşitli karakterizasyon teknikleri kullanılarak belirlenmektedir. Bu bölümde tez çalışmaları kapsamında kullanılan karakterizasyon yöntemleri açıklanmıştır.

2.5.1. X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Yüksek performanslı malzemelere olan talep arttıkça, yüzey mühendisliğinin önemi de artmaktadır. Malzemelerin yüzeyi, dış çevre ve diğer malzemelerle olan etkileşim noktalarıdır. Bu nedenle yüzeyde veya bir malzemenin katmanlarının ara yüzlerinde meydana gelen fiziksel ve kimyasal etkileşimler anlaşılmadan, malzemelerle ilgili sorunların çözülmesi mümkün değildir. Çünkü bu etkileşimler yüzey korozyon oranları, katalitik aktivite, yapışkan özellikler, ıslanabilirlik, temas potansiyeli gibi faktörleri etkilemektedir. Bu özellikleri değiştirmek veya geliştirmek için yüzey modifikasyonlarından sıklıkla yararlanılmaktadır. Bu nedenle, yüzey analizi bir malzemenin yüzey kimyasını anlamak ve yüzey mühendisliğinin etkinliğini araştırmak için kullanılır. Yapışmaz teflon kaplamalardan, ince film elektroniği ve biyo-aktif yüzeylere kadar, X-ışını fotoelektron spektroskopisi, yüzey karakterizasyonu için standart araçlardan biridir (Chen ve ark., 2000).

Kimyasal analiz için elektron spektroskopisi olarak da bilinen X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), bir malzemenin yüzey kimyasını analiz etmek için kullanılan bir önemli bir tekniktir. XPS, bir malzeme içindeki elementlerin kompozisyonunu, ampirik

formülünü, kimyasal durumunu ve elementlerin elektronik durumu gibi birçok özelliğini ölçebilmektedir. XPS spektrumları, analiz edilen malzemenin ilk 1-10 nm'sinden yayılan kinetik enerjiyi ve elektronları eşzamanlı olarak ölçerken, XPS spektrumları katı bir yüzeyi uyaran X-ışınları kullanarak elde edilir. Bir fotoelektron spektrumu, belirli bir kinetik enerjinin üzerindeki elektronlar belirlenerek kaydedilir. Belirli bir karakteristik enerjinin elektronlarını yayan atomlar, spektrumdaki piklerin oluşmasına neden olur. Böylece, fotoelektron tepe noktalarının enerjileri ve yoğunlukları, tüm yüzey elementlerinin (hidrojen hariç) tanımlanmasını ve nicelenmesini sağlar (Addou ve ark., 2019).



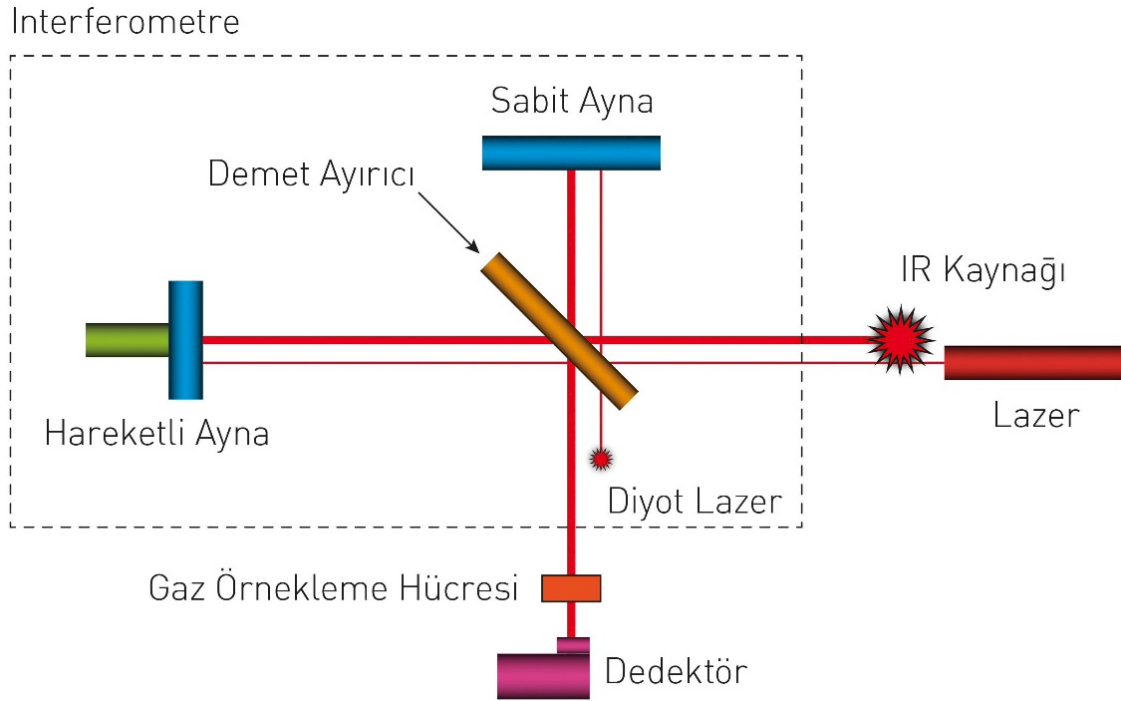
Şekil 2.9. X-ışınları fotoelektron spektroskopisinin (XPS) çalışma prensibi (Kawai., 2010).

2.5.2. Fourier dönüştümlü kızılötesi (FTIR) spektroskopisi

FTIR Analizi veya FTIR Spektroskopisi olarak da bilinen Fourier Transform Infrared Spektroskopisi, organik, polimerik ve bazı durumlarda inorganik malzemeleri tanımlamak için kullanılan analitik bir tekniktir. FTIR analiz yöntemi, test örneklerini taramak ve kimyasal özellikleri gözlemlemek için kızılötesi radyasyon kullanır.

Bir materyal kızılötesi radyasyon ile ısımlandığında, absorbe edilmiş IR radyasyonu genellikle molekülleri daha yüksek titreşimli bir duruma getirir. Belirli bir

molekül tarafından emilen ışığın dalga boyu hareketsiz ve uyarılmış titreşim durumları arasındaki enerji farkının bir fonksiyonudur. Numune tarafından emilen dalga boyları moleküler yapısının özelliğidir. FTIR cihazı analizi yapılan numuneye yaklaşık 10.000 ila 100 cm^{-1} arasında kızılötesi radyasyon gönderir. Bu ışıklardan bazıları absorbe edilirken ve bazıları da emilmeden geçmektedir. Emilen radyasyon ışınları dönme ve / veya titreşim enerjisine dönüştürülür. Detektörde tipik olarak 4000 ila 400 cm^{-1} arasında çıkan sinyal bir spektrum olarak sunulur. Dolayısıyla her molekül veya kimyasal yapı benzersiz bir spektral parmak izi üretecektir. Bu da FTIR analizini, kimyasal tanımlama için harika bir araç haline getirmektedir (Petit ve Puskar, 2018).



Şekil 2.10. Fourier dönüşümlü kızılötesi (FT-IR) spektroskopisinin çalışma prensibi.

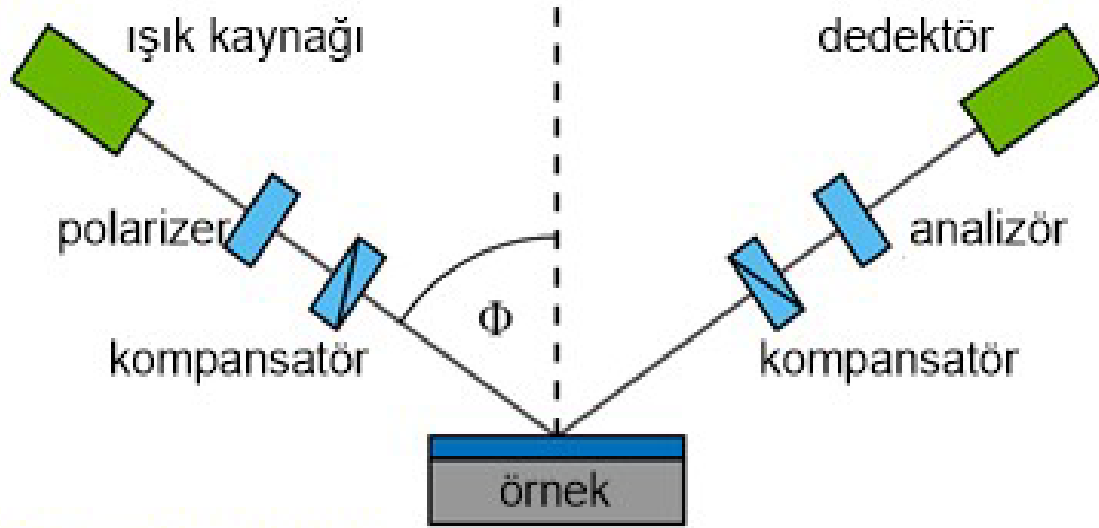
FTIR spektrometresi, dalga boyunu geniş bantlı bir kızılötesi kaynaktan modüle etmek için bir interferometre kullanır. Bir dedektör, dalga boyunun bir fonksiyonu olarak iletilen veya yansıyan ışığın yoğunluğunu ölçer. Detektörden elde edilen sinyal, tek ışınlı bir kızılötesi spektrum elde etmek için Fourier dönüşümleri kullanılarak analiz edilmesi gereken bir interferogramdır. FTIR spektrumları genellikle dalga boyuna karşı yoğunluk grafikleri olarak sunulur. Dalga numarası, dalga boyunun tersidir. Yoğunluk, her dalga numarasındaki ışık geçirgenliği veya absorpsiyon yüzdesi olarak çizilebilir.

FTIR analizi genellikle,

- Bilinmeyen malzemeleri tanımlamak ve karakterize etmek (örneğin, filmler, katılar, tozlar veya sıvılar)
- Bir malzemenin yüzeyinde veya içerisinde gerçekleştirilen modifikasyonu tanımlamak
- Hata analiz araştırmalarında oksidasyon, ayrışma veya kürlenmemiş monomerlerin tanımlanması için kullanılır (Bouyanfif ve ark., 2018).

2.5.3. Elipsometri

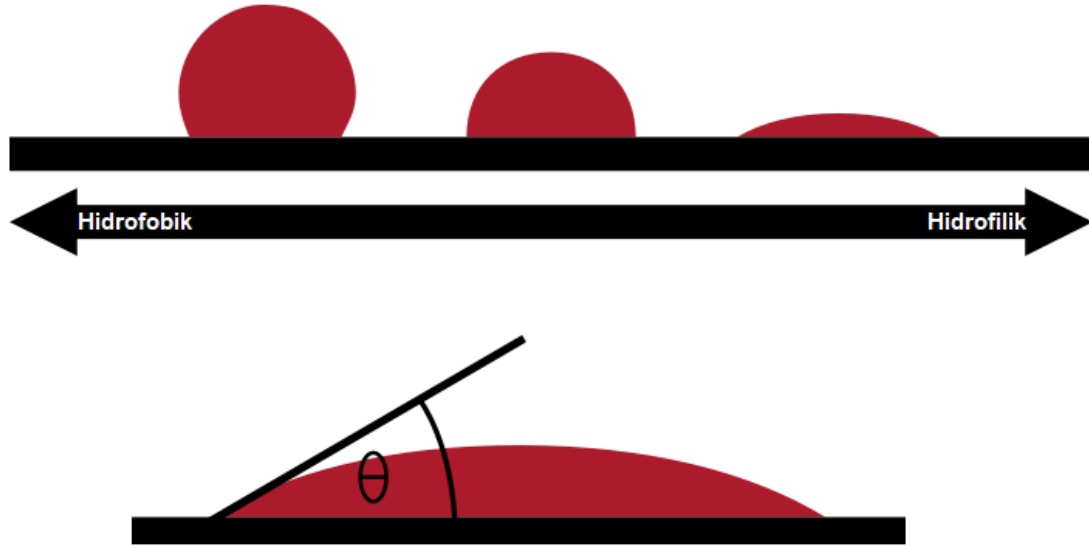
Elipsometri, kırılma indisini ve yarı saydam ince filmlerin kalınlığını ölçmeyi sağlar. Işığın şeffaf bir tabakadan geçirilmesi, malzemenin kırılma endeksine bağlı olarak gelen dalganın fazını değiştirir. Bir elipsometri, 1 mikrondan birkaç mikron kalınlığa kadar olan tabakaları ölçmek için kullanılabilir. Uygulamalar arasında ince filmlerin kalınlık ölçümü, malzemelerin ve ince tabakaların tanımlanması ve yüzeylerin karakterizasyonu bulunur (Aspnes, 2014).



Şekil 2.11. Elipsometri çalışma prensibi.

2.5.4. Su değme açısı ölçümleri

Su değme açısı (ıslanma açısı, θ) bir sıvının bir katı yüzeyini ıslatma yeteneğinin ölçüsüdür ve bir sıvının bir yüzeye ne kadar iyi yayıldığına göstergesidir. Su değme açısı, incelenmekte olan malzemelerin fiziksel özelliklerine bağlı olarak büyük veya küçük olabilir. Şekil 2.12’de, bir yüzey üzerinde üç farklı damlacık gösterilmektedir. En soldaki damlacık katı bir yüzeye yayılmadığından geniş bir temas açısına sahiptir. En sağdaki damlacık ise yüzey üzerinde iyi dağıldığından düşük temas açısına sahiptir. Bu yayılma “ıslanma” olarak da bilinir. Tamamen ıslanma (yayılma) durumunda, temas açısı 0° ’dir. 0° ile 90° arasında katı ıslanabilir ve 90° üzeri ıslanamaz olarak tanımlanır. Lotus etkisi denilen ultrahidrofobik malzemeler söz konusu olduğunda, temas açısı 180° teorik sınırına yaklaşır (Siddiqui ve ark., 2018).



Şekil 2.12. Su değme açısı.

2.5.5. Floresans mikroskobu

Işığın organik ve inorganik numuneler tarafından emilimi ve ardından yeniden yayılması, floresans olarak tanımlanan fiziksel olayların sonucudur. Floresans işleminde ışığın yayılması, foton absorpsiyonu ve emisyonu arasındaki kısa bir zaman gecikmesi nedeniyle, uyarma ışığının absorpsiyonuyla neredeyse eş zamanlıdır (Kanemaru ve ark., 2010).

Floresans mikroskobu, floroforların uyarılmasını ve daha sonra floresans sinyalinin saptanmasını sağlayan ışık mikroskoplarında kullanılan bir görüntüleme tekniğidir. Işık, bir elektronu daha yüksek bir enerji durumuna uyardığında veya hareket ettirdiğinde, hemen emilen orijinal ışığa göre daha uzun dalga boyunda, daha düşük enerjide ve farklı renklerde ışık üreterek floresans üretilir (Kanemaru ve ark., 2010).

Bir floresans mikroskobu, numuneleri incelemek için yansıma ve absorpsiyon yerine veya buna ek olarak floresans ve fosforesans kullanır. Bir numune, numunedeki floresanı harekete geçiren bir dalga boyunda ışıkla aydınlatılır. Bir floresans mikroskobunun tipik bileşenleri bir ışık kaynağı, uyarma filtresi, dikroik ayna (veya dikroik ışın ayırıcı) ve emisyon filtresidir. Floresans mikroskoplar, spesifik proteinlerin lokalizasyonu, organların, hücrelerin ve hücre içi yapıların şeklini belirlemek, protein etkileşimlerini veya konformasyonunu incelemek, iyon konsantrasyonunu incelemek ve canlı hücreleri gözlemlemek dahil olmak üzere birçok farklı uygulama için kullanılmaktadır (Kanemaru ve ark., 2010).

2.5.6. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS)

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS), Raman spektroskopisi kullanılırken hassasiyeti arttırmak için kullanılan, tek molekül seviyesine kadar olan analitleri tespit edebilen ve doğrudan moleküler spesifik bilgi sağlayan güçlü bir tekniktir. Raman saçılması doğal olarak zayıf sinyaller verir, ancak 1970'lerde SERS'in Martin Fleischmann ve Southampton Üniversitesi'ndeki araştırma ekibi tarafından keşfi, bu sorunun üstesinden gelmeye yardımcı olmuştur (Wang ve ark., 2012).

Raman sinyalleri, özellikle görünür ışık uyarımı kullanırken oldukça zayıftır. Zayıf Raman sinyallerini yükseltmek için SERS sıklıkla tercih edilmektedir. SERS için tipik olarak altın (Au) veya gümüşten (Ag) yapılmış nano ölçekli metal yüzeyler kullanır. Bu metal nano yapıların lazerle uyarılması, yüzeysel yükleri yüksek derecede lokalize (plazmonik) bir ışık alanı oluşturarak rezonansa sokar. Bir molekül yüzeyde güçlendirilmiş alana absorbe edildiğinde veya yakınında kaldığında, Raman sinyalinde büyük bir artış gözlenir. SERS, normal Raman saçılmasından daha büyük birkaç büyüklük derecesinde sinyal verir, bu nedenle floresans etiketlemesine gerek kalmadan düşük konsantrasyonların tespitini mümkün kılmaktadır. Metal yüzey, molekülün absorpsiyon maksimaya eşlenen lazer ışığı ile birlikte kullanıldığında Raman sinyali daha

da yükseltilebilir. Bu etki, Yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması, (SERRS) olarak bilinir (Wang ve ark., 2012).

Yüzeyler kimyasal pürüzlendirme, metalik kaplama veya koloidal metalik nanoparçacıkların bir yüzeye biriktirilmesiyle hazırlanır. Uyarma için seçilen SERS metaliyle uyumlu bir lazer dalga boyu kullanılır (Wang ve ark., 2012).

Nanoyapıların lazerle uyarılması plazmonik bir ışık alanı yaratır. Bir molekül yüzeyde arttırılmış alana absorbe edildiğinde veya yakınında bulunduğunda, Raman sinyalinde bir artış gözlemlenir. Geliştirilmiş sinyaller düşük konsantrasyonları tespit etmeyi mümkün kılar, bu nedenle floresans etiketlemesi gerekli değildir. (Wang ve ark., 2013).

2.5.7. Yüzeyde güçlendirilmiş floresans (SEF)

Floresans molekülleri en popüler biyosensör reaktifleri arasında yer alırken, tek floroforları ayrı ayrı tespit etmeyi zorlaştıran düşük optik kesit ve emisyonu karmaşıklaştıran zayıf fotostabilite gibi önemli dezavantajları vardır. Metal nanopartiküller lokalize yüzey plazmon rezonanslarını, iletken elektronların kolektif salınımlarını destekler ve nanopartikül yüzeyinin yakınında son derece yüksek elektromanyetik alan üretir. Yüzey plazmon rezonansı bu parçacıkları elektromanyetik spektrumun görünür ve kızıl ötesi bölgelerinde son derece verimli emici ve saçıcı malzemeler yapar (Zhang ve ark., 2013).

Yüzeyde güçlendirilmiş floresans (SEF) ilk olarak 1970'lerde, florofor emisyon yoğunluğunu artıran plazmonik metal nanoparçacık yüzeyindeki yüksek elektromanyetik alanların yanına bir florofor yerleştirildiğinde ortaya çıkmış bir fenomendir. Hassas analiz ve tıbbi teşhis dahil olmak üzere potansiyel uygulamaları nedeniyle büyük ilgi görmüştür (Zhang ve ark., 2013).



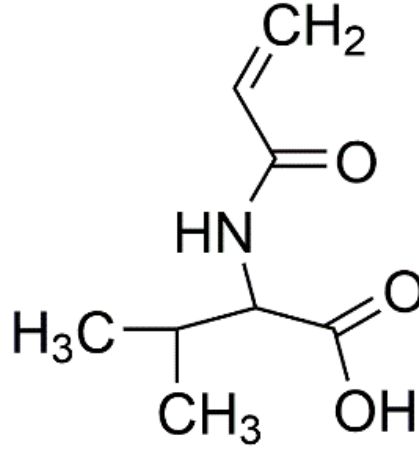
3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

L-valin, KOH, akrilol klorür, 3-iyodopropil trimetoksisilan (IPTS), feniletil iyodür (PE-I), N-iyodosüksinimit (NIS), 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimit (EDC), N-hidroksisüksinimit (NHS), HAuCl₄, 4-merkaptobenzoik asit (MBA), DNA dizilimleri, fosfat tampon tableti, fluoresein isotiyosiyanat (FITC), tetraetilortosilikat (TEOS), 3-glisidoksiopropil trimetoksisilan (GPTS) Sigma-Aldrich firmasından piyasada mevcut saflık derecesi en yüksek olacak şekilde temin edilmiştir. Azobisisobütironitril (AIBN, %98 saflıkta) Acros Organic firmasından temin edilmiş ve kullanılmadan önce iki kez metanolde kristallendirildikten sonra -20 °C’de saklanmıştır. Kullanılan tüm çözücüler HPLC saflığında Merck firmasından temin edilmiştir. Dimetilformamit (DMF, HPLC saflığında) ise CuSO₄ üzerinde distile edildikten sonra kullanılmıştır. Etiketli ve etiketsiz tüm DNA tek iplikçikleri HPLC saflığında, tuzsuz olacak şekilde Bioneer firmasından (Daejeon, Kore) temin edilmiştir. Çalışma kapsamında kullanılan silikon yüzeyler (100) oryantasyonunda, 0.5 mm kalınlığında ve 125 mm çapında olup Shin-etsu (Japonya) firmasından temin edilmiştir.

3.2. N-Akrilol-L-Valin (AVAL) Sentezi

10.0 g L-valin ve 6.72 g KOH, 30 mL su içerisinde çözündükten sonra elde edilen çözelti içerisine 5.43 g akrilol klorür 0 °C’de damla damla 30 dakika boyunca ilave edildi. Ardından, karışım oda sıcaklığında 1 saat boyunca karıştırıldı ve daha sonra çözelti pH’sı 2 olacak şekilde derişik HCl ile ayarlandı. Ortam asidik olmaya başlar başlamaz oluşan beyaz çökelek süzöldü ve soğuk su ile birkaç kez yıkandı. Son olarak elde edilen ürün sudan iki kez kristallendirildi ve vakum etüvde kurutuldu (Casolaro ve ark., 2005). Şekil 3.1.’de AVAL’ın kimyasal yapısı gösterilmektedir.



Şekil 3.1. AVA monomerinin kimyasal yapısı.

3.3. Silisyum Nanotel Sentezi

Silisyum yüzeyler üzerine nanotel hazırlanmasında metal vasıtalı kimyasal aşındırma (metal assisted chemical etching, MACE) yöntemi kullanılmıştır (Shi ve ark., 2000). Bunun için yarı iletken olarak p-tip, boron katkılanmış, (100) oryantasyonunda silisyum yüzeyler kullanılmıştır. Silisyum yüzeyler ilk olarak H_2SO_4/H_2O_2 çözeltisinde (3/1, v/v, “pirana çözeltisi”) 30 dakika boyunca bekletilerek yüzeyler üzerindeki oksit tabakasından ve organik kirliliklerden arındırılmıştır. Daha sonra yüzeyler bol su ile yıkandıktan sonra %5’lik HF sulu çözeltisi içerisinde 10 dakika boyunca bekletilerek yüzeylerin hidrojen sonlu olması sağlandı (Si-H). Hidrojen sonlu yüzeyler herhangi bir yıkama işlemi gerçekleştirilmeden %10 HF/AgNO₃ (0.02 M) çözeltisinde 1 dakika bekletilerek üzerlerinde gümüş tabakasının oluşması sağlandı. Gümüş kaplı silisyum yüzeyler daha sonra %10 HF ve farklı derişimlerde H_2O_2 çözeltisinde (0.1-0.5 M) farklı sürelerde (30-120 dakika) bekletilerek yüzeylerin ıslak aşındırılması sağlanarak nanotellerin oluşması sağlandı. Bu işlem ardından, yüzeyde kalmış olan gümüş tabakaları derişik HNO₃ çözeltisinde 5 dakika boyunca bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Tüm bu işlemlerin ardından yüzeyler azot gazı ile kurutulup kullanılıncaya kadar vakum etüvde muhafaza edilmiştir.

3.4. Silisyum Nanoteller Üzerine İyodosilan (IPTS) Tek Tabakaların Hazırlanması

Silisyum nanoteller üzerinde modifikasyon işlemine başlamadan önce hem yüzeyler üzerinde sentez sonrası oluşan olası oksit tabakasını uzaklaştırmak hem de yüzeyler üzerinde modifikasyonun gerçekleşmesi için gerekli hidroksil gruplarını oluşturulmuştur. Bunun için silisyum nanotel içeren yüzeyler “pirana” çözeltisinde 30 dakika boyunca bekletilmiş ve ardından yüzeyler bol saf su ile yıkanarak azot gazı ile kurutulmuş ve hemen bir sonraki adımda kullanılmıştır.

Silisyum nanoteller üzerinde IPTS tek tabakasını oluşturmak için hidroksillenmiş yüzeyler IPTS'nin toluen içerisinde farklı derişimlerde (hacimce %0.5-%2.0) hazırlanmış çözeltilerinde farklı zaman aralıklarında (1-24 saat) bekletilmiş ve ardından yüzeyler sırasıyla toluen ve metanol ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur.

3.5. Silisyum Nanotel Yüzeyler Üzerinde Polimer Fırça Hazırlanması

Yüzeyler IPTS ile modifiye edildikten sonra yüzeyde başlatılan RCTP yöntemi ile poli(AVAL), (PAVAL) sentezlenmiştir. Bu amaçla, $[AVAL]_0/[PE-I]_0/[AIBN]_0/[NIS]_0 = 50/0.5/0.1/0.01$ olacak şekilde 60 mL DMF stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözelti 6 eşit hacimli vialler içerisine konulmuştur. Her bir vial daha sonra IPTS bağlı Si-NT yüzeyler konulmuştur. Her bir vial ultrasonik banyoda 30 dakika boyunca sonike edilmiş ve aynı zamanda sistemden azot gazı geçirilerek çözünmüş oksijenin uzaklaşması sağlanmıştır. Bu süre sonunda vialler 70 °C'ye ısıtılmış yağ banyosuna konulmuş ve polimerleşme başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (2-16 saat) vialler yağ banyosundan alınmış ve sistemin ağzı açılarak ve sıvı azot içine daldırılarak polimerleşmenin aniden durması sağlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra çözeltiden bir miktar alınıp ^1H -NMR analizi için hazır hale getirildikten sonra her bir zaman aralığına ait % dönüşümler belirlenmiştir. Yüzeyler fiziksel olarak bağlanan polimerlerin uzaklaşması için DMF ile 3 kez yıkanmıştır. Tüm yıkama çözeltileri birleştirilmiş ve soğuk hekzan ile çözeltide oluşan polimerlerin çökmesi sağlandıktan sonra jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizi için hazır hale getirildi. Elde edilen PAVAl kaplı Si-NT yüzeyler azot gazı ile kurutuldu.

3.6. PAVAL Bağlı Yüzeylere Prob ss-DNA Bağlanması

PAVAL bağlı Si NT'lere ilk olarak İPV'yi tanıyacak prob ss-DNA'nın kovalent bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan prob ss-DNA dizilimi aşağıdaki gibidir: prob ss-DNA: 5'-NH₂-GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT-R6G-3'.

PAVAL fırçalarda asılı grupta bulunan karboksilik asit grubunun amin grubuna karşı daha ilgili hale getirmek için bu gruplar süksinimit esterine dönüştürülmüştür. Bu amaç doğrultusunda PAVAL bağlı silisyum yüzeyler 5.0 mL 0.01 M EDC / 0.05 M NHS içeren 0.1 M fosfat tamponunda (PBS, pH 7.4) içerisine konulmuş ve çözelti oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu süre sonunda yüzeyler bol saf su ile yıkanmış ve ardından azot gazı ile kurutulmuştur.

Prob ss-DNA bağlanması için silisyum yüzeyler farklı derişimlerde (0.0025-0.25 µM) prob ss-DNA içeren PBS tamponunda farklı sürelerde (1-24 saat) bekletilmiş ve ardından yüzeyler bol PBS yıkama çözeltisi (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, ve pH = 7.4) üç kez yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuş ve hemen analiz için kullanılmadığı sürece karanlıkta ve + 4°C'de PBS içerisinde muhafaza edilmiştir.

3.7. Prob ss-DNA Bağlı Yüzeyler Üzerinde İPV DNA Bağlanması

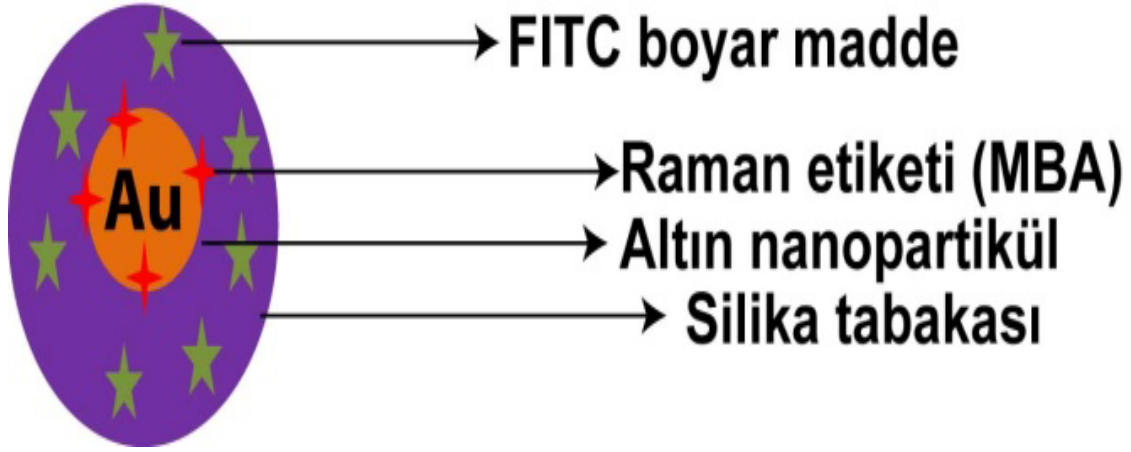
Yüzeyler üzerine prob ss-DNA bağlandıktan sonra İPV DNA ile ilk hibritleşme gerçekleştirilmiştir. Burada hem floresans hem de SERS analizi sırasında spektral girişimi engellemek açısından boya ile modifiye edilmemiş prob ss-DNA bağlı yüzeyler kullanılmıştır. Bunun yanı sıra yüzeyler üzerinde bulunan ve prob ss-DNA bağlanmamış süksinimit esterleri bir sonraki aşamada non-spesifik bağlanmayı minimize etmek için etanolamin ile bloke edilmiştir. Bunun için prob ss-DNA bağlı yüzeyler 0.1 M etanolamin çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında 1 saat bekletilmiş ve ardından PBS yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra yüzeyler üzerine İPV ss-DNA bağlanması için ilk olarak farklı derişimlerde İPV DNA içeren (0.01 fM-0.1 µM) PBS tamponunda oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilmiş ve bu süre sonunda yüzeyler PBS yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Yüzeyler hemen bir sonraki aşamada kullanılmadığı sürece karanlıkta ve + 4°C'de PBS içerisinde muhafaza edilmiştir.

Bu amaçla kullanılan İPV-ss-DNA dizilimi aşağıdaki gibidir:

İPV-ss-DNA: 5'-GCC CAT TAA CAG GTC TTC CAA AGT ACG AAT GTC TAC GTG TGT GCT TTG TAC GCA CAA CCG AAG CGT AGA GTC ACA CTT GCA ACA AAA GGT TAC AAT ATT GTA ATG GGC TCT GTC CGG TTC TGC TTG TCC AGC TGG ACC ATC TAT TTC ATC CTC CTC CTC-3'.

3.8. SERS/SEF Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Eşlenik ss-DNA Bağlanması

Tez kapsamında ortalama çapı 62 nm olan küresel yapıda altın nanopartiküller sitrat indirgeme yöntemi ile sentezlenmiştir (Jin ve ark., 2008). 50 mL deiyonize su içerisine 0.5 ml, 10 mg/mL HAuCl_4 sulu çözeltisinden ilave edildikten sonra karışım kaynayınca kadar ısıtıldı. Kaynama başladıktan sonra çözelti içerisine 0.5 ml, 10 mg/mL sodyum sitrat sulu çözeltisinden ilave edildi ve kaynama işlemine 10 dakika daha devam edildi. Bu süre sonunda karışım oda sıcaklığına soğutuldu. Au NP sentezi gerçekleştirildikten sonra SERS etiket molekül olarak 4-merkaptobenzoik asit (MBA) ile modifiye edilmiştir. Hazırlanan Au NP çözeltisine (10 ml), etanolde hazırlanmış 1 mL 10 mM MBA çözeltisi eklendi ve karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat karıştırıldı. Bu süre sonunda karışım 10000 rpm'de 10 dakika boyunca 3 kez santrifüj edildikten sonra elde edilen pellet 10 mL deiyonize su içerisinde dispers edilir. MBA modifiye edilmiş Au NP (MBA@Au NP) üzerine daha sonra silika tabakası ile kaplanmıştır. Silika tabakası için tetraetilortosilikat (TEOS) bazık ortamda kondenzasyon reaksiyonu ile partiküllere bağlanması sağlanmıştır. Kondenzasyon sırasında ortama FITC boyar maddesi ilave edilirse reaksiyon sırasında boyar maddenin de silika tabakası içerisinde rahatlıkla hapsolabilir (Wu, 2013). Bu amaç doğrultusunda 1 mL MBA@Au NP çözeltisi, 10 mL etanol içerisinde dispers edildikten sonra karışıma 70 μL NH_4OH ilave edilip 5 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta karıştırıldı. Daha sonra karışıma sırasıyla 1 mL 1 μM FITC, farklı miktarlarda (100 μl , 200 μL ve 300 μl) 10 mM TEOS ilave edildi. Karışım oda sıcaklığında ve karanlıkta 4 saat boyunca karıştırıldıktan sonra karışım +4 $^\circ\text{C}$ 'de 16 saat boyunca bekletilmiştir. Bu süre sonunda partiküller 10000 rpm 7 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve elde edilen pellet 1 mL etanol içerisinde dispers edilmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller şematik olarak Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. SERS/SEF aktif nanopartiküllerin şematik gösterimi.

Sentezlenen partiküllerin üzerine eşlenik ss-DNA bağlanması için ilk olarak silika tabakasının üzerine GPTS molekülü bağlanmıştır. Bunun için 1.0 mL etanol içinde dispers edilmiş nanopartikül çözeltiye 25 µL GPTS eklenmiş, oda sıcaklığında 18 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu süre sonunda partiküller 10.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilerek sırasıyla etanol, saf su ve PBS yıkama çözeltisi ile yıkanmış ve en son 1.0 mL PBS tamponu içerisinde dispers edilmiştir.

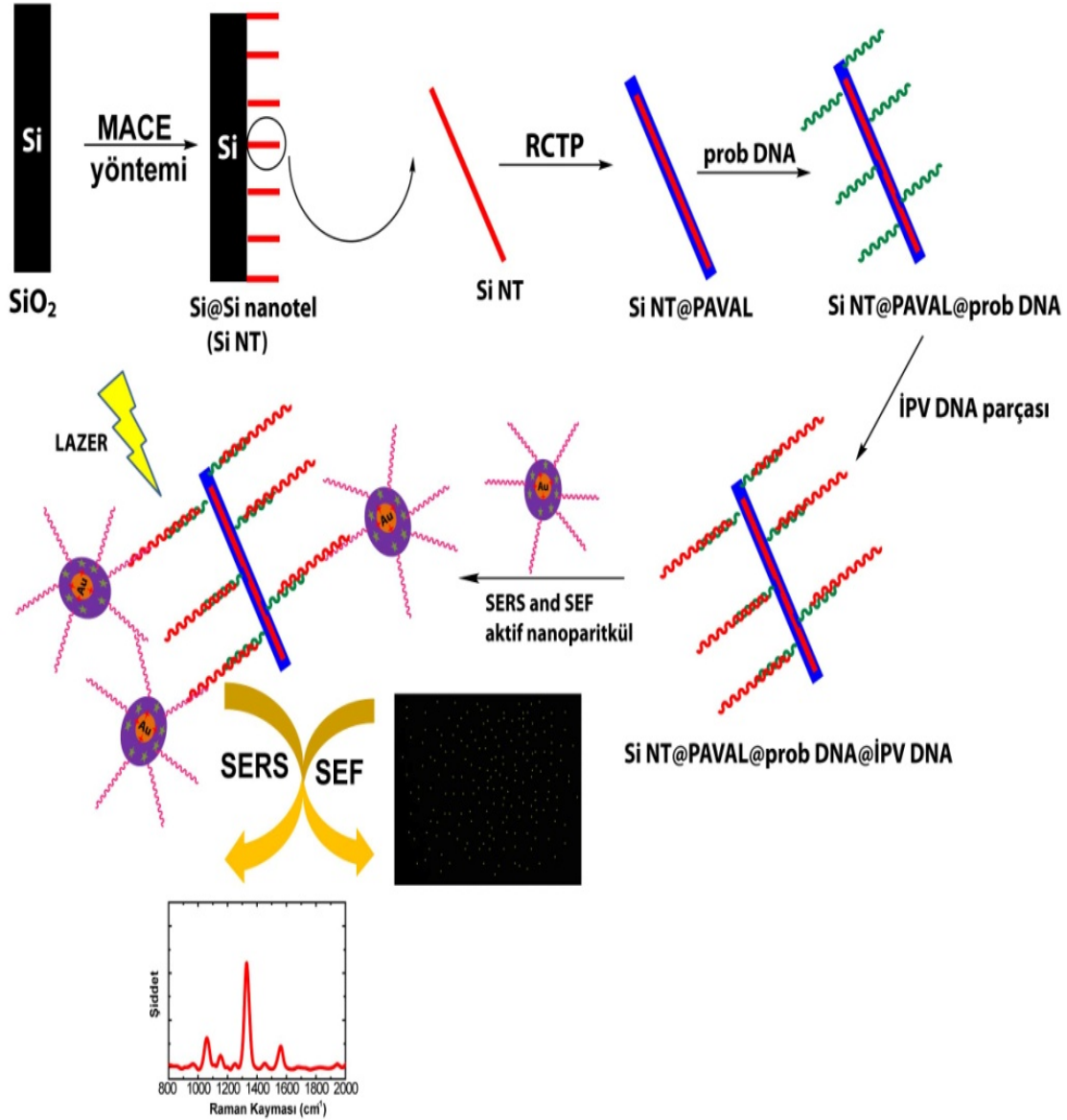
GPTS bağlı partiküllerin üzerine eşlenik ss-DNA bağlanması için 1.0 mL nanopartikül çözeltisi içerisine 10.0 µg/mL eşlenik ss-DNA içeren PBS tamponundan 0.5 mL ilave edilmiş ve karışım oda sıcaklığında 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda karışım 10.000 rpm’de 10 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve PBS yıkama tamponu ile yıkandıktan sonra 1.0 mL PBS tamponu içerisinde dispers edilmiştir.

Bu amaçla kullanılan eşlenik ss-DNA dizilimi aşağıdaki gibidir:

Eşlenik ss-DNA: 5'-NH₂-TTG GAA GAC CTG TTA ATG GGC-3'.

3.9. Sandviç Hibridizasyon Protokolü

İPV ss-DNA bağlı yüzeyler üzerine bir önceki aşamada hazırlanan ve eşlenik ss-DNA bağlı çözeltiden 100 µL damlatılmış ve hibridizasyonun gerçekleşmesi için oda sıcaklığında 2 saat boyunca bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda yüzeyler bol PBS yıkama çözeltisi ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuş ve kullanılmadığı sürece karanlıkta ve +4°C’de PBS içerisinde muhafaza edilmiştir. Bu aşamaya kadar olan deneysel çalışmalar Şekil 3.3’te şematize edilmiştir.



Şekil 3.3. Yapılan deneysel çalışmaların şematik gösterimi.

3.10. Yüzey Karakterizasyon Yöntemleri

3.10.1. X-Işınlı fotoelektron spektroskopisi (XPS)

Yüzeylerin kimyasal analizi SPEC ESCA (Berlin, Almanya) marka Mg/Al çift anotlu XPS sistemi ile Mg K α uyarılması ($h\nu = 1245$ eV) kullanılarak 10^{-9} torr ultra yüksek vakumda yapılmıştır.

3.10.2. Fourier transform infrared (FTIR) spektroskopisi

Yüzeylerin yapısal karakterizasyonunda Thermo Nicolet 6700 ATR aksesuarlı FTIR spektrofotometresi ile yapılmıştır. Silisyum yüzeyindeki her bir modifikasyon sonrasında meydana gelen yapısal değişiklikler Thermo Nicolet 6700 Grazing Angle aksesuarlı FTIR spektrofotometresi kullanılmıştır. Analiz 4 cm^{-1} spektra ayırma ile 256 tarama olacak şekilde gerçekleştirilmiştir.

3.10.3. Elipsometre

Her bir modifikasyon sonrasında silisyum yüzeylerin kalınlıkları Elipsometri (T&T) analizi ile belirlenmiştir. 633 nm dalga boyunda lazer kaynağı kullanılmış ve ölçümler 70° 'lik açıda alınmıştır. Analiz sırasında ölçüm sonuçlarının alınabilmesi için Si/SiO₂/Organik tabaka/hava optik modeli oluşturulmuştur. Oluşturulan bu modelde kırılma indisleri sırasıyla 3.8650; 1.4605; 1.47; 1.0 olarak alınmıştır.

3.10.4. Su değme açısı ölçümleri

Değme açısı ölçümleri flaş kamera aksesuarlı Krüss DSA-100 marka otomatik ganiometre ile yapılmıştır. Su değme açıları oda sıcaklığında ve yüzeylere 5.0 μL su damlatılarak gerçekleştirilmiştir. Su değme açıları DAS3 paket programı ile otomatik olarak belirlenmiştir.

3.10.5. Floresans mikroskobu

Yüzeyler üzerinde DNA hibridizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği floresans mikroskobu (Olympus BX51) ile araştırılmıştır. Ölçümler 100 büyütme ile yeşil filtre kullanılarak karanlıkta alınmıştır. Sistemde ışık kaynağı olarak ksenon lamba kullanılmıştır.

3.10.6. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS)

Tez kapsamında DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi (A.B.D.) kullanılmıştır. Mikroraman sistemi 785 nm lazer ve CCD detektör, optik sistemlerini

içermektedir. Enstrüman parametreleri olarak: 20x objektif, 30 µm laser spot çapı, 150 mW laser gücü ve 60 saniye örnekleme süresi kullanılmıştır.

3.10.7. Polimerlerin mol kütlesi tayini

Çözelti ortamında oluşan polimerlerin mol kütlesi Jel Geçirgenlik Kromatografisi (Waters, Breeze) kullanılarak belirlenmiştir. Analiz sırasında polistiren standartları kullanılmıştır. GPC ölçümleri Waters R410 Differansiyel Refraktif indeks dedektör ve ikili HPLC pompa sistemi kullanılarak Styragel kolonlarda THF çözücü sisteminde, 1.0 mL akış hızında, oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Mol kütleleri universal kalibrasyon ile belirlenmiştir.

3.10.8. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

SEM analizi JEOL JSM 6060 LV marka elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Silisyum yüzeyler, karbon etiket yapıştırılmış alüminyum stub üzerine yerleştirildikten sonra çok ince altın tabakası ile kaplanmış ve analizler 5.0 kV ya da 10.0 kV ile çekilmiştir.

3.10.9. Geçirimli elektron mikroskobu (TEM)

TEM analizi JEOL JEM 1400 marka elektron mikroskobu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 3.0 µL silisyum nanotel çözeltisinden karbon kaplı bakır ızgara üzerine damlatılmış ve oda sıcaklığında kurutulduktan sonra analiz gerçekleştirilmiştir.



4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1. N-Akrioloil-L-Valin (AVAL) Sentezi

Polimer fırça hazırlanmasında monomer olarak N-akrioloil-L-valin (AVAL) tercih edilmiştir. Valin'in aminoasit olması nedeniyle elde edilecek polimer biyoyoumlu özellik kazanmıştır. Monomer sentezinde, alkali ortamda L-valin ile akrioloil klorür arasındaki tipik yer değiştirme tepkimesinden yararlanılmıştır.

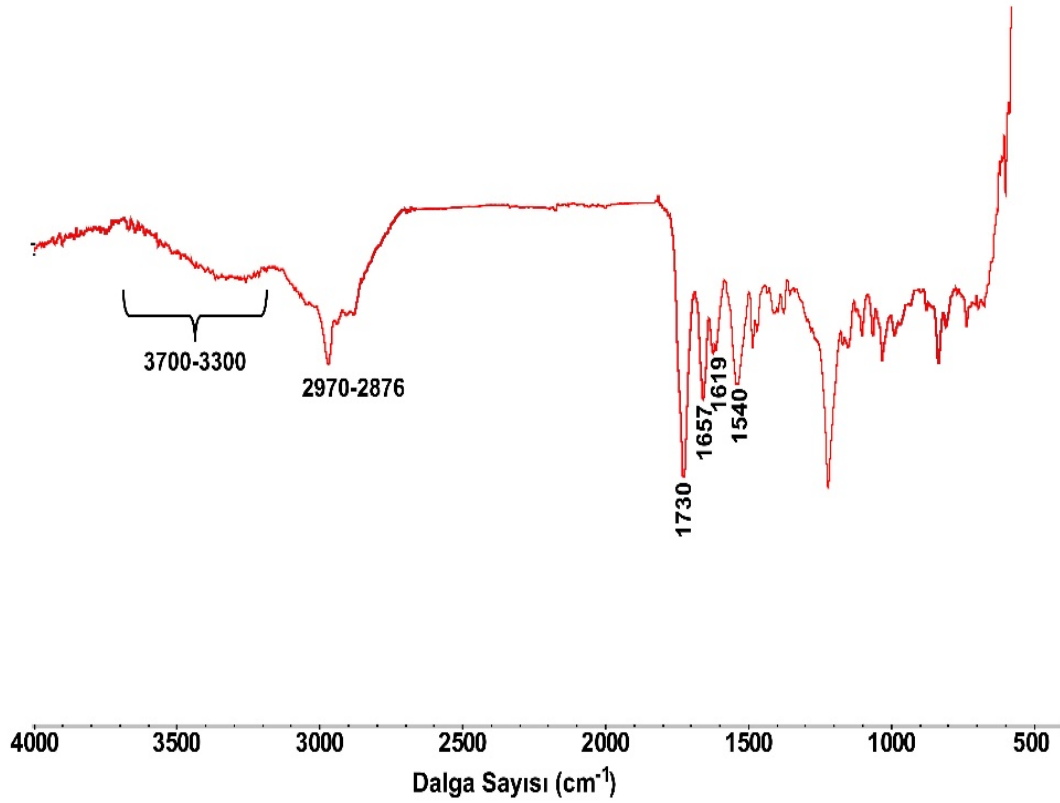
4.2. Monomerin Karakterizasyonu

AVAL monomerin ilk olarak erime noktası tayini yapılmıştır. Erime noktası 110-112 °C bulunmuştur. Bunun yanı sıra AVAL'ın metanol çözeltisinin oda sıcaklığındaki kırılma indisi, $[\alpha]_D^{25} = -13.41^\circ$ bulunmuştur. Reaksiyon verimi %90 olarak hesaplanmıştır.

4.2.1. FTIR analizi

Sentez ortamından kolaylıkla izole edilebilen AVAL'ın yapısal karakterizasyonu ilk olarak FTIR analizi ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de AVAL'a ait FTIR spektrumu verilmiştir.

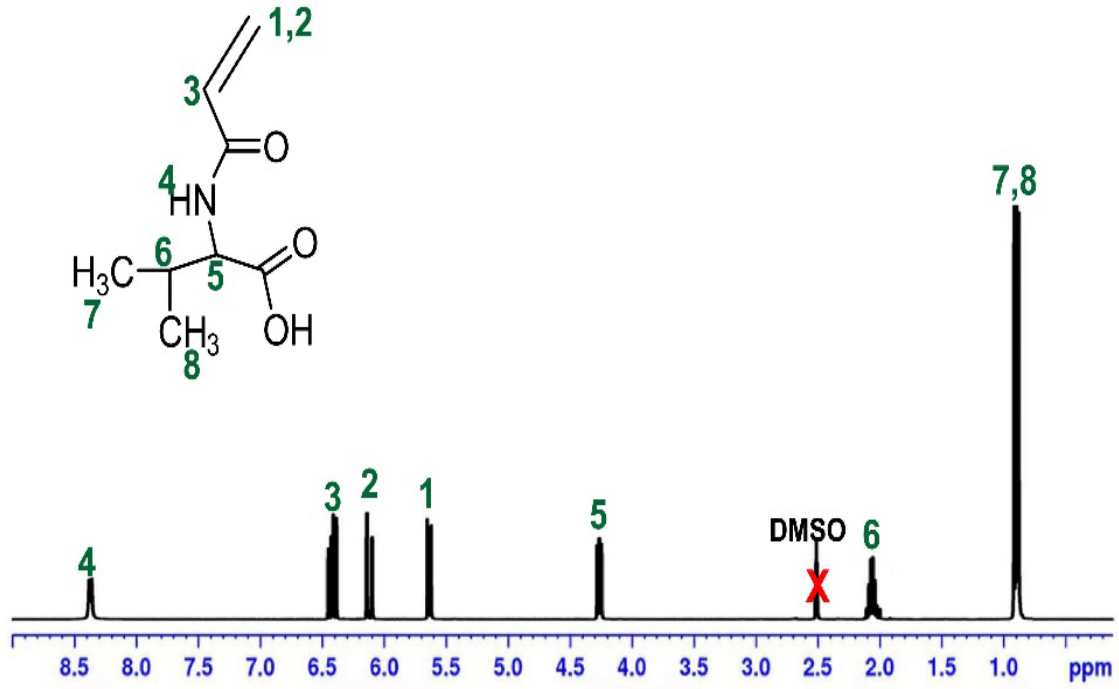
AVAL monomerinin FTIR spektrumu incelendiğinde $3700-3300\text{ cm}^{-1}$ 'de görülen geniş bant monomer yapısındaki karboksilik asit grubuna ait iken, $2970-2876\text{ cm}^{-1}$ 'de ise metil ve metilen gruplarının simetrik ve asimetrik gerilme titreşimlerine karşılık gelen bantlar bulunmaktadır. Bu bantlara ilaveten 1730 cm^{-1} 'de karbonil grubuna, 1620 cm^{-1} 'de ise vinil grubuna ait bandlar görülmüştür. Ayrıca amit I ve amit II gruplarına ait titreşim bantları 1657 cm^{-1} ve 1540 cm^{-1} 'de gözlenmiştir. Amit II bandının daha düşük dalga sayısında ortaya çıkması indüktif etkiler nedeniyle olabilir (Casolaro, 1995).



Şekil 4.1. AVAL monomerinin FTIR spektrumu.

4.2.2. ¹H-NMR (DMSO, 300 MHz) analizi

- δ 0.98 ppm'de bulunan ikili pik-CH₃ grubundaki hidrojenlere aittir (6H).
- δ 2.06 ppm'de bulunan çoklu pik metil gruplarına komşu -CH- grubundaki hidrojene ait piklerdir. (1H).
- δ 4.25 ppm'de bulunan çoklu pik karboksilik asit grubuna komşu -CH- grubundaki hidrojene ait piklerdir (1H).
- δ 5.61 ppm ve δ 6.11 ppm'de bulunan ikili pik vinilik -CH₂- grubundaki hidrojene ait piklerdir (2H).
- δ 6.45 ppm'de bulunan çoklu pikler vinilik -CH- grubundaki hidrojene ait piklerdir (1H).
- δ 8.38 ppm'de bulunan ikili pik -NH- grubundaki hidrojene ait piktir (1H).



Şekil 4.2. AVAL'a ait ¹H-NMR spektrumu.

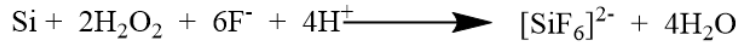
4.3. Silisyum Nanotel Sentezi

Silisyum yüzeyler üzerine nanotel hazırlanmasında metal vasıtalı kimyasal aşındırma (metal assisted chemical etching, MACE) yöntemi kullanılmıştır (Shi ve ark., 2000). Bunun için yarı iletken olarak p-tip, boron katkılanmış, (100) oryantasyonunda silisyum yüzeyler kullanılmıştır. Silisyum yüzeyler ilk olarak H₂SO₄/H₂O₂ çözeltisinde bekletilerek yüzeyler üzerindeki oksit tabakasından ve organik kirliliklerden arındırılmıştır. Daha sonra yüzeyler bol su ile yıkandıktan sonra HF sulu çözeltisi içerisinde bekletilerek yüzeylerin hidrojen sonlu olması sağlandı (Si-H). Hidrojen sonlu yüzeyler herhangi bir yıkama işlemi gerçekleştirilmeden HF/AgNO₃ çözeltisinde bekletilerek üzerlerinde gümüş tabakasının oluşması sağlandı. Gümüş kaplı silisyum yüzeyler daha sonra HF/H₂O₂ çözeltisinde bekletilerek yüzeylerin ıslak aşındırılması sağlanarak nanotellerin oluşması sağlandı. Bu işlem ardından, yüzeyde kalmış olan gümüş tabakaları derişik HNO₃ çözeltisinde bekletilerek uzaklaştırılmıştır. Tüm bu işlemlerin ardından yüzeyler azot gazı ile kurutulup kullanılıncaya kadar vakum etüvde muhafaza edilmiştir.

Aşındırıcı (H_2O_2) derişimi ve aşındırma süresi oluşacak olan nanotellerin uzunluğunu direkt olarak etkilemektedir. Silisyumun yüzeyler aşağıdaki tepkimeler sonucunda kimyasal olarak aşındırılır:



Net tepkime:



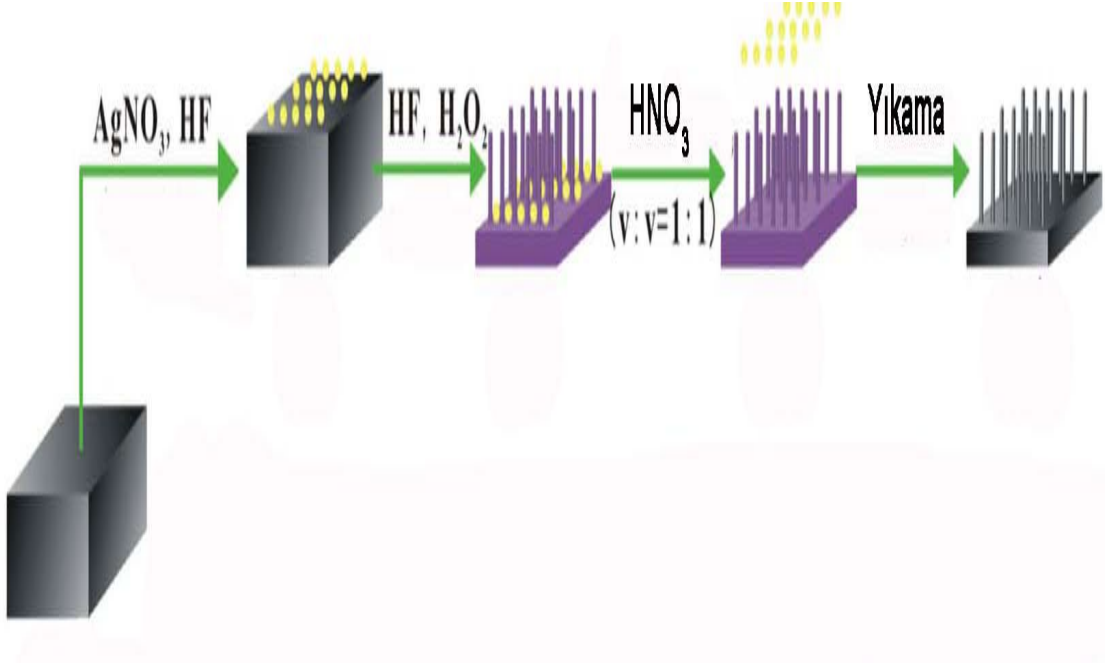
Net tepkimede, aşındırma prosesinin elektrot potansiyeli aşağıdaki gibi verilebilir (Lin ve ark., 2010):

$$E = E^0 - \frac{0.059}{4} \log \frac{[\text{SiF}_6]}{[\text{H}_2\text{O}_2]^2 [\text{H}^+]^4 [\text{F}^-]^6} \quad (4.1)$$

Eşitlikten de görüldüğü gibi, H_2O_2 derişiminin artması potansiyelin artmasına neden olacaktır. Bu nedenle aşındırma reaksiyonunun termodinamik kontrollü olduğu ve aşındırmanın hızlanacağı söylenebilir. Sonuç olarak, nanotellerin uzunluğu sadece aşındırma süresine bağlı olmayıp aynı zamanda aşındırıcı derişimine de doğrudan bağlı olduğu anlaşılmaktadır. Bu nedenle çalışma kapsamında nanotel uzunluğuna aşındırma süresi ve H_2O_2 derişim etkisi incelenmiştir.

Şekil 4.3'te gösterildiği gibi silisyum nanotel oluşumunda ilk basamak silisyum yüzeylerin gümüş nanopartikül tabakası ile kaplanmasıdır. Gümüş nanopartiküller, aşındırma tepkimesini katalizleme özelliğinin yanı sıra oluşan nanotellerin poröz yapıda olmasını sağlamaktadır. H_2O_2 varlığında Ag nanopartiküller yükseltgenerek Ag^+ iyonlarına dönüşür ve bu iyonlar silisyum yüzeyinden elektron koparır ve tekrar Ag^0 'a indirgenir. Bu esnada oluşan $[\text{SiF}_6]^-$ çözünerek silisyum yüzeyin aşınmasına sebep olur. Aşındırma sırasında gümüşün yükseltgenmesi ve hemen ardından indirgenmesi ile oluşan gümüş nanopartiküller yüzeyin iç kısmına doğru hareket ederek dikey bir şekilde yüzeyin aşınmasını katalizler ve en sonunda silisyum yüzey üzerinde dik bir şekilde silisyum nanotellerin oluşmasını sağlar (Peng ve ark., 2006). Aşındırma reaksiyonu sonlandığında silisyum yüzeyler üzerinde gümüş nanopartiküller bulunur. Ortamdaki bu nanopartiküller

seyreltik nitrik asit çözeltisi ile yıkanarak uzaklaştırılır ve sonuç itibariyle saf nanoteller elde edilmiş olur.

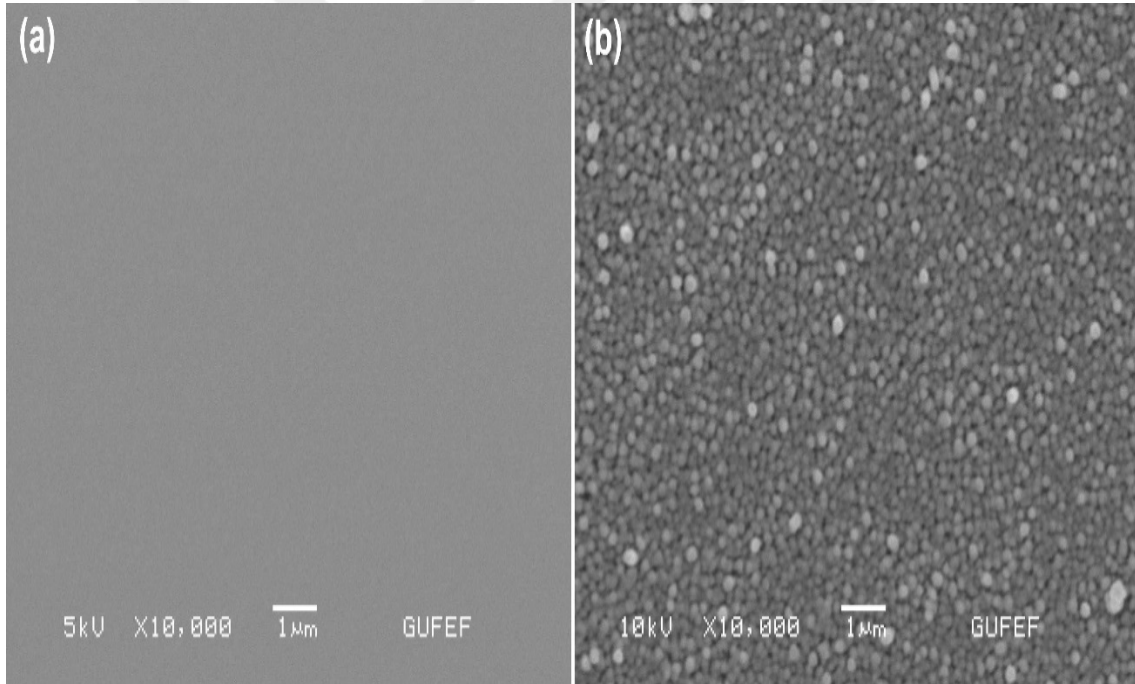


Şekil 4.3. Silisyum nanotellerin oluşma mekanizması (Xi ve ark., 2018).

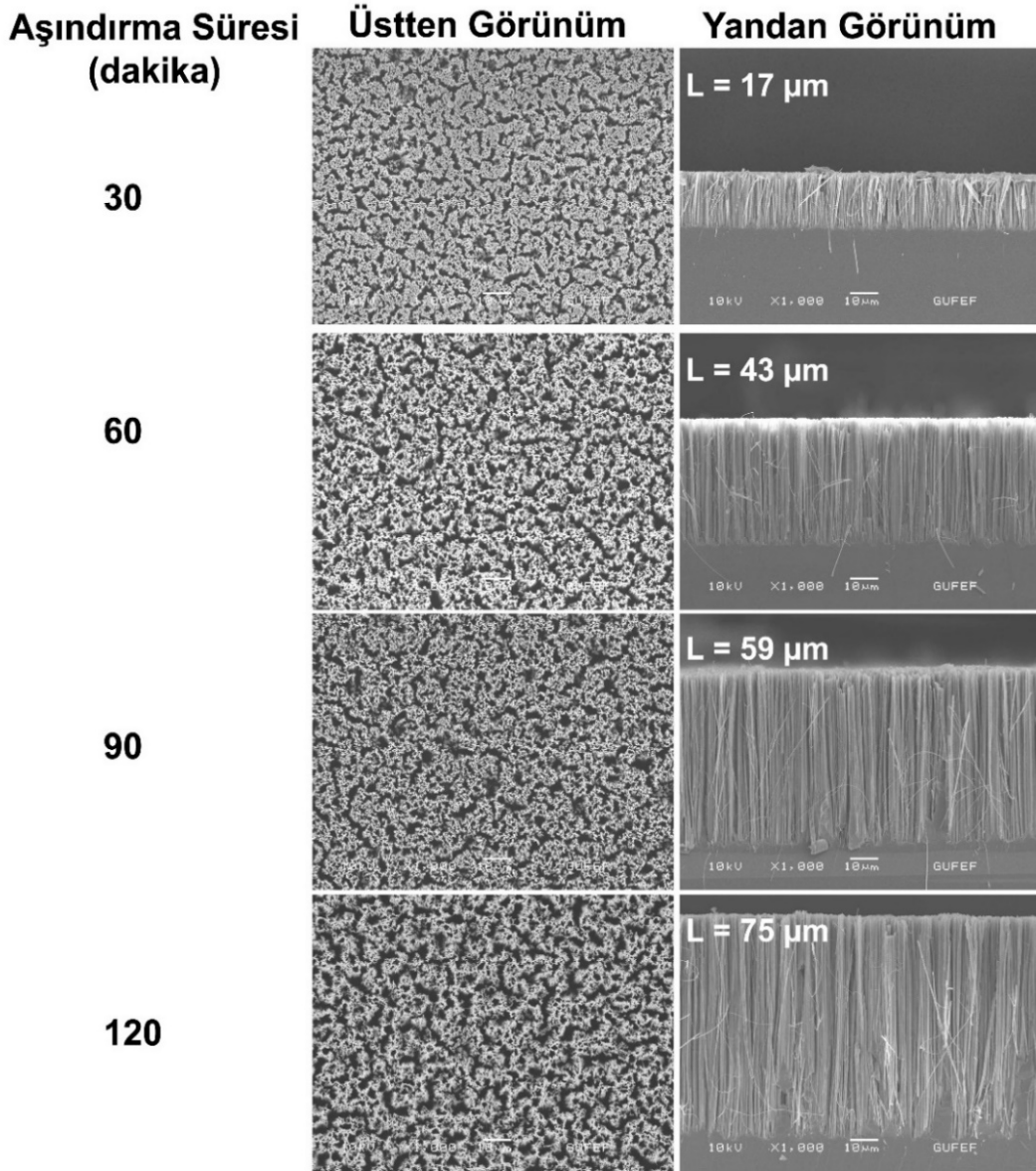
Tez kapsamında, silisyum yüzeyler üzerine ilk olarak gümüş tabakasının oluşması sağlanmıştır. Bu amaçla silisyum yüzeyler “pirana” çözeltisinde bekletildikten hemen sonra %5’lik HF sulu çözeltisinde bekletilmiştir. Hiçbir yıkama işlemi yapmadan silisyum yüzeyler %10 HF/0.02 M AgNO₃ sulu çözeltisinde (v/v, 1/1) 1 dakika bekletilmiştir. Ardından yüzeyler bol saf su ile yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur. Hazırlanan gümüş kaplı silisyum yüzeyler taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.4’te temizlenmiş silisyum yüzey ile gümüş kaplı silisyum yüzeylerin SEM görüntüleri verilmiştir. Şekil 4.4a’dan da görüldüğü gibi silisyum yüzeylerin oldukça pürüzsüz olduğu ve etkin bir temizleme işleminin gerçekleştirildiği görülmektedir. Şekil 4.4b’de ise temiz silisyum yüzeylerin AgNO₃ sulu çözeltisinde bekletilmesi sonucunda bu yüzeylerin oldukça sıkı istiflenmiş ve ortalama 60 nm çapında gümüş nanopartiküller ile kaplandığı belirlenmiştir.

Yüzeyler gümüş nanopartiküller ile kaplandıktan sonra nanotel oluşumuna aşındırma süresinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla, gümüş kaplı yüzeyler %10 HF sulu

  zeltisi ve 0.4 M H₂O₂ sulu çözeltisi içeren karışım içerisinde farklı sürelerde bekletilmiş ve hemen ardından saf su ile yıkanmıştır. Daha sonra yüzeyler seyreltik nitrik asit ve saf su ile yıkanmıştır. Yüzeyler azot gazı ile kurutulduktan sonra SEM analizine hazır hale getirilmiştir. Şekil 4.5'te farklı aşındırma süresi ile elde edilen yüzeylerin üstten ve yandan çekilmiş SEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde, aşındırma süresi 30-90 dakika aralığında olduğunda yüzeylerin üsten görünümlerinde önemli değişiklik olmayıp tellerin yüzeyler üzerinde kümeler halinde olduğu belirlenmiştir. Aşındırma süresi 120 dakika olduğunda ise nanotellerin en uç kısımdan birleşerek konglomere şeklinde dağılım göstermiştir. Yüzeylerin yandan görüntüleri incelendiğinde ise nanotellerin uzunluğu aşındırma süresinin 30-120 dakika aralığında değiştiğinde uzunluklarının 17-75  m aralığında değişmiştir.



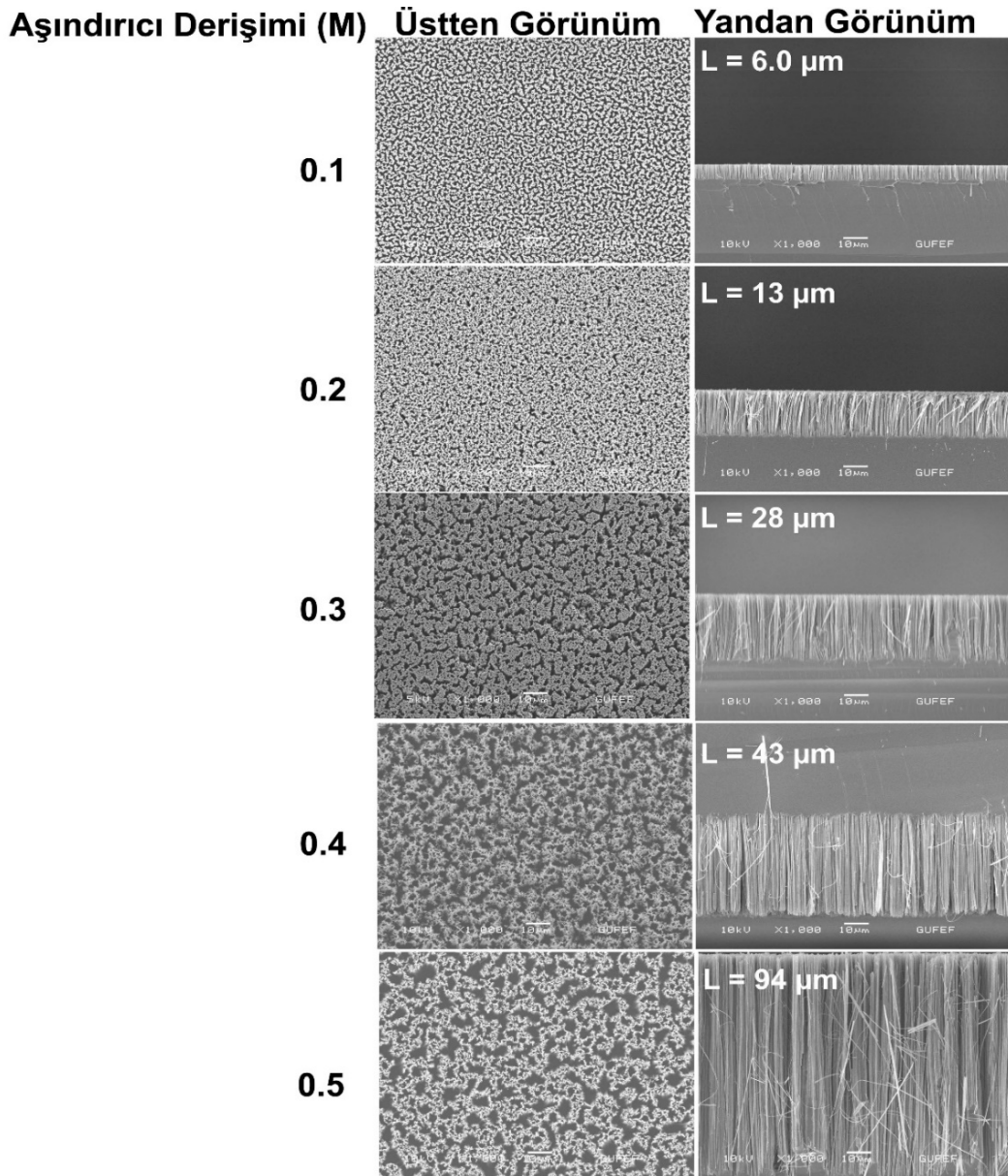
Şekil 4.4. (a) Temiz ve (b) Gümüş nanopartikül kaplı silisyum yüzeylerin SEM görüntüleri.



Şekil 4.5. Farklı aşındırma süreleri ile elde edilen yüzeylerin SEM görüntüleri (Aşındırıcı derişimi: 0.4 M).

Nanotel oluşumunda diğer en önemli parametre aşındırıcı olan H_2O_2 derişimidir. Bu amaç doğrultusunda aşındırma süresi 60 dakikada sabit tutulmuş ve sadece aşındırıcı derişimi (0.1-0.5 M) aralığında değiştirilmiştir. Şekil 4.6’da farklı aşındırıcı derişimi kullanılarak elde edilen yüzeylerin SEM görüntüleri verilmiştir. Aşındırıcı derişimi 0.1 M olduğunda uzunluğu 6.0 μm olan ve yüzey üzerinde oldukça sıkı bir şekilde istiflenmiş olan nanoteller elde edilmiştir. Aşındırıcı derişimi 0.2 M olduğunda yine oldukça sıkı istiflenmiş ve uzunluğu 13 μm ’ye ulaşan nanoteller elde edilmiştir. Aşındırıcı derişimi 0.3 M olduğunda ise yüzeyler üzerinde sıkı istiflenmiş nanoteller yerine kümelenmiş bir

şekilde ve uzunlukları $28\ \mu\text{m}$ olan nanoteller elde edilmiştir. Aşındırıcı derişimi $0.4\ \text{M}$ olduğunda ise tel boyu $43\ \mu\text{m}$ 'ye ulaşmış ve teller yüzey üzerinde uçtan uca birleşerek kümelenmiş bir yapı oluşturmuştur. Aşındırıcı derişimi $0.5\ \text{M}$ olduğunda ise tellerin uzunluğu $94\ \mu\text{m}$ 'ye ulaşmış ve tellerin yüzey üzerinde hem uçtan uca birleşmesi hem de kümelenme sayısında artış olmuştur. Sonuç olarak düşük aşındırıcı derişimlerinde sıkı istiflenmiş kısa nanotel yapısından yüzey üzerinde kümelenmiş uzun tellerin oluştuğu belirlenmiştir.

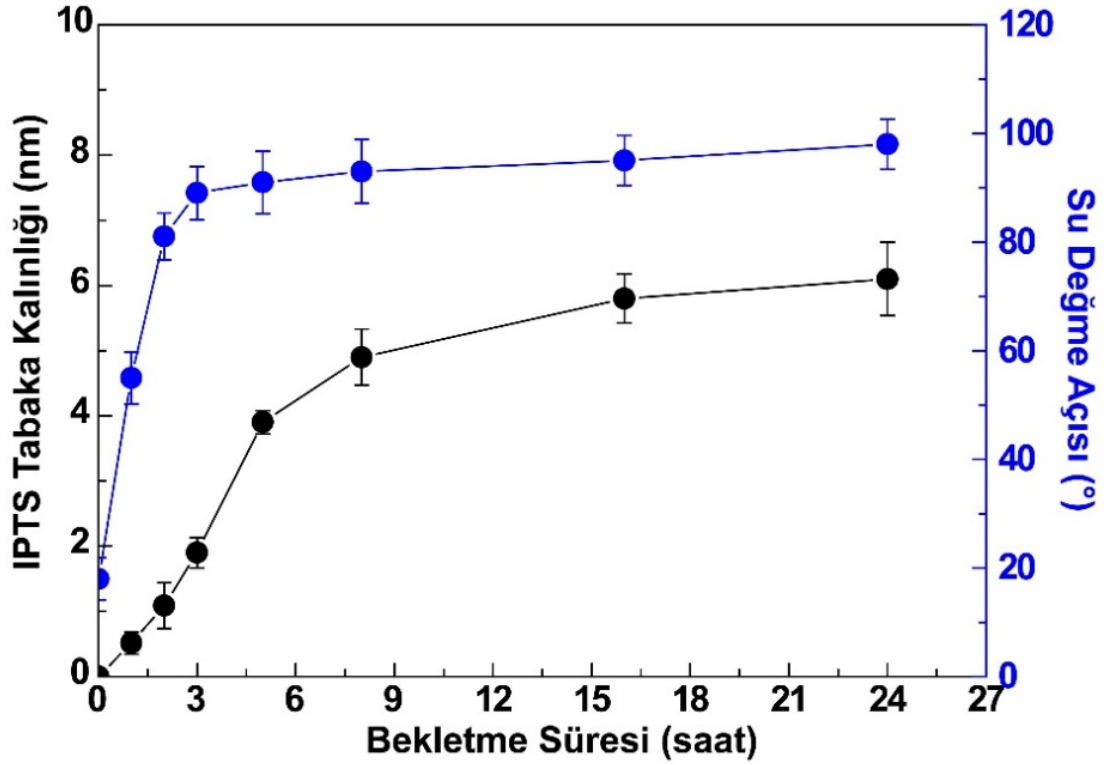


Şekil 4.6. Farklı aşındırıcı derişimi kullanılarak elde edilen yüzeylerin SEM görüntüsü (Aşındırma süresi: 60 dakika).

4.3.1. Silisyum nanoteller üzerine iyodosilan tek tabakaların hazırlanması

Silisyum nanoteller (Si-NT) hazırlandıktan sonra yüzeyler üzerinde ilk olarak 3-iyodopropil trimetoksisilan (IPTS)'nin kendiliğinden düzenlenen tek tabakaları hazırlanarak yüzeyler iyot uç gruplu hale getirilmiştir. Kendiliğinden düzenlenen tek tabakalar yönteminde en önemli parametreler yüzeye bağlanacak olan organosilan molekülünün derişimi ile bağlanma süresidir (Zengin ve Çaykara, 2010, 2011a, 2011b). Bu nedenle Tez kapsamında IPTS molekülünün tek tabaka şeklinde düzenlenmesi için optimum derişim ve süre belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda düz silisyum yüzeyler kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Si-NT yüzeylere uygulanmıştır. Bunun en önemli sebebi elipsometre ile tabaka kalınlığı ölçümünde düz yüzeylerin pürüzlü yüzeylere göre daha doğru sonuç vermesidir. Çünkü elipsometrede kalınlık ölçümü sırasında oluşturulan optik modelde yüzeyin pürüzlülüğü dikkate alınmamaktadır.

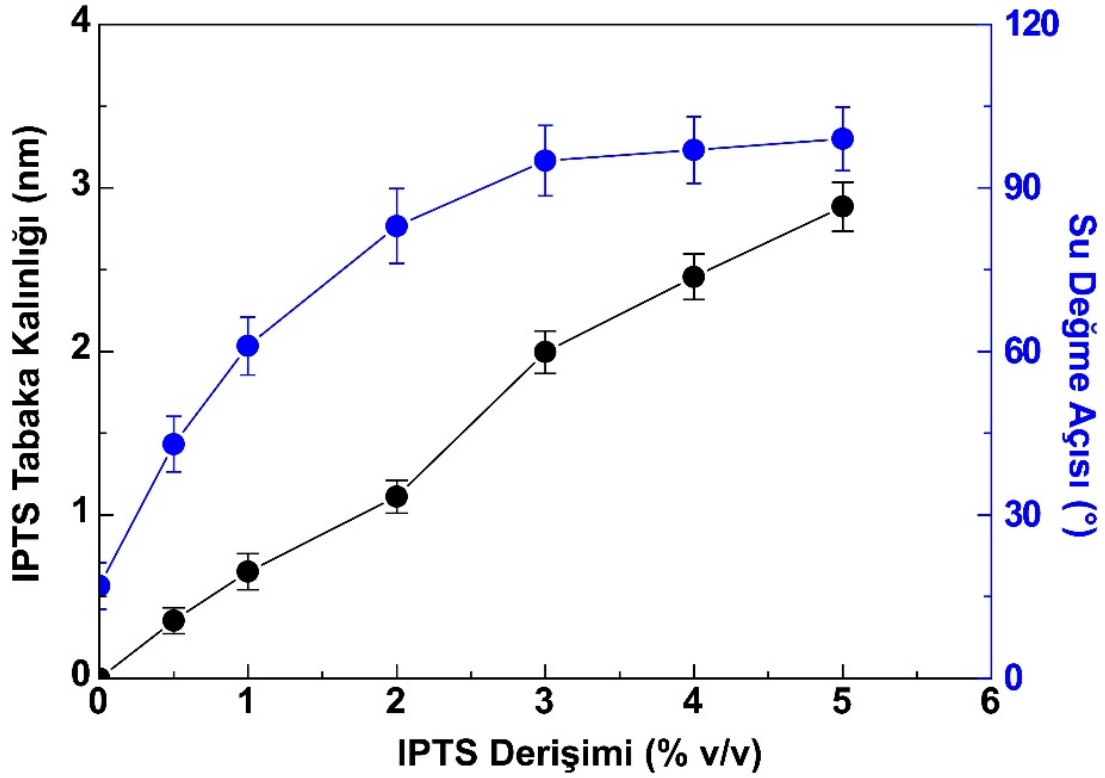
Silisyum yüzeyler saf su ile yıkanıp kurutulduktan sonra yüzey üzerinde oluşan oksit tabakasını uzaklaştırmak ve yüzeylerde IPTS bağlanması için gerekli olan hidroksil gruplarının oluşması için ilk olarak “pirana” çözeltisinde bekletilmiş ve hemen ardından bol saf su ile yıkanarak azot gazı ile kurutulmuştur (Wang ve ark., 2011). Şekil 4.7’de silisyum yüzeylerin, IPTS çözeltisi içerisinde bekletme süresine karşılık su değme açıları ve IPTS elipsometrik tabaka kalınlıklarının değışimi verilmiştir. Bekletme süresinin artışı ile birlikte hem su değme açıları hem de tabaka kalınlıklarında artış meydana gelmiştir. 2 saatlik bekletme süresinde tabaka kalınlığı 1.09 ± 0.28 nm iken yüzeylerin su değme açısı $81.2 \pm 4.2^\circ$ olarak belirlenmiştir. Bekletme süresi 24 saat olduğunda bu değerler sırasıyla 6.1 ± 0.46 nm ve $98.2 \pm 4.64^\circ$ olarak değışmektedir. IPTS molekülüne çok benzeyen sadece uç grubunda amin fonksiyonel grubu bulunan 3-aminopropil trimetoksisilan molekülünün teorik olarak hesaplanan moleküler uzunluğu yaklaşık 1 nm’dir (Petri ve ark., 1999). Bu teorik moleküler uzunluk dikkate alındığında ilk 2 saat sonunda IPTS molekülü silisyum yüzeylerde tek tabaka şeklinde filmler oluştururken bekletme süresinin artması ile IPTS molekülü çoklu tabaka oluşturacak şekilde düzenlenmektedir.



Şekil 4.7. Bekletme süresine ile silisyum yüzeylerin su değme açısı ve elipsometrik tabaka kalınlığının değişimi.

IPTS derişiminin kendiliğinden düzenlenmeye olan etkisi hacimce %0.5-5.0'lik toluen içerisindeki çözeltileri kullanılarak optimum sürede (2 saat) ve oda sıcaklığında silisyum yüzeylerin bu çözeltiler içerisinde bekletilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'de IPTS derişimine karşılık su değme açıları ve tabaka kalınlıklarının değişimi gösterilmektedir. %0.5'lik derişimde yüzey kalınlığı 0.354 ± 0.08 nm iken su değme açısı $43 \pm 5.1^\circ$ 'dir. Derişim arttıkça hem su değme açıları hem de yüzey kalınlıklarında artış vardır. Derişim %2 iken bu değerler sırasıyla $83 \pm 6.85^\circ$, 1.12 ± 0.11 nm ve derişim %5 olduğunda sırasıyla $99 \pm 5.85^\circ$ ve 2.89 ± 0.15 nm değerine ulaşmaktadır. Görüldüğü gibi derişim %2 olduğunda IPTS molekülü tek tabakalı film, derişim çok yüksek olduğunda çok tabakalı (yaklaşık 3 tabaka) film oluşturmaktadır.

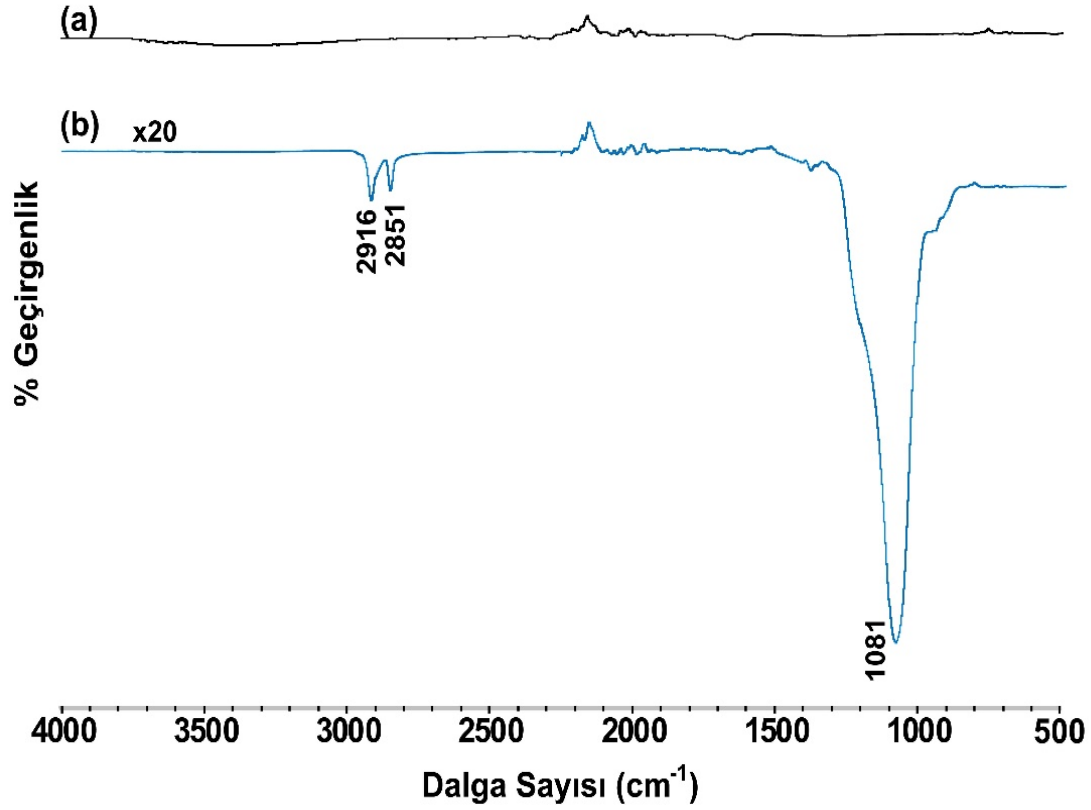
Bekletme süresi ve derişim etkilerinin su değme açıları ve elipsometrik tabaka kalınlığı dikkate alındığında IPTS molekülünün Si-NT yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tekli tabakalarını hazırlayabilmek için %2'lik toluen çözeltisinde 2 saat oda sıcaklığında bekletme sonucu elde edilebilmektedir.



Şekil 4.8. IPTS derişimi ile silisyum yüzeylerin su değme açıları ve elipsometrik tabaka kalınlıklarının değışimi.

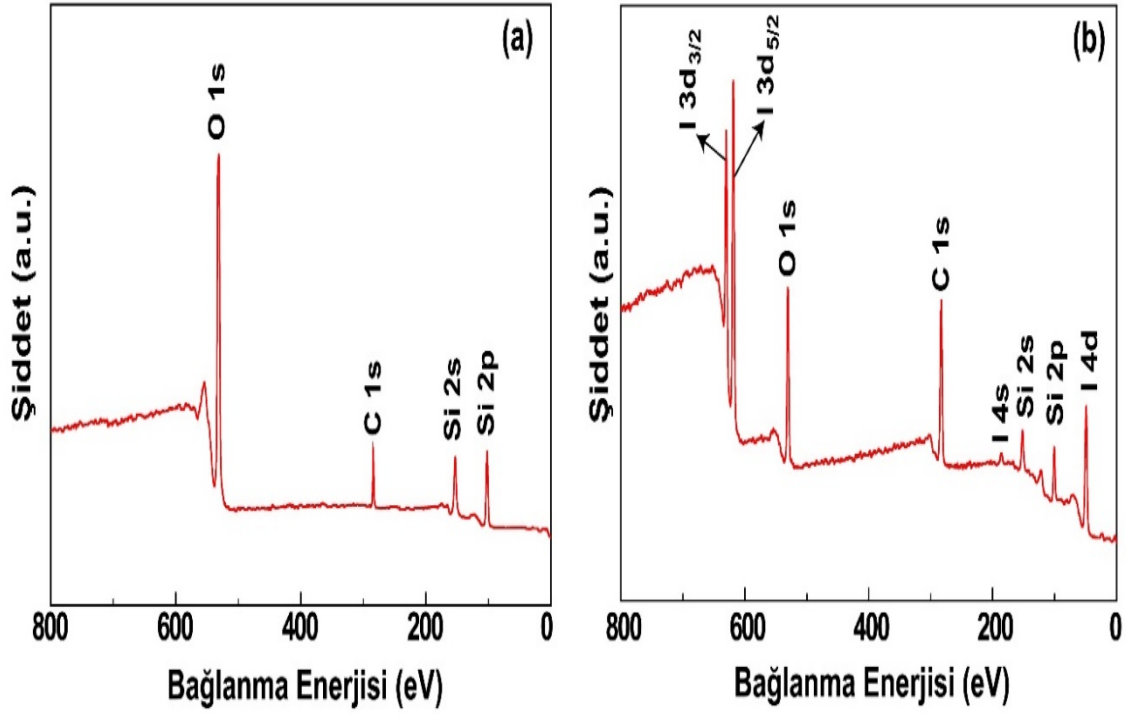
Silisyum yüzeylerine IPTS bağlanmasının optimum koşulları belirlendikten sonra aynı koşullarda Si-NT yüzeyler üzerine de IPTS bağlanmıştır. Bunun için, aşındırma süresi 30 dakika, aşındırıcı derişimi 0.4 M ve boyu 17 μm olan Si-NT tercih edilmiştir.

IPTS bağlı Si-NT yüzeylerin yapısal karakterizasyonunda ilk olarak ATR-FTIR spektroskopisi kullanılmıştır (Şekil 4.9). Temizlenmiş ancak modifiye edilmemiş Si-NT ile IPTS ile modifiye edilmiş Si-NT'ye ait spektrumlar karşılaştırıldığında 1081 cm^{-1} 'de Si-O-Si bağına ait titreşim bandı ile 2916 ve 2851 cm^{-1} 'de gözlenen metilen gruplarına ait asimetrik ve simetrik titreşim bantlarının gözlenmesi Si-NT üzerinde IPTS molekülünün varlığını göstermektedir.



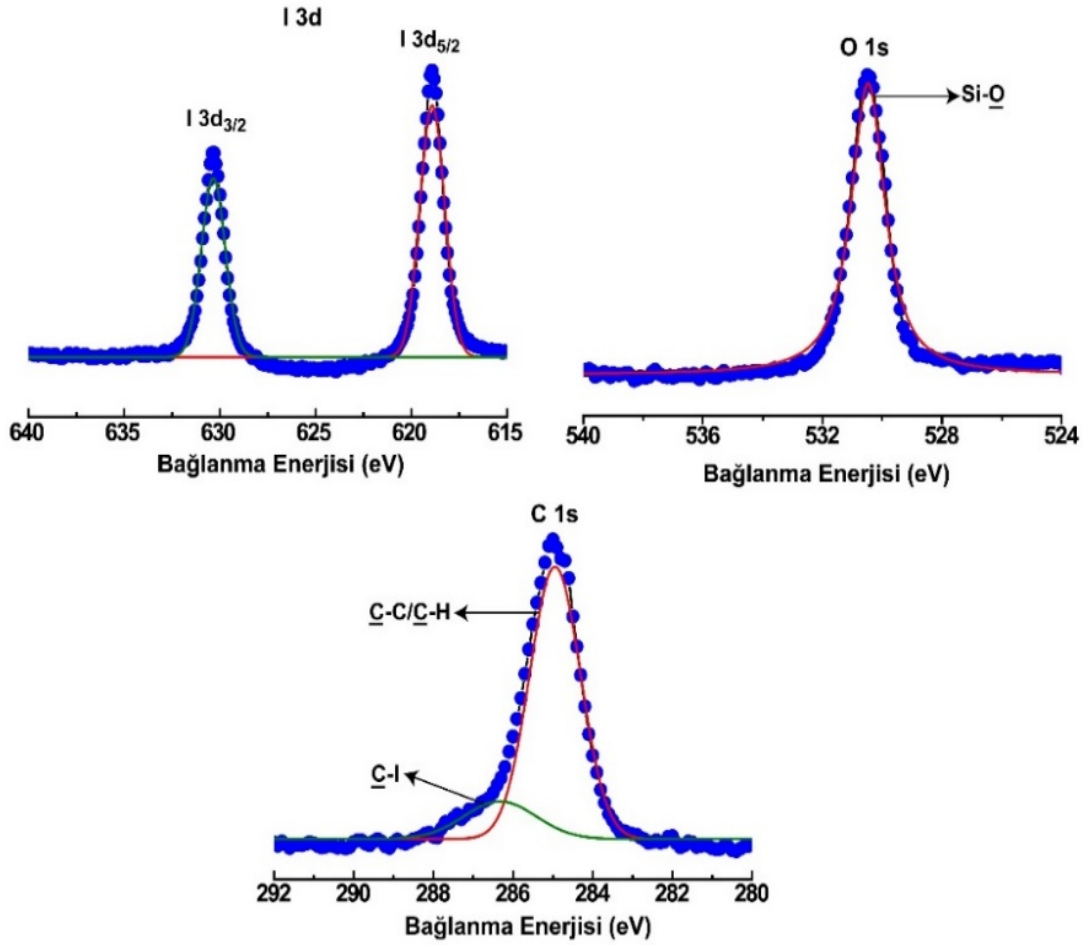
Şekil 4.9. (a) Modifiye edilmemiş ve (b) IPTS bağlı Si NT yüzeylerin FTIR spektrumları.

Si-NT yüzeylerin yapısal karakterizasyonun ardından kimyasal bileşimi X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile belirlenmiştir. Modifiye edilmemiş ve IPTS kaplı Si-NT yüzeylerin XPS spektrumları Şekil 4.10'de gösterilmiştir. Modifiye edilmemiş Si-NT'ye ait XPS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.10a) O 1s, Si 2s ve Si 2p elementlerine ait bağlanma enerjileri sırasıyla 530 eV, 152.9 eV ve 103.1 eV olarak belirlenmiştir. 285.0 eV'de ortaya çıkan karbon piki yüzeylerin analiz sırasında atmosferik kirliliklerden ve/veya karbondioksit adsorpsiyonundan kaynaklanıyor olabilir (Chen ve ark., 2011). Si-NT yüzey IPTS ile modifiye edildikten sonra C1s pik şiddetinin bağlı olarak artması ile iyot elementine ait 630 eV'de $3d_{3/2}$, 620 eV'de $3d_{5/2}$, 186 eV'de 4s ile 50 eV'de 4d piklerinin gözlenmesi Si-NT yüzeyler üzerinde kovalent bağlanmış IPTS molekülünün olduğuna en güçlü kanıt olarak gösterilebilir.



Şekil 4.10. (a) Modifiye edilmemiş ve (b) IPTS bağlı Si-NT yüzeylerin XPS spektrumları.

Si-NT yüzeyler üzerinde kovalent bağlı olan IPTS molekülündeki atomların bağlı miktarı ile aynı tür elementlerin farklı kimyasal çevreye sahip atomların belirlenebilmesi için yüksek çözünürlüklü XPS spektrumu alınmıştır (Şekil 4.11). Şekilden de anlaşılacağı üzere toplam %20.5 bağlı oranında tek bir kimyasal çevreye sahip iyot elementine ait biri 630.3 eV'de $3d_{3/2}$ ile diğeri 619.0 eV'de $3d_{5/2}$ ve toplam %9.8 bağlı oranında tek bir kimyasal çevreye sahip 530.4 eV'de Si-O bağındaki oksijen elementi bulunmaktadır. Biri 286.3 eV'de C-I ve diğeri 284.9 eV'de C-C/C-H olmak üzere toplam %60.8 bağlı oranında karbon elementi bulunmaktadır. Teorik olarak $C/I = 3.0$ bağlı oranı ile deneysel $C/I=2.96$ bağlı oranın birbirine yakın olması IPTS molekülünün teller üzerinde kovalent bağ ile bağlandığının diğeri bir göstergesi olabilir.



Şekil 4.11. IPTS bağlı Si-NT yüzeylerin yüksek çözünürlüklü XPS spektrumları.

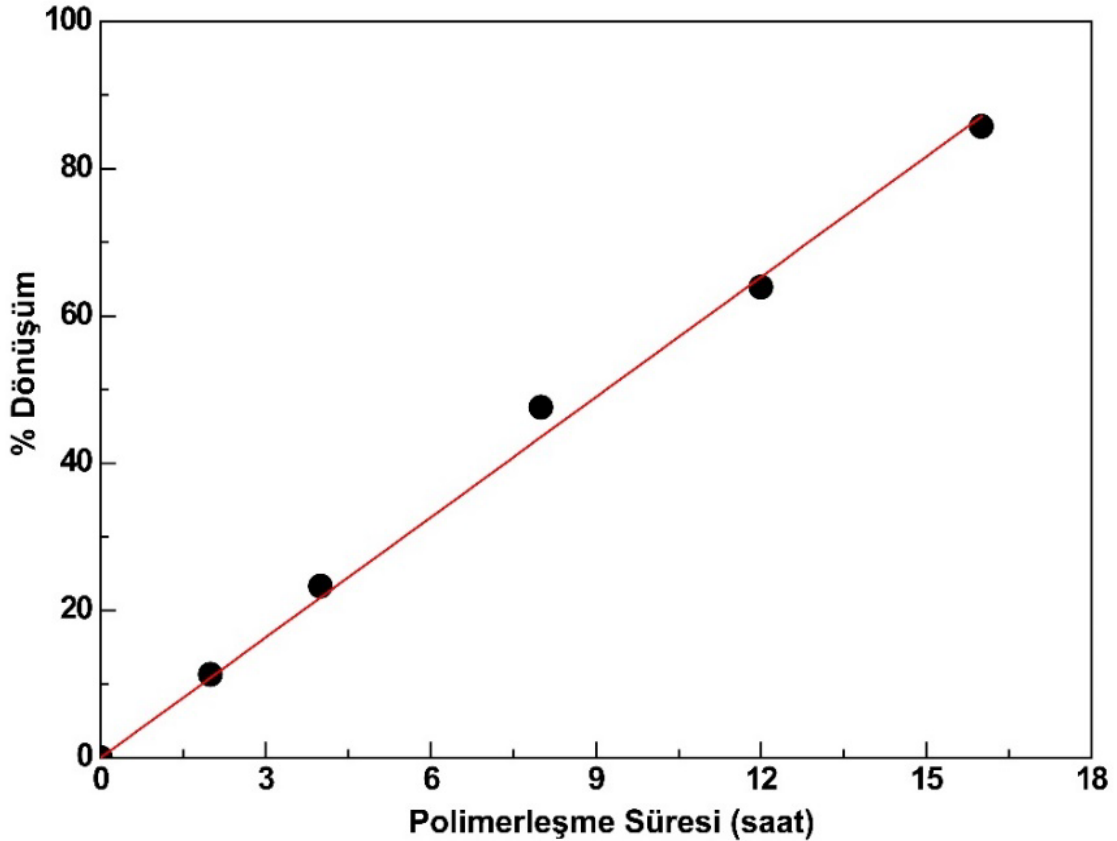
4.3.2. Si-NT yüzeyler üzerinde polimer fırça hazırlanması

Si-NT yüzeyler, IPTS ile modifiye edildikten sonra yüzeyde başlatılan RCTP yöntemiyle PAVAl polimer fırçalar sentezlenmiştir (Si-NT@PAVAL). Polimerleşme tepkimesi hem yüzeyde hem de çözelti içerisinde yürütülmüştür. Bunun için monomer olarak AVAL, polimerleştirmede sönmölenmiş polimer türlerin oluşması için düşük mol kütleli alkil iyodür olarak feniletil iyodür (PE-I), katalizör, aktivatör veya zincir transfer ajanı olarak N-iodo süksinimit (NIS), başlatıcı olarak azobis izobütironitril (AIBN) ve çözücü olarak dimetilformamit (DMF) kullanılmıştır.

$[AVAL]_0/[PE-I]_0/[AIBN]_0/[NIS]_0 = 50/0.5/0.1/0.01$ olacak şekilde DMF stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra bu çözelti eşit hacimli vialler içerisine konulmuştur. Her bir vial daha sonra IPTS bağlı Si-NT yüzeyler konulmuştur. Her bir vial ultrasonik banyoda sonike edilmiş ve aynı zamanda sistemden azot gazı geçirilerek çözünmüş oksijenin uzaklaşması sağlanmıştır. Bu süre sonunda vialler 70 °C'de ısıtılmış yağ

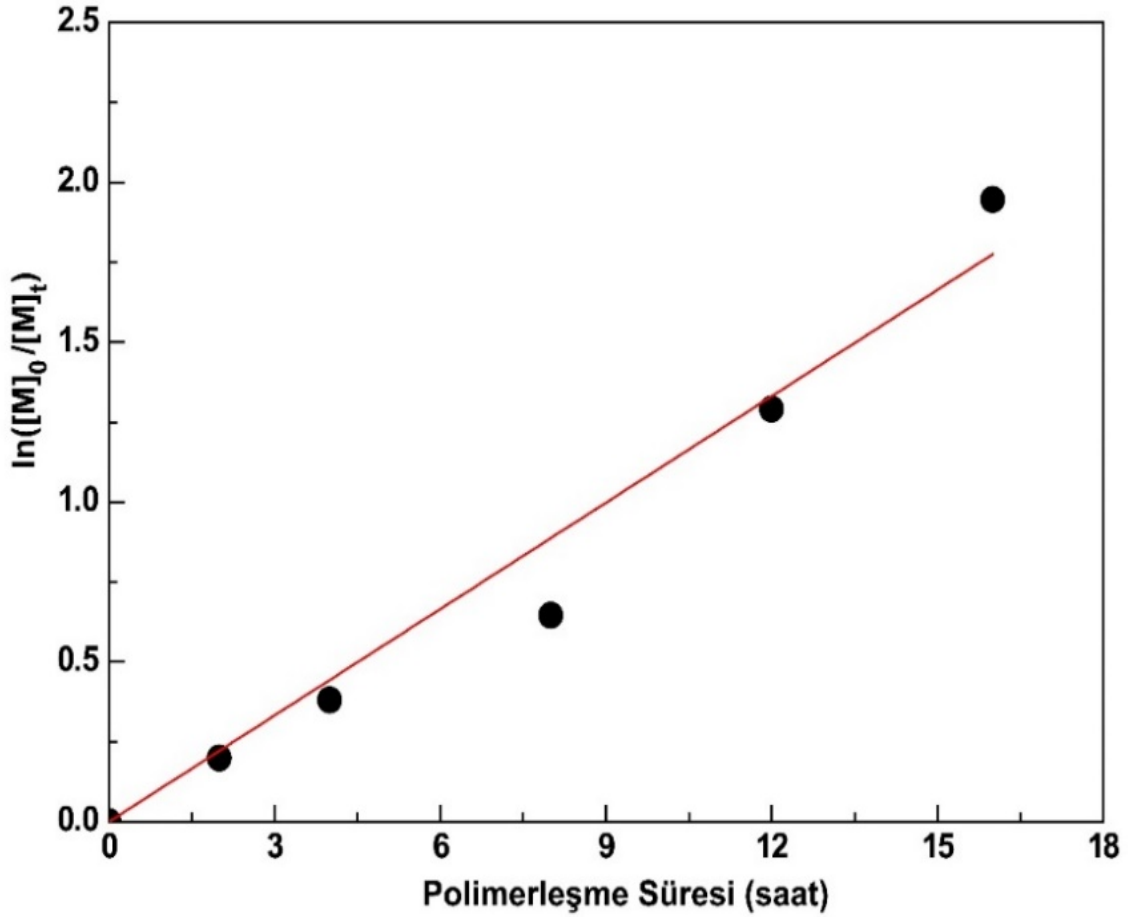
banyosuna konulmuş ve polimerleşme başlatılmıştır. Belirli zaman aralıklarında (2-16 saat) vialler yağ banyosundan alınmış ve sistemin ağzı açılarak ve sıvı azot içine daldırılarak polimerleşmenin aniden durması sağlanmıştır. Örnekler oda sıcaklığına getirildikten sonra çözeltilerden bir miktar alınıp $^1\text{H-NMR}$ analizi için hazır hale getirildikten sonra her bir zaman aralığına ait % dönüşümler belirlenmiştir. Yüzeyler fiziksel olarak bağlanan polimerlerin uzaklaşması için DMF ile 3 kez yıkanmıştır. Tüm yıkama çözeltileri birleştirilmiş ve soğuk hekzan ile çözeltide oluşan polimerlerin çökmesi sağlandıktan sonra jel geçirgenlik kromatografisi (GPC) analizi için hazır hale getirildi. Elde edilen PAVAl kaplı Si-NT yüzeyler azot gazı ile kurutuldu.

RCTP yöntemi ile yapılan polimerleştirmede ilk olarak çözelti kinetiği incelenmiştir. Şekil 4.12’de monomer dönüşümünün zamanla değişimi verilmektedir. Polimerleşme süresi 2-16 saat aralığında değiştiğinde monomer dönüşümü %11.3-85.7 aralığında değişen doğrusal bir grafik elde edilmiştir (korelasyon katsayısı, $R^2 = 0.998$).



Şekil 4.12. Dönüşümün polimerleşme süresince değişimi.

Polimerleşmeye ait semi-logaritmik kinetik eğri incelendiğinde (Şekil 4.13), grafiğin doğrusal olması sebebiyle ($R^2 = 0.987$) polimerleşme kinetiğinin yalancı birinci dereceden kinetiğe uyduğu söylenebilir (Turan ve ark., 2010). Grafiğin eğiminden polimerleşmenin görünen hız sabiti, $k_p^g = 3.1 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ olarak belirlenmiştir. Hem dönüşümün zamanla doğrusal olması hem de semi-logaritmik eğrinin doğrusal olması polimerleşmenin bu koşullar altında kontrollü/yaşayan polimerizasyon olduğunu göstermektedir. Bir başka deyişle polimerizasyonda aktivasyon-deaktivasyon çevriminin çok fazla sayıda olması sonucu ortamdaki aktif türlerin polimerizasyon süresince derişiminin sabit kalarak polimerizasyonun kontrollü bir şekilde gerçekleşmesini sağlamıştır (Li ve ark., 2006)].



Şekil 4.13. Çözelti polimerleşmesine ait yarı-logaritmik kinetik eğrisi.

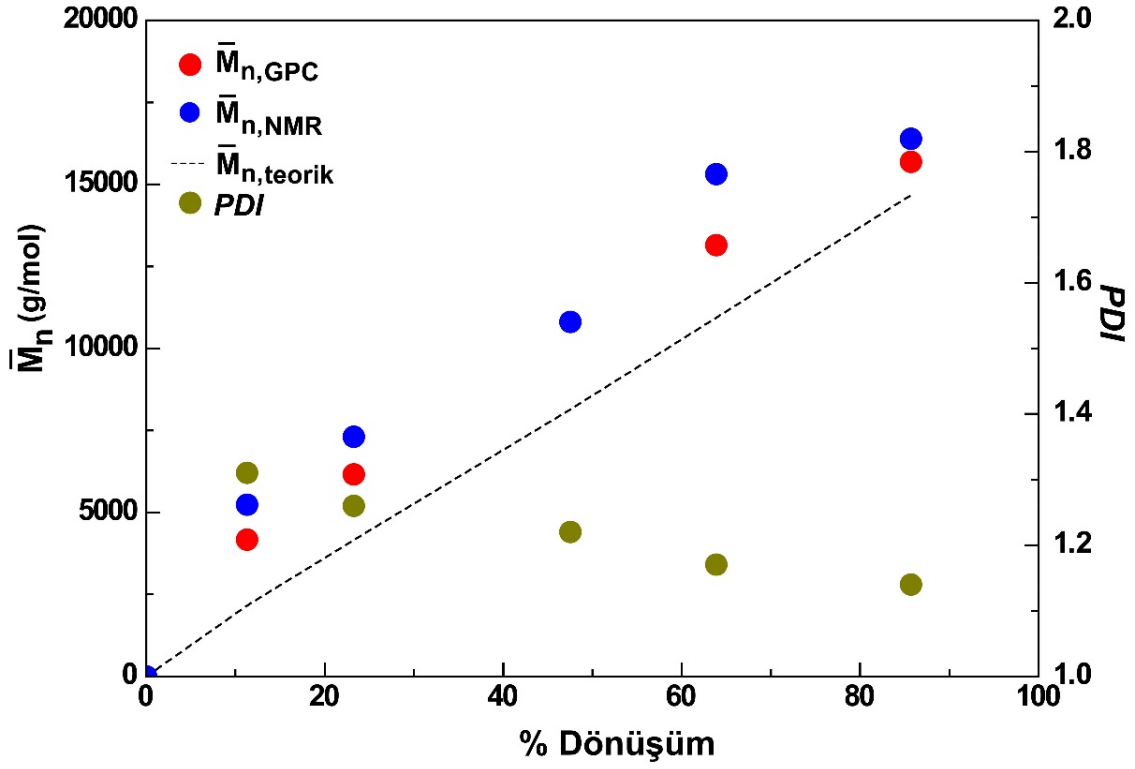
RCTP yöntemiyle sentezlenen polimerlerin teorik mol kütlesi aşağıdaki formül ile hesaplanabilir (Tanishima ve ark., 2014):

$$\bar{M}_{n, \text{teorik}} = \frac{[M]_0}{[A-I]_0 + 2f[I]_0 (1-e^{-kt})} \times C \times M_{\text{monomer}} + M_{A-I} \quad (4.2)$$

Eşitlikteki M_{monomer} ve M_{A-I} sırasıyla monomer ve düşük mol kütleli alkil iyodürün mol kütleleri, $[M]_0$, $[A-I]_0$ ve $[I]_0$ sırasıyla monomer, alkil iyodürün ve başlatıcının başlangıç derişimlerini göstermektedir. Eşitlikteki paydanın sağ tarafında bulunan f başlatıcı etkinliğini ve k_d ise herhangi bir t anındaki başlatıcının bozunma hız sabitini göstermektedir. C ise monomer dönüşümünü simgelemektedir. Serbest radikal başlatıcılarının kullanıldığı ideal yaşayan/kontrollü polimerleşme yöntemlerinde (NMP, RAFT, RCTP) başlatıcının bozunmasıyla oluşan polimer miktarı minimumdur. Bu nedenle oluşan polimer miktarı zincir transfer ajanı miktarı yanında ihmal edilebilir düzeydedir (Wolpers ve ark.,2011). Bu durumda Eş. 4.2 basit olarak Eş. 4.3'e dönüşmüş olur.

$$\bar{M}_{n, \text{teorik}} = \frac{[M]_0}{[A-I]_0} \times C \times M_{\text{monomer}} + M_{A-I} \quad (4.3)$$

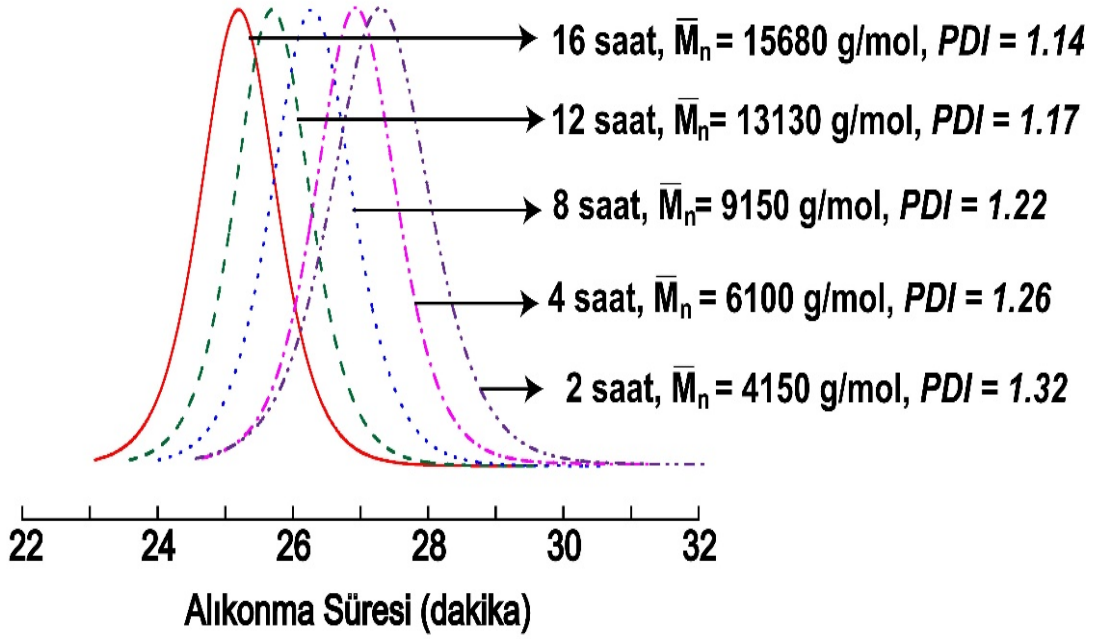
Çözelti ortamında oluşan polimerlerin mol kütlelerinin monomer dönüşümüyle değişimi Şekil 4.14'te gösterilmiştir. Grafik incelendiğinde, $M_{n, \text{teo}}$, $M_{n, \text{NMR}}$ ve $M_{n, \text{GPC}}$ değerlerinin % dönüşümle doğrusal olarak arttığı belirlenmiştir. % dönüşüm yaklaşık olarak 11-86 aralığında değiştiğinde teorik mol kütlesi 2100-14600 g/mol arasında değişirken GPC ve NMR ile elde edilen mol kütleleri sırasıyla 4150-15680 g/mol ve 5230-16380 g/mol arasında değişmektedir. Ayrıca polimerlerin PDI değerleri tüm polimerleşme süresince 1.4'ten küçük olup dönüşümün artmasıyla birlikte PDI değerleri düşmektedir.



Şekil 4.14. Polimerin mol kütlelerinin ve PDI değerlerinin dönüşümle değişimi.

Şekil 4.14 incelenmeye devam edildiğinde GPC'den elde edilen mol kütleleri teorik mol kütlelerinden oldukça farklıdır. Bu durum GPC analizi sırasında kullanılan standartlar ile PAVAl polimer zincirlerinin hidrodinamik çaplarının birbirinden farklı olmasından kaynaklanmış olabilir (Tang ve ark., 2003). Ayrıca NMR ile elde edilen mol kütleleri de teorik mol kütlelerinden farklıdır. Bu durum ise Eş. 4.2'de başlatıcının bozunması ile oluşan polimerlerin ihmal edilip Eş. 4.3 ile hesaplama yapılmasından kaynaklanmış olabilir (Mori ve ark., 2006).

Farklı polimerleşme süreleri sonucu elde edilen GPC kromatogramları Şekil 4.15'te gösterilmiştir. Elde edilen kromatogramlar incelendiğinde tümünün unimodal ve simetrik olduğu görülmektedir. Herhangi bir omuzun ya da kuyruğun görülmemesi RCTP polimerleşmesi sırasında bimoleküler sonlanmaların olmadığını göstermektedir. Ayrıca GPC kromatogramları incelendiğinde mol kütlelerinin artışı ile birlikte daha düşük alıkonma sürelerine doğru kayma vardır. Tüm bu sonuçlar incelendiğinde PAVAl polimerlerinin çözelti içerisinde kontrollü bir şekilde sentezlendiği söylenebilir.

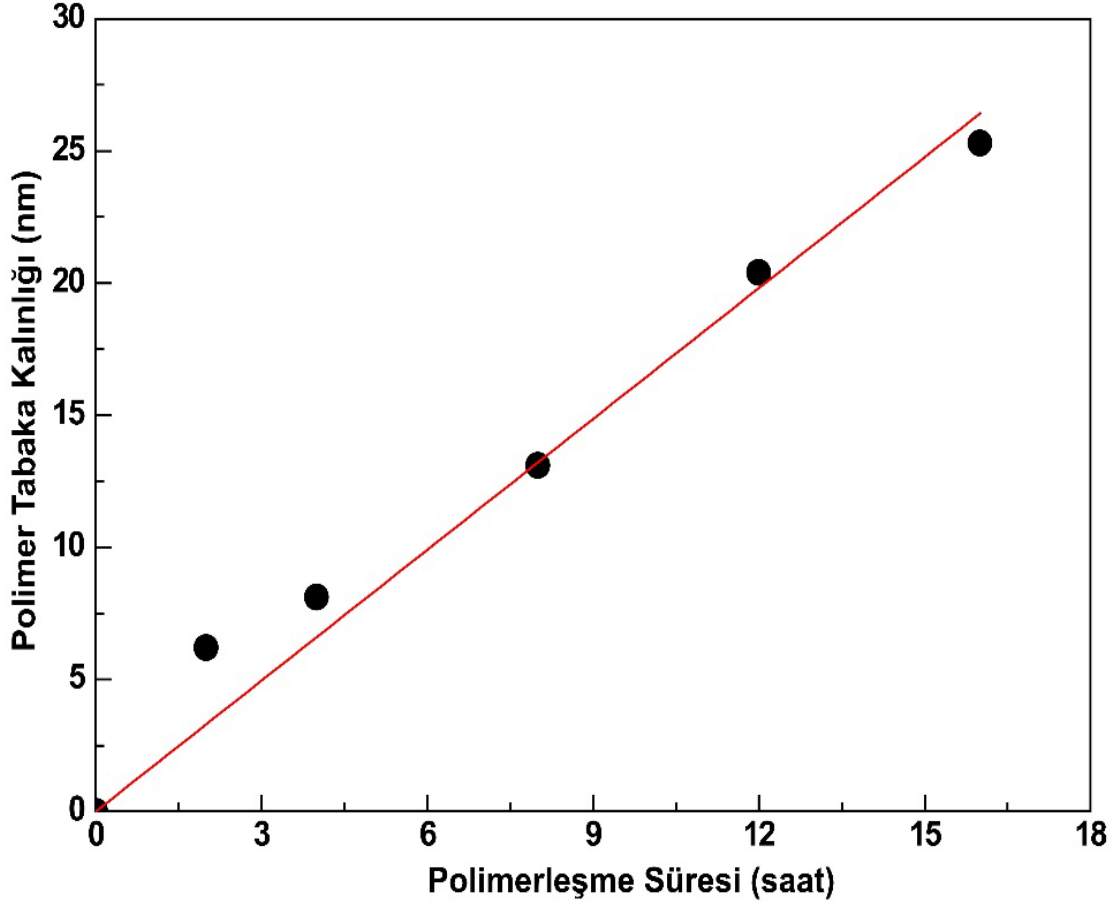


Şekil 4.15. Farklı polimerleşme sürelerine ait GPC kromatogramları.

Si-NT üzerinde IPTS tek tabakaları oluşturulduktan sonra yüzeyler monomer (AVAL), başlatıcı (AIBN), aktivatör (NIS) ve küçük mol kütleli alkil iyodür (PE-I) içeren çözeltiye konulduğunda polimerleşme hem yüzeyde hem de çözeltide aynı anda gerçekleştirilmiş olur. Çözeltide oluşan polimerin standart teknikler ile karakterize edilmesi sonucu yüzey üzerinde bulunan polimerin sıyrılmasına gerek kalmadan yüzeye aşıl原因an polimerler hakkında bilgi verebilir. Küçük yüzey alanında aşıl原因an polimer miktarının çok az olduğu düşünüldüğünde yüzeydeki polimerin sıyrılması ve karakterizasyonu oldukça zordur. Bu nedenle burada yapılan çalışmalar kapsamında yüzey üzerindeki polimerlerin mol kütlelerinin ve heterojenlik indeksinin çözeltideki ile aynı olduğu kabul edilmiştir ve bu kabul literatür ile uyum içerisindedir (Öztürk ve ark., 2010; Turan ve Çaykara, 2010, 2011).

Yüzeyde başlatılan RCTP için yüzeyler kurutulduktan sonra ilk olarak elipsometrik kalınlıklar ölçülmüştür. Şekil 4.16'da polimer tabaka kalınlığının zamanla değişimi verilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi polimerizasyon süresi ile birlikte polimer tabaka kalınlığı doğrusal olarak artmış ($R^2=0.990$) ve 16 saatlik polimerizasyon süresinde yaklaşık olarak 25 nm kalınlığında polimer tabakası elde edilmiştir. Görüldüğü gibi kalınlığın zamanla değişimi çözelti kinetiğindeki dönüşümün zamanla değişimine benzer bir eğilim göstermektedir. Bu benzer davranış "yüzey kinetiği ile çözelti kinetiği

benzerdir” kabulünün geçerli olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte polimer tabaka kalınlığının zamanla doğrusal değişimi yüzey üzerinde de polimerleşmenin kontrollü/yaşayan karakterde olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.16. Polimer tabaka kalınlığının polimerleşme süresince değişimi.

Elipsometrik kalınlıklardan yararlanılarak yüzeye adsorbe olmuş (makro)moleküllerin kantitatif analizi yapılabilir (Zdyrko ve ark., 2003). Yüzeye adsorbe olmuş molekül derişimi (yüzey kaplama miktarı), Γ (mg/m^2), elipsometrik kalınlık, h (nm) ve (makro)molekülün yoğunluğu, ρ (g/cm^3 , P(AVAL) için $1.15 \text{ g}/\text{cm}^3$) olmak üzere aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

$$\Gamma = h \rho \quad (4.4)$$

Yüzey yoğunluğu (makromolekül için zincir yoğunluğu), σ (zincir/ nm^2), N_A : Avagadro sayısı, M (g/mol) mol kütlesi olmak üzere aşağıdaki eşitlikle hesaplanır :

$$\sigma = \Gamma NA 10^{-21} / M = (6.023 \times 10^{23} \times 100) / M \quad (4.5)$$

Eş. 4.5'te de görüldüğü gibi polimerin mol kütlesine karşılık elipsometrik kalınlıklar grafiğe geçirildiğinde, elde edilen eğrinin eğiminden makromoleküllerin yüzey üzerindeki zincir yoğunluğu hesaplanabilir.

Yüzeye adsorbe olmuş makromoleküller arası uzaklık, D (nm), olmak üzere aşağıdaki eşitlikle hesaplanır:

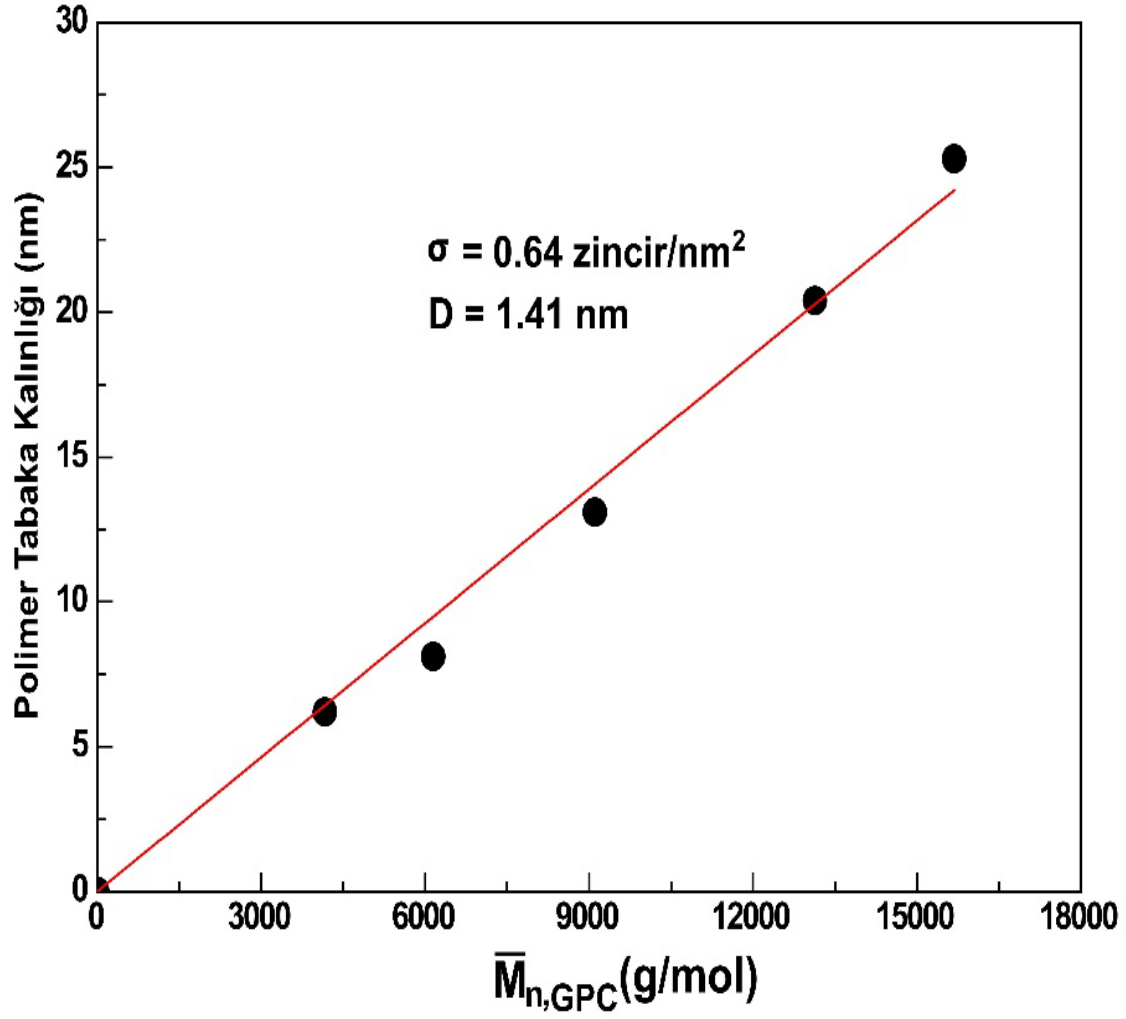
$$D = (4/\pi\sigma)^{1/2} \quad (4.6)$$

İyi bir çözücünde bulunan polimerin zincir konformasyonu jirasyon yarıçapı, R_g (nm) ile makro moleküller arası uzaklık karşılaştırılarak belirlenebilir (Cochran ve ark., 2003) :

$$R_g = b(\overline{DP_n}/6)^{3/5} \quad (4.7)$$

Burada $\overline{DP_n}$ polimerleşme derecesi, b istatistiksel segment uzunluğunu (AVAL için 0.3 nm) simgelemektedir.

Elipsometrik kalınlıklardan ve $M_{n,GPC}$ değerlerinden yararlanılarak yüzeyden aşılınmış polimer fırçaların zincir yoğunluğu Eş. 4.5 ile bulunabilir. Şekil 4.17'de $M_{n,GPC}$ değerlerine karşılık elipsometrik kalınlık ile değişimi gösterilmektedir. Grafikten anlaşılacağı üzere polimerin mol kütlesi ile elipsometrik kalınlıklar doğru orantılı olarak değişmektedir. Grafiğin eğimi bulunduktan sonra Avagadro sayısı ve serbest polimerin öz kütlesi ile çarpıldığında makromoleküllerin yüzey üzerindeki zincir yoğunluğu 0.64 zincir/nm² olarak bulunmuştur. Bununla birlikte Eş. 4.6 kullanıldığında aşılınmış iki makromolekül arasındaki uzaklık ise 1.41 nm olarak hesaplanmıştır. İki makromolekül arasında uzaklığın oldukça düşük olması polimer tabakasının yüzey üzerinde oldukça sıkı bir şekilde istiflendiğini göstermektedir.



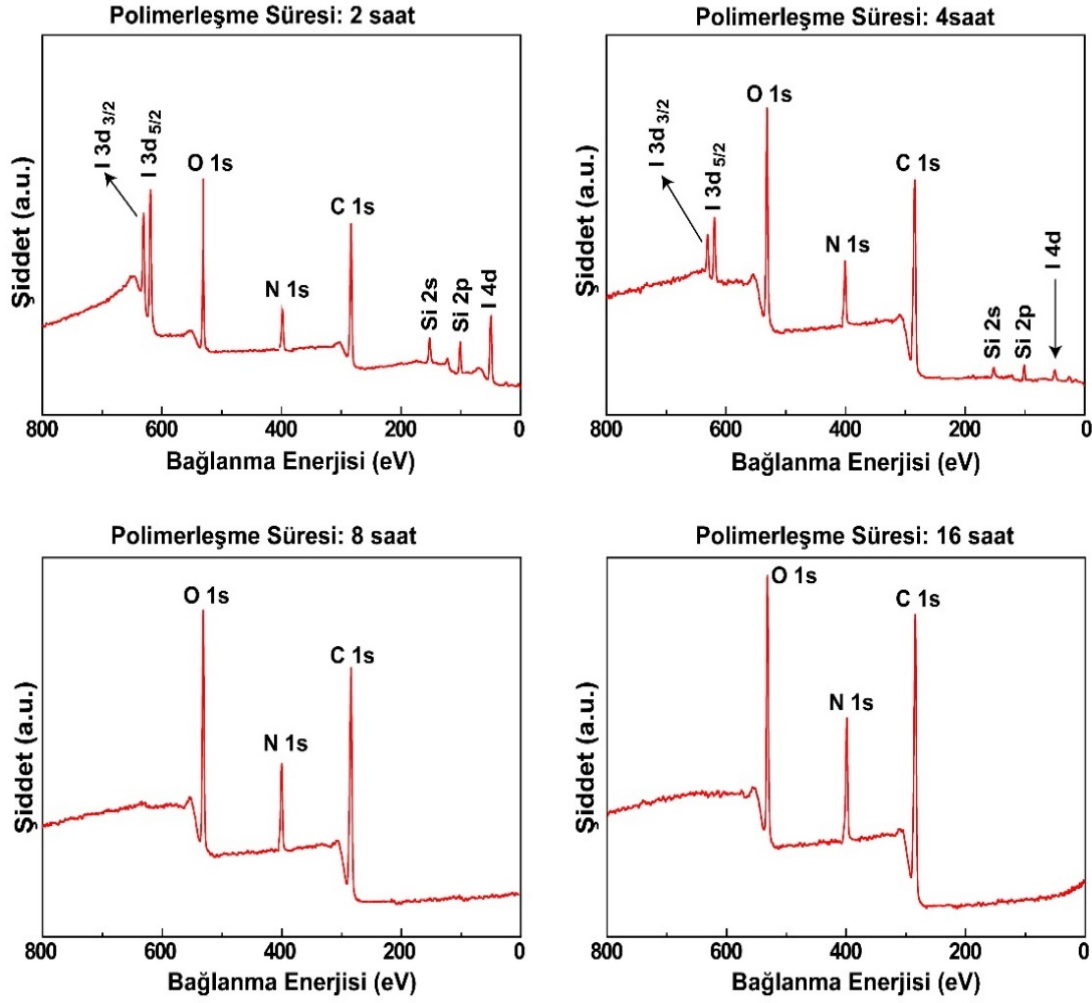
Şekil 4.17. Elipsometrik kalınlığın polimerin mol kütlesi ile değişimi.

Polimerizasyon süresi boyunca zincir yoğunluğu ile makromoleküller arası uzaklık değişmezken yüzey kaplama miktarı ve $D/2R_g$ oranı polimerizasyon süresi boyunca değişmektedir. Polimerleşme süresinin artmasıyla birlikte yüzey derişimi (ya da yüzey kaplaması) $7.12-29.1 \text{ mg/m}^2$ aralığında değişmektedir. Burada önemli olan yüzey üzerinde bulunan polimerlerin konformasyonu hakkında bilgi veren $D/2R_g$ oranıdır. Eğer bu oran 1'den küçükse yüzeydeki polimerlerin fırça konformasyonunda, 1'den büyük olursa mantar konformasyonunda olduğu bilinmektedir (Chen ve ark., 2017). Çizelge 1'den de görüldüğü gibi tüm zaman aralıklarında yüzeyde bulunan polimerler fırça konformasyonundadır.

Çizelge 4.1. Aşılama parametrelerinin polimerleşme süresi ile değişimi.

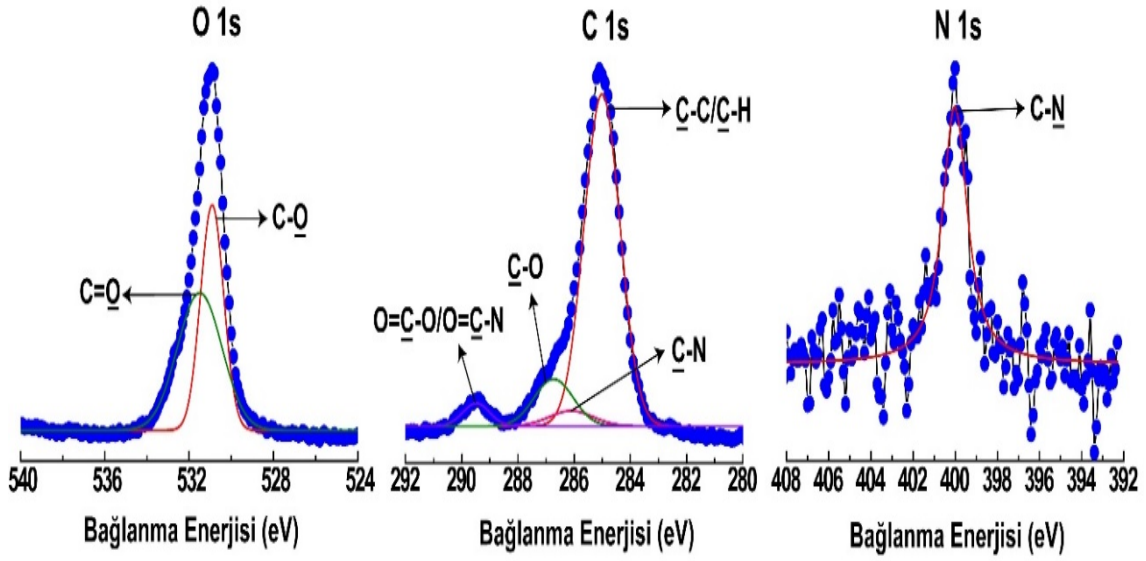
Polimerleşme Süresi (saat)	Γ (mg/m ²)	$D/2R_g$
2	7.12	0.89
4	9.33	0.80
8	15.1	0.64
12	23.4	0.51
16	29.1	0.46

Şekil 4.18’de farklı polimerleşme sürelerine ait XPS spektrumları verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde PAVAl bağılı Si-NT üzerinde I 3d_{3/2}, I 3d_{5/2}, O 1s, N 1s, C 1s, Si 2s, Si 2p ve I 4d elementlerine ait bağlanma enerjileri sırasıyla yaklaşık olarak 630 eV, 619eV, 531 eV, 400 eV, 285 eV, 153 eV ve 103 eV ve 49 eV olarak belirlenmiştir. Polimerleşme süresinin artmasıyla birlikte karbon, oksijen ve azot elementlerinin pik şiddetlerinde bağıl olarak artış var iken I, Si elementlerinin pik şiddetlerinde bağıl olarak azalma meydana gelmiştir. Bu durum polimerleşme süresi ile birlikte yüzeyler üzerinde aşılama yoğunluğunun artmasının doğal bir sonucudur. Polimerleşme süresi 8 ve 16 saat olduğunda ise yüzeylerde iyot elementi tayin edilememiştir. Bu durum artan polimerleşme süresi ile birlikte iyot elementinin bağıl atomik derişiminin XPS ile tayin edilemeyecek kadar düşük olmasından kaynaklanmış olabilir (Kodama ve ark., 2014). Bununla birlikte artan polimerleşme süresi ile birlikte silisyum elementi de tayin edilememiştir. Bu durum yüzeylerdeki polimer tabaka kalınlığının X-ışınının maksimum girebildiği kalınlık olan 10 nm’den büyük olmasından kaynaklanmaktadır (Kitano ve ark., 2009). Nitekim polimerleşme süresi 8 ve 16 saat olduğunda polimer fırçaların elipsometrik kalınlıkları sırasıyla 13.1 ve 25.3 nm olarak belirlenmiştir.



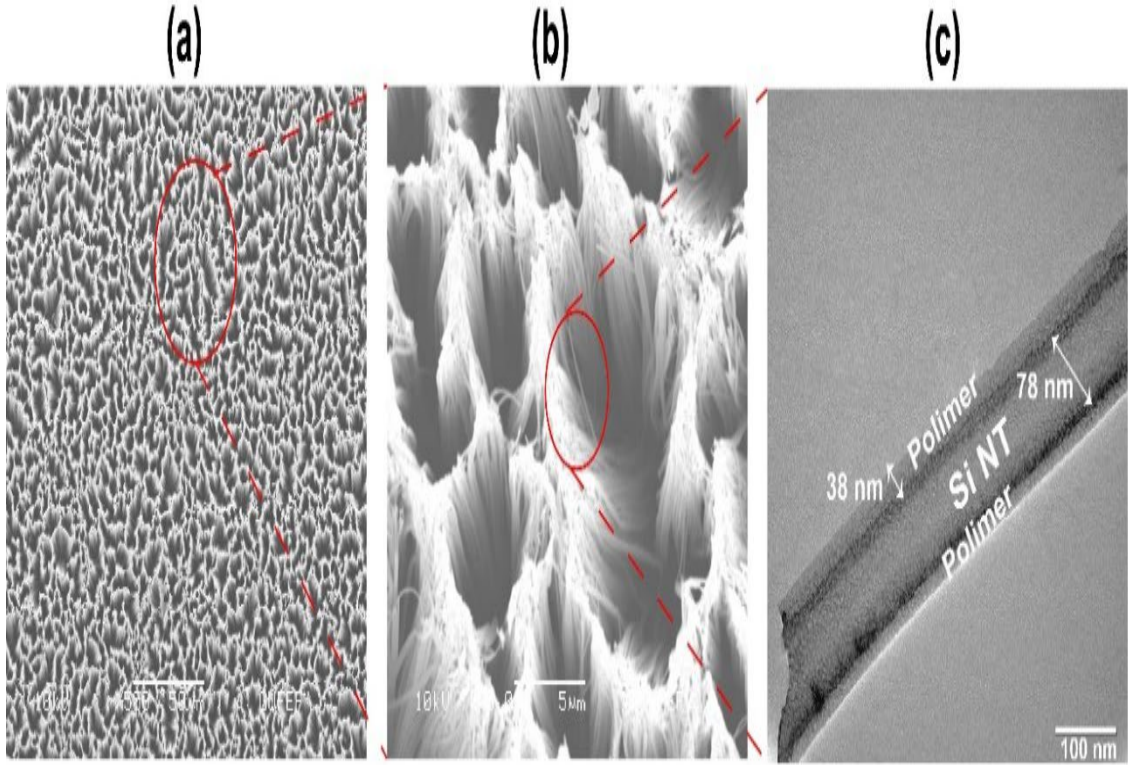
Şekil 4.18. Farklı polimerleşme sürelerine ait PAVAL kaplı Si NT'ye ait XPS spektrumları.

Şekil 4.19'da polimerleşme süresinin 16 saat olduğu durumdaki PAVAL kaplı Si-NT yüzeylerin yüksek çözünürlük XPS spektrumu verilmiştir. Spektrumdan da görülebileceği biri 531.4 eV'de $\text{C}=\text{O}$ ve 530.8 eV'de $\text{C}-\text{O}$ ($\text{Si}-\text{O}$) olmak üzere iki farklı kimyasal çevreye sahip oksijen elementi bulunmaktadır. Karbon elementi için 289.5 eV, 286.7 eV ve 286.1 eV ve 285.0 eV olmak üzere sırasıyla $\text{O}=\text{C}=\text{O}/\text{N}-\text{C}=\text{O}$, $\text{C}-\text{O}$, $\text{C}-\text{N}$ ve $\text{C}-\text{C}/\text{C}-\text{H}$ dört farklı kimyasal çevreye sahip karbon elementi bulunmaktadır. Bununla birlikte 400.0 eV'de tek bir kimyasal çevreye sahip azot elementinin bulunması yüzeyler üzerinde polimerleşmenin gerçekleştirildiğinin en güçlü kanıtıdır.



Şekil 4.19. Polimer fırçalara ait yüksek çözünürlük XPS spektrumları (Polimerleşme süresi: 16 saat).

Polimerleşme süresi 16 saat olduğunda silisyum yüzeylerin SEM görüntüsü ile TEM görüntüsü Şekil 4.20’de verilmiştir. Düşük büyütme ve yüksek büyütme SEM görüntüleri incelendiğinde (Şekil 4.20a ve b) yüzeydeki tellerin uç uca birleşme eğilimi göstermiştir. Bu durum yüzeyler üzerinde yüksek aşılama yoğunluğuna (29.1 mg/m^2) sahip polimerlerin olmasının doğal bir sonucudur. Bununla birlikte TEM görüntüsü incelendiğinde yaklaşık olarak 78 nm genişliğinde Si-NT üzerinde yaklaşık olarak 38 nm polimer tabakası görülmektedir. Sonuç olarak SEM ve TEM analizleri de nanoteller üzerinde polimerleşmenin gerçekleştiğini çok net bir şekilde ortaya koymaktadır. Bununla birlikte elipsometrik kalınlık ile TEM’den elde edilen kalınlık arasında farklılık bulunmaktadır. Elipsometrik ölçümler Si/SiO₂/organik tabaka/hava elipsometrik modeli kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Oluşturulan model içerisinde yüzey pürüzlülüğü dikkate alınmamıştır. Bu nedenle bu çalışma kapsamında elde edilen kalınlık değerleri kesin kalınlık değil etkin kalınlık olarak düşünülmelidir. Bu doğrultuda silisyum yüzeylerin elipsometrik kalınlık değerlerinin TEM’den elde edilen kalınlık değerlerinden düşük olması optik modelde yer almayan pürüzlülüktен dolayı kaynaklanmış olabilir.



Şekil 4.20. Polimer fırça aşılannmış yüzeylerin (a) Düşük büyütme, (b) Yüksek büyütme SEM görüntüleri ile (c) TEM görüntüsü.

4.4. PAVAL@Si NT Üzerine prob ss-DNA'nın Kovalent Bağlanması

İnsan papilloma virüs (İPV) DNA'sının fonksiyonel yüzeyler üzerine bağlanması için, PAVAL bağlı Si NT'lere ilk olarak İPV'yi tanıyacak prob ss-DNA'nın bağlanması gerekmektedir. Bu amaçla kullanılan prob ss-DNA dizilimi aşağıdaki gibidir:

- *prob ss-DNA*: 5'-NH₂-GAG GAG GAG GAT GAA ATA GAT GGT-R6G-3'.

Bir ucu amin fonksiyonel diğer ucu ise Rhodamin 6G (Rh6G) ile modifiye edilmiş olan prob ss-DNA ticari olarak satın alınmıştır. Amin grubu ile modifiye edilmesinin sebebi PAVAL fırçaların asılı gruplarında bol karboksilik asit olması nedeniyle prob ss-DNA'nın yüzeylere amitleşme reaksiyonu ile kovalent bağlanmasını gerçekleştirmektir. DNA diziliminin diğer ucunun R6G ile modifiye edilmesinin sebebi ise, çoğu boyar madde de olduğu gibi R6G'nin hem SERS aktif olması hem de floresans özelliğinin olmasındandır. Bu özellikler nedeniyle prob ss-DNA bağlanma koşullarının (burada sadece başlangıç derişimi ve adsorpsiyon süresi incelenmiştir) hem floresans hem de SERS ile kolaylıkla takip edilmesini sağlamıştır.

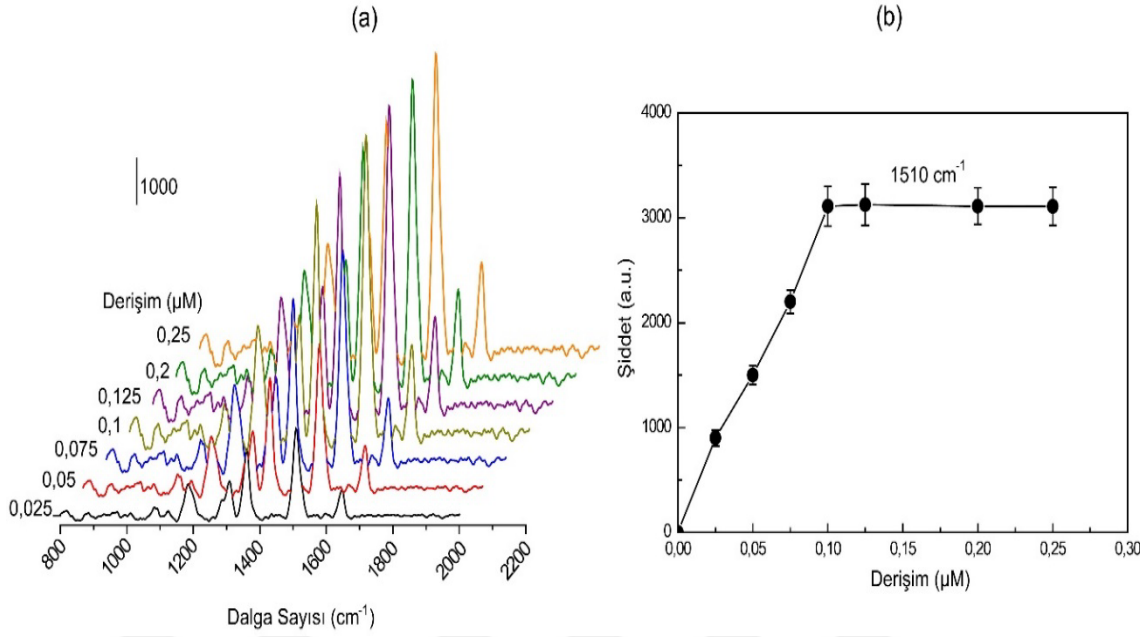
PAVAL@Si NT üzerine prob ss-DNA bağlanması için ilk olarak serbest karboksilik asit gruplarının amin gruplarına karşı ilgisini artırmak için karboksilik asit gruplar N-hidroksisüksinimit (NHS) esterlerine dönüştürülmüştür. Bunun için 1 cm x 1 cm ebatlarındaki PAVAl@Si NT yüzeyler 5 ml, molar oranı 0.5 olan EDC/NHS içeren 0.1 M fosfat tamponunda (PBS, pH 7.4) 2 saat boyunca bekletildikten sonra yüzeyler çözeltiden alınıp bol tampon çözeltisi ile yıkanıp azot gazı ile kurutulmuştur. Bu aşamadan sonra prob ss-DNA bağlanmış ve başlangıç derişimi ve adsorpsiyon süresinin etkisi gibi optimum bağlanma koşulları incelenmiştir.

4.4.1. Prob ss-DNA derişiminin etkisi

Hazırlanan herhangi bir DNA sensöründe hassas ve tekrarlanabilir sonuçlar alınabilmesi için DNA iplikçiklerinin yüzeylere bağlanmasında optimum koşulları belirlemek en kritik aşamalardan birisidir. Özellikle prob DNA iplikçiklerinin yüzeyler üzerinde en düzgün şekilde kovalent bağlanması sağlandığı takdirde hedef DNA iplikçiklerinin de düzgün bir şekilde bağlanmasına yol açacak ve böylece hassasiyet ve tekrarlanabilirlik artacaktır (Subramanian, 2007).

Optimum prob ss-DNA derişiminin belirlenmesi amacıyla yüzeyler farklı derişimlerde (0.0025-0.25 μ M) prob ss-DNA içeren pH 7.4 fosfat tamponunda oda sıcaklığında ve karanlıkta 24 saat boyunca bekletilmiştir. Daha sonra yüzeyler üzerinde fiziksel olarak bağlanan DNA iplikçiklerinin uzaklaştırılması için yüzeyler PBS yıkama tamponu (10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄, 0.3 M NaCl, ve pH = 7.4) ile üç kez yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutulmuştur.

Yüzeyler üzerine prob ss-DNA bağlandıktan sonra yüzeylerin uç grubunda R6G bulunmaktadır. Herhangi bir molekülün SERS ile takip edilebilmesi için hem molekülün hem de yüzeylerin SERS aktif olması gerekmektedir. Bu nedenle yüzeyler üzerine 10 μ L gümüş nanopartikül damlatılmış (Zengin ve ark., 2015) ve yüzeyler oda sıcaklığında kurutulmaya bırakılmıştır. Şekil 4.21’de R6G modifiyeli prob ss-DNA molekülüne ait SERS spektrumları ile SERS şiddetinin prob ss-DNA derişimi ile değişimi verilmiştir.

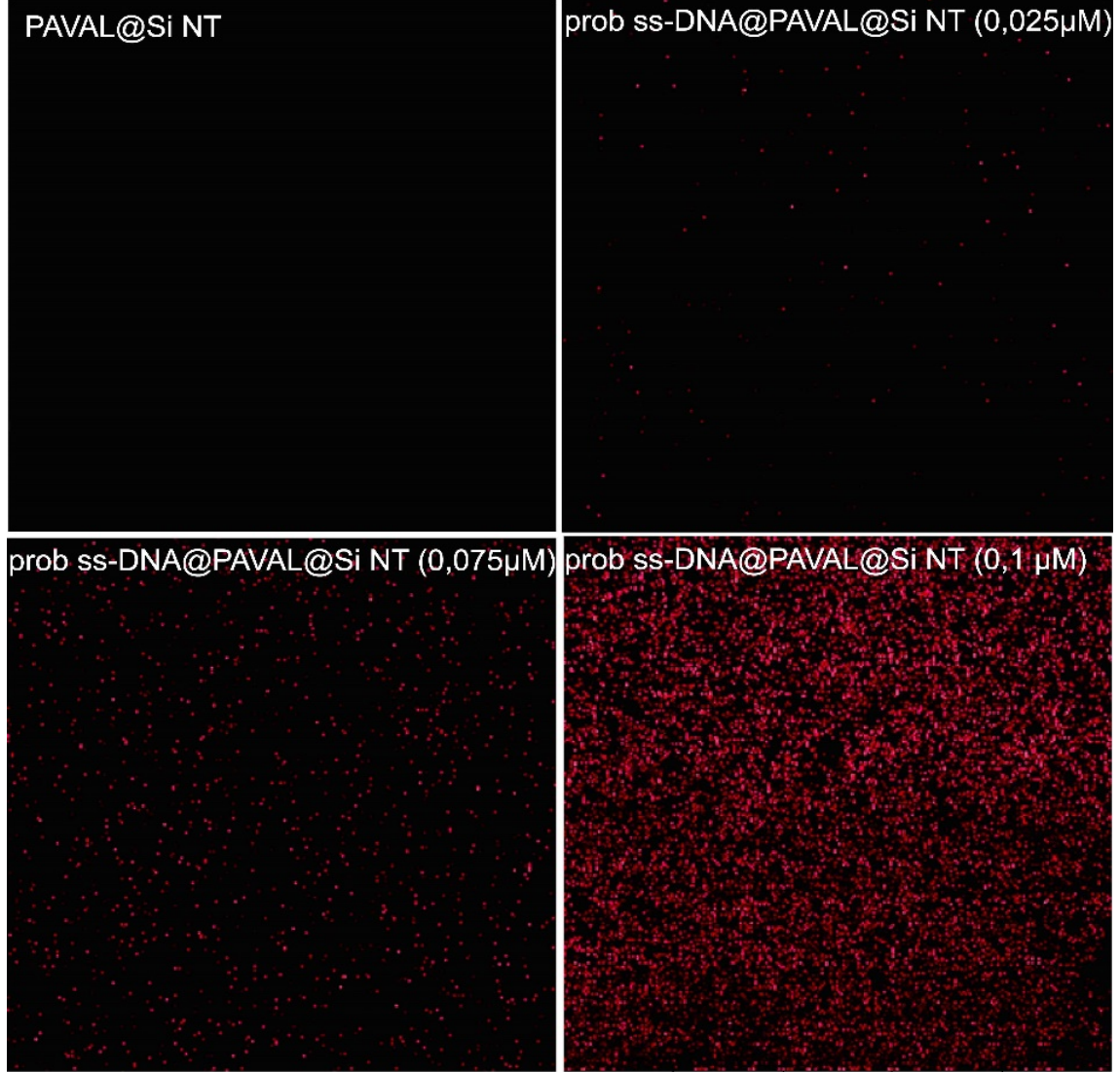


Şekil 4.21. (a) R6G modifiye prob ss-DNA derişimlerine karşılık elde edilen SERS spektrumları ve (b) 1510 cm^{-1} referans alınarak farklı prob ss-DNA derişimlerine karşılık SERS şiddetindeki değişim.

Şekil 4.21a incelendiğinde tüm prob ss-DNA derişimlerinde R6G'nin karakteristik tüm bandları görölmektedir (Wang ve ark., 2012). Bu bandlardan en önemlileri, 1510 cm^{-1} dalga sayısında C-C halka gerilmesine ve 1647 cm^{-1} dalga sayısında C-N gerilmesine karşılık gelen saçılma bandının görölmesi tüm derişimler için prob ss-DNA iplikçiklerinin yüzeyler üzerine kovalent bağlandığının göstergesidir. Spektrumlar incelendiğinde derişim artması ile birlikte Raman saçılma miktarlarında artış meydana gelmektedir. Spektrumlarda saçılma şiddeti bakımından en baskın band olan C-C halka gerilmesi (1510 cm^{-1}) referans alınıp derişime karşılık grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.21b). Grafik incelendiğinde prob ss-DNA derişimi arttıkça SERS şiddetinde de artış meydana gelmiştir. Bununla birlikte derişim $0.1 \mu\text{M}$ 'dan daha fazla olduğunda SERS şiddetinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu durum yüzeylerin prob ss-DNA bakımından doygunluğa ulaştığı söylenebilir. Sonuç olarak prob ss-DNA'nın yüzeylere bağlanabilmesi için optimum derişimin $0.1 \mu\text{M}$ olduğu anlaşılmaktadır.

R6G modifiyeli DNA iplikçiği bağlı yüzeyler üzerine gümüş nanopartikül damlatılmadan boyar maddenin floresans olma özelliğinden dolayı yüzeyler aynı zamanda floresans mikroskobu ile de takip edilebilir (Wang ve ark., 2005). Şekil 4.22'de farklı DNA derişimlerine karşılık elde edilen floresans görüntüleri gösterilmektedir. Şekil

4.22 incelendiğinde derişim 0.025 μM olduğunda yüzey üzerinde DNA miktarı düşükken derişimin artırılmasıyla yüzeyler üzerinde DNA miktarı artmaktadır. Derişim 0.1 μM olduğundan ise görüldüğü gibi yüzeyin hemen hemen tamamı prob ss-DNA ile kaplanmıştır. Elde edilen bu veriler sayesinde prob ss-DNA için optimum derişimin 0.1 μM olduğu söylenebilir.

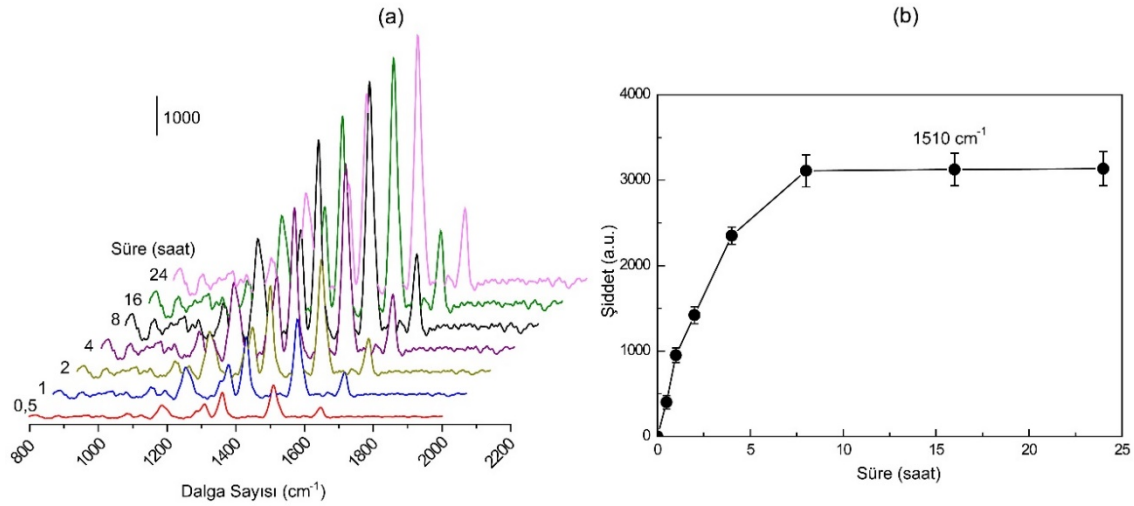


Şekil 4.22. R6G etiketli prob ss-DNA farklı derişimlerine karşı elde edilen floresans görüntüleri (Skala: 100 μm).

4.4.2. Prob ss-DNA adsorpsiyon süresinin etkisi

Yüksek hassasiyette çalışan ve güvenilir sonuçlar veren bir DNA sensör tasarımında diğer kritik basamaklardan birisi de prob ss-DNA iplikçığının adsorpsiyon

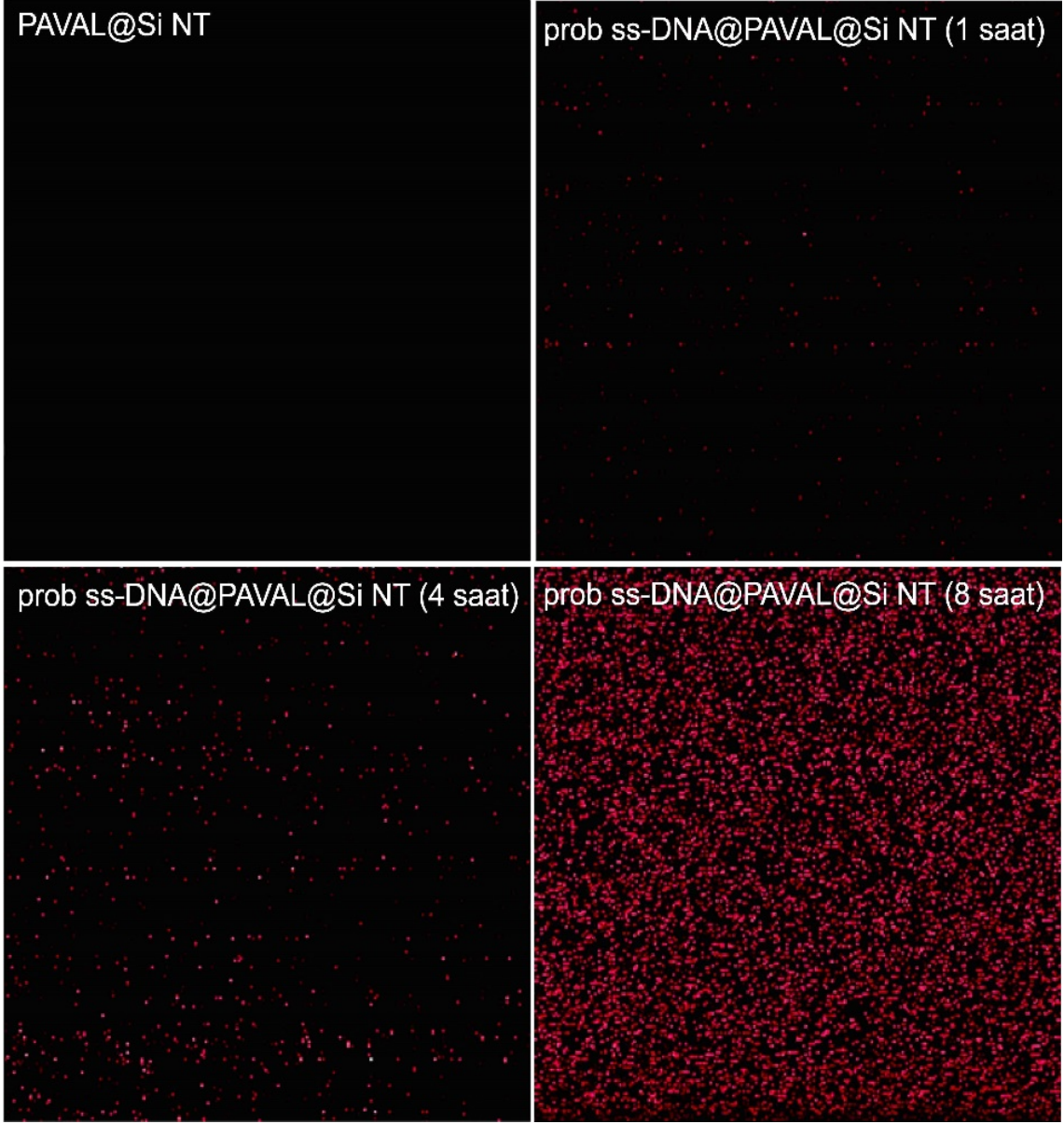
süresidir. Hazırlanan yüzeyler üzerine prob ss-DNA bağlanmasında adsorpsiyon süresinin etkisini inceleyebilmek için yüzeyler optimum derişimde prob ss-DNA içeren çözeltiler içerisinde çeşitli zaman aralıklarında bekletilmiş ve yıkama işlemlerinden sonra 10 μ L gümüş nanopartikül damlatılmış ve en son kurutularak SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.23'te farklı adsorpsiyon sürelerinde elde edilen spektrumlar verilmiştir.



Şekil 4.23. (a) R6G modifiye prob ss-DNA farklı adsorpsiyon sürelerine karşılık elde edilen SERS spektrumları ve (b) 1510 cm^{-1} referans alınarak farklı prob ss-DNA adsorpsiyon sürelerine karşı SERS şiddetindeki değişim.

Şekil 4.23a incelendiğinde adsorpsiyon süresinin artmasıyla birlikte SERS spektrumların şiddetleri artmıştır. Bu durum adsorpsiyon süresi ile yüzeydeki DNA miktarında artış olduğunun göstergesidir. 1510 cm^{-1} dalga sayısındaki bandın şiddeti referans alınıp adsorpsiyon süresine karşı grafiğe geçirildiğinde (Şekil 4.23b) adsorpsiyon süresinin artmasıyla bandın saçılma şiddetleri artmaktadır ancak adsorpsiyon süresi 8 saat ve daha fazla olduğunda saçılma şiddetinde önemli bir değişiklik olmamıştır. Bu durum 8 saatlik adsorpsiyon sonucu yüzey DNA yönünden doymuş olduğunu göstermektedir. SERS analiz sonuçları dikkate alındığında adsorpsiyon süresi 8 saat olduğunda prob ss-DNA bağlanmasının optimum olduğu söylenebilir.

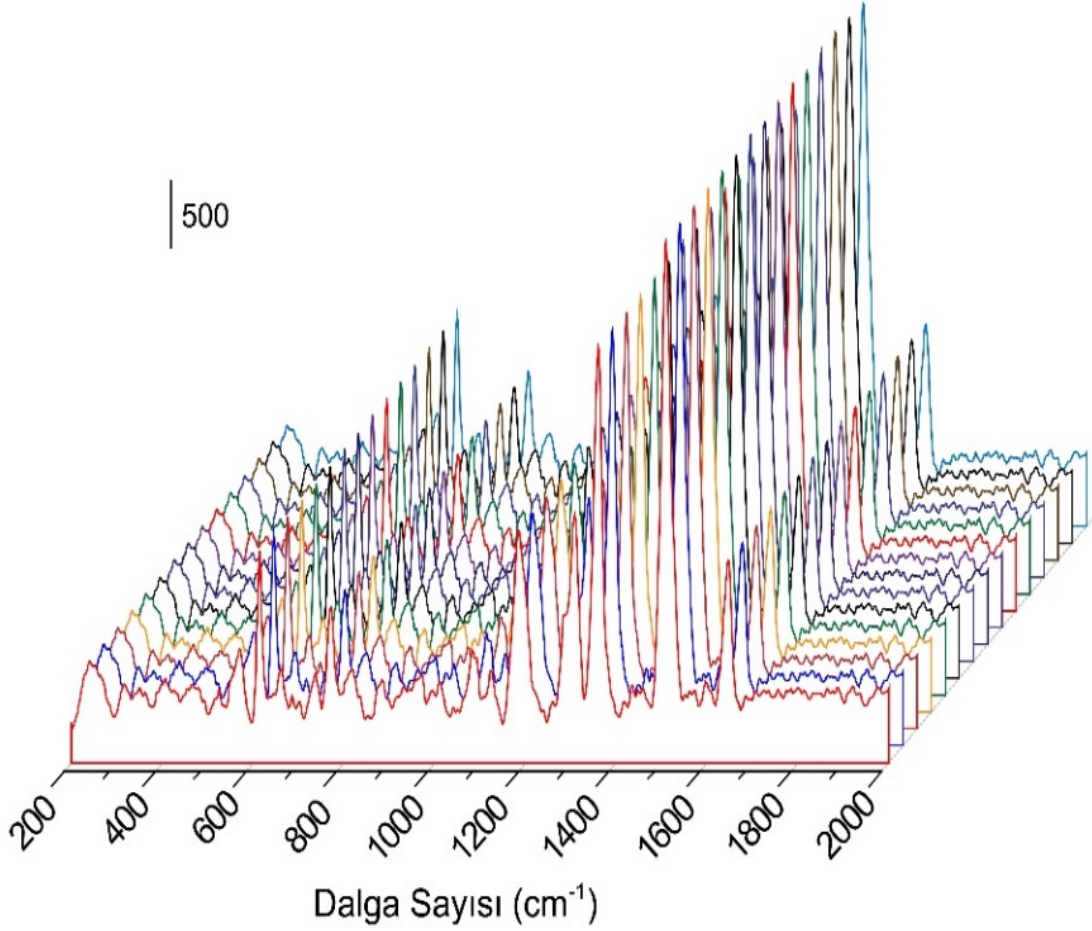
Optimum adsorpsiyon süresi floresans mikroskopu analiz ile de takip edilmiştir. Şekil 4.24 incelendiğinde adsorpsiyon süresi arttıkça yüzeydeki DNA miktarında artış meydana gelmiştir. Adsorpsiyon süresi 8 saat olduğunda ise, yüzeyin hemen hemen tamamının DNA ile kaplandığı görülmektedir.



Şekil 4.24. R6G etiketli prob ss-DNA farklı adsorpsiyon sürelerine karşı elde edilen floresans görüntüleri (Skala: 100 μm).

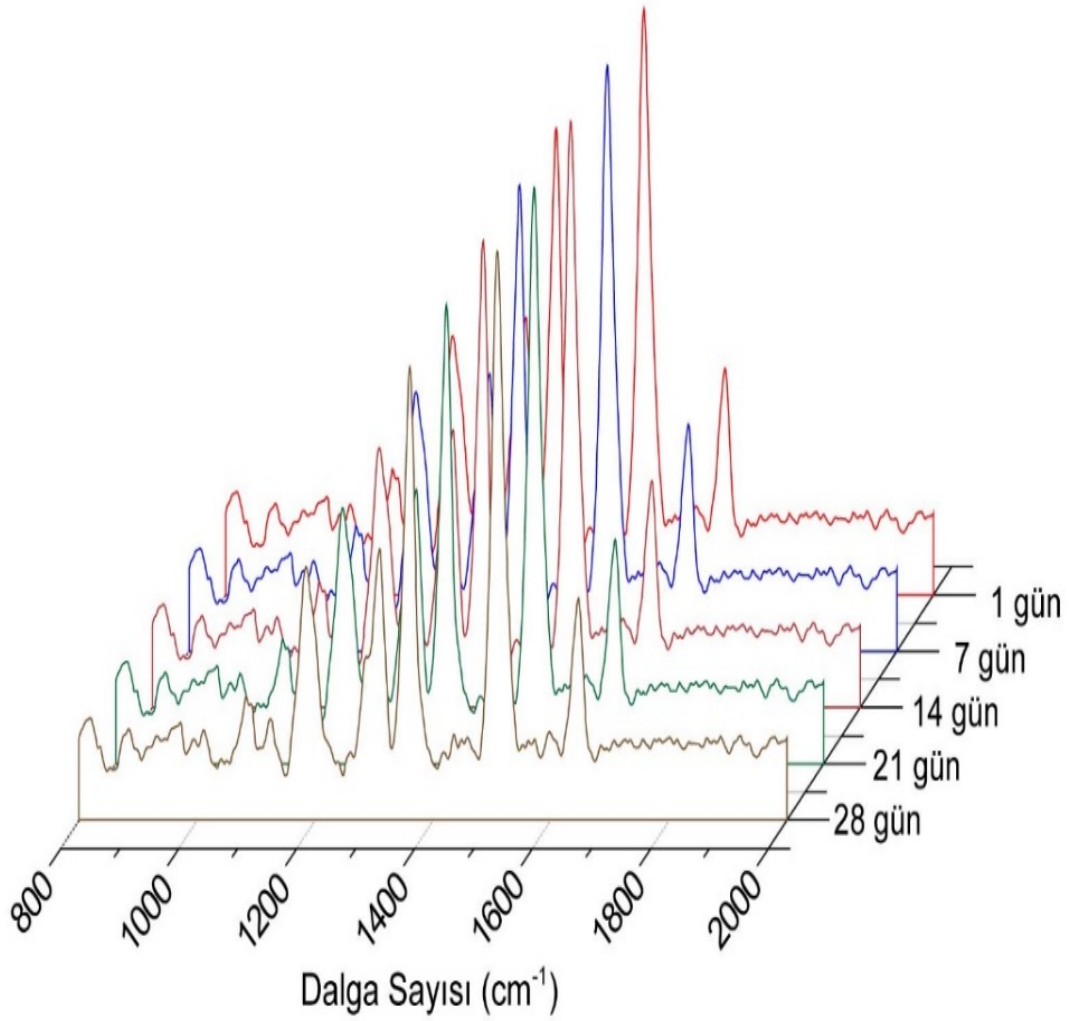
Sensörlerde kullanılan ve biyokimyasal reaksiyonun gerçekleşeceği yüzeylerde yüzey modifikasyonunun homojenliği de sensörün hassasiyetini direkt olarak etkileyen parametrelerdendir. Bu nedenle çalışma kapsamında prob ss-DNA iplikçiklerinin yüzeyler üzerindeki dağılımı SERS ile takip edilmiştir. Bu amaç doğrultusunda optimum şartlarda hazırlanmış olan prob ss-DNA bağlı yüzeyler üzerinde rastgele seçilmiş on beş farklı yerden SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.25'te elde edilen spektrumlar verilmiştir. Şekil incelendiğinde tüm spektrumların şiddetleri birbirine yakın olduğu görülmektedir. 1510 cm^{-1} 'deki band referans alındığında 15 spektrum için bağıl standart

sapma %4.1 olarak hesaplanmıştır. Bağlı standart sapmanın düşük olması prob ss-DNA'nın yüzeyler üzerinde homojen bir şekilde bağlandığını göstermektedir.



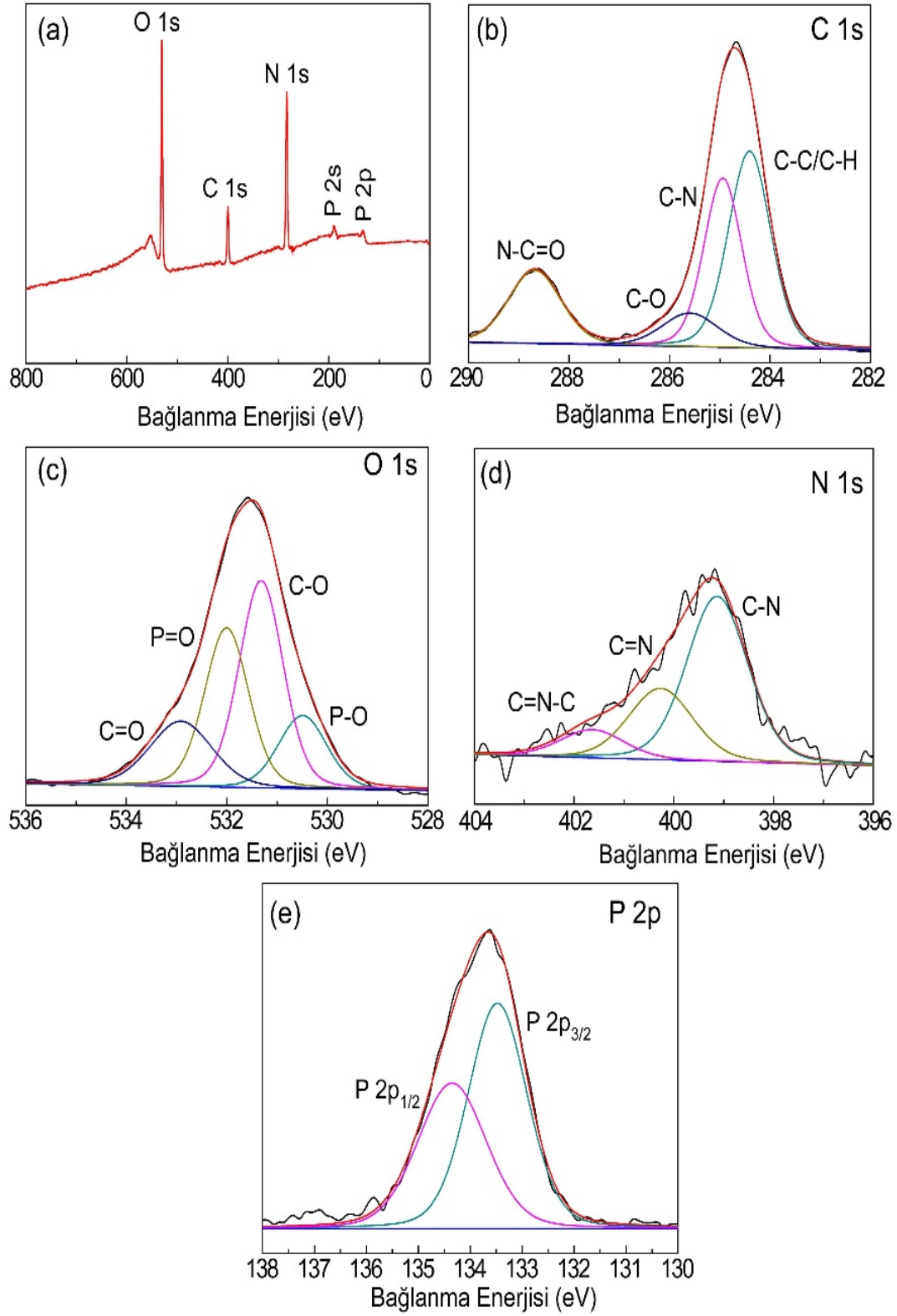
Şekil 4.25. Prob ss-DNA bağlı yüzeyler için 15 farklı yerden elde edilen SERS spektrumları.

Sensör dizaynında diğer en önemli parametre ise hazırlanan yüzeylerin kararlılığıdır. Kararlılığın yüksek olması maliyeti düşürme konusunda en önemli unsurdur. Prob ss-DNA bağlı yüzeylerin kararlılığı için optimum şartlarda DNA iplikçığı bağlanmış yüzeyler PBS tamponunda ve +4 °C'de farklı sürelerde bekletilmiş ve azot gazı ile kurutulduktan sonra gümüş nanopartikül damlatılmıştır. Yüzeyler kurutulduktan sonra SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan yüzeylere ait SERS spektrumu incelendiğinde (Şekil 4.26) ilk üç hafta için SERS şiddetlerinde önemli bir değişiklik gözlenmezken 4 haftalık saklama süresi sonrasında dahi SERS şiddetinde sadece %6.81'lik azalma meydana gelmiştir. Bunun sonucu olarak hazırlanan yüzeylerin 1 ay boyunca stabil olduğu söylenebilir.



Şekil 4.26. Prob ss-DNA bağlı yüzeylerin farklı bekletme sürelerine karşılık elde edilen SERS spektrumları.

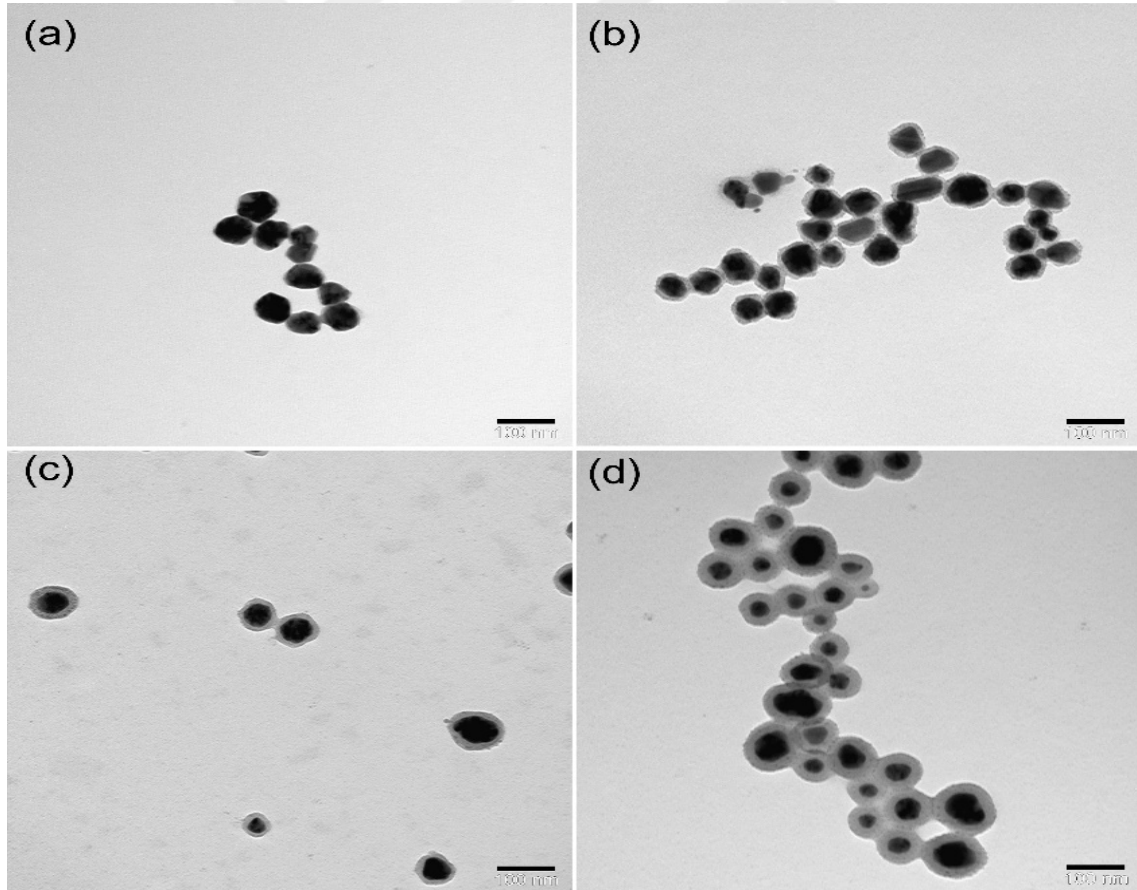
Optimum koşullarda hazırlanmış olan prob ss-DNA bağlı yüzeylerin kimyasal yapı analizi X-ışınları fotoelektron spektroskopisi (XPS) ile gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.27 incelendiğinde oksijen, azot ve karbonun yanı sıra yaklaşık olarak 189.2 eV'de P 2s ve 133.1 eV'de P 2p atomuna ait pikler elde edilmiştir. C 1s yüksek çözünürlük XPS spektrumuna bakıldığında (Şekil 4.27b) dört farklı kimyasal çevreye sahip karbon elementi ile dört farklı kimyasal çevreye sahip oksijen elementi (Şekil 4.27c) belirlenmiştir. Yüksek çözünürlük N 1s spektrumu incelendiğinde üç farklı kimyasal çevreye sahip azot elementi belirlenmiştir. Ayrıca P 2p için yüksek çözünürlük XPS spektrumunda (Şekil 4.27e) tek bir kimyasal çevreye sahip fosfor atomunun görülmesi DNA iplikçığının yüzeylere kovalent olarak bağlandığının en güçlü kanıtıdır.



Şekil 4.27. Optimum koşullarda prob ss-DNA bağlı yüzeylerin XPS genel spektrumu (a) ve (b) C 1s, (c) O 1s, (d) N 1s, (e) P 2p yüksek çözünürlük XPS spektrumları.

4.5. SERS/SEF Nanopartiküllerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Altın nanopartiküllerin (Au NP) hem SERS hem de SEF özelliğinde olabilmesi için ortalama çaplarının 50-70 nm arasında olması gerektiği rapor edilmiştir (Li, 2013). Bunun en önemli sebebi altın nanopartiküllerin bu çap aralığında plazmonik etkisinin çok büyük olmasındandır. Tez kapsamında ortalama çapı 62 nm olan küresel yapıda altın nanopartiküller sitrat indirgeme yöntemi ile sentezlenmiştir (Jin ve ark., 2008). Au NP sentezi gerçekleştirildikten sonra SERS etiket molekül olarak MBA ile modifiye edilmiştir. MBA modifiye edilmiş Au NP (MBA@Au NP) daha sonra silika tabakası ile kaplanmıştır. Silika tabakası için TEOS'un bazik ortamda kondenzasyon reaksiyonu ile partiküllere bağlanması sağlanmıştır. Kondenzasyon sırasında ortama FITC boyar maddesi ilave edilirse reaksiyon sırasında boyar madde de silika tabakası içerisinde rahatlıkla hapsolabilir (Wu, 2013).

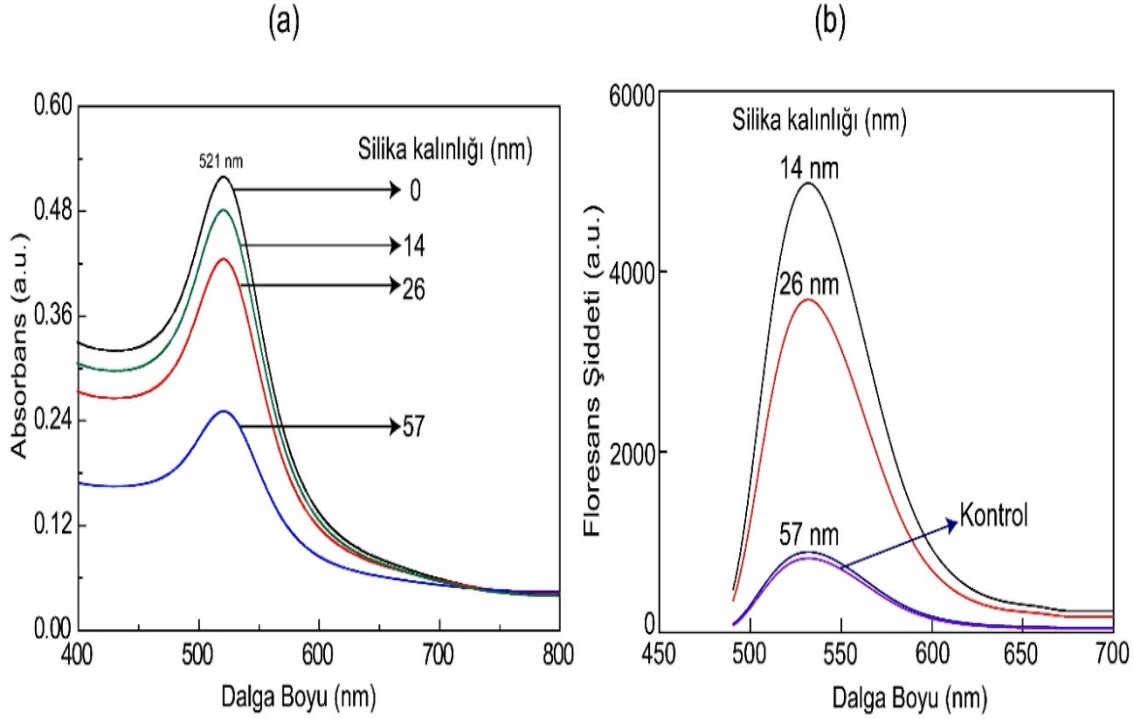


Şekil 4.28. (a) MBA@Au, (b) 100 µL TEOS, (c) 200 µL TEOS ve (d) 300 µL TEOS ilavesi ile elde edilen partiküllerin TEM görüntüleri.

Hazırlanan nanopartiküller ilk olarak geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ile karakterize edilmiştir. Şekil 4.28'de farklı silika tabaka kalınlığına sahip nanopartiküllerin TEM görüntüleri verilmiştir. Görüntüler incelendiğinde MBA@Au NP'nin hemen hemen küresel yapıda olup ortalama çapları 62 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.28a). Nanopartiküller üzerine 100 μ L TEOS ilave ile partiküllerin üzerinde aydınlık alan olarak görülen ve ortalama çapı 14 nm olan silika tabakası ile kaplandığı belirlenmiştir (Şekil 4.28b). Reaksiyon ortamına 200 μ L ve 300 μ L TEOS ilavesi ile silika tabaka kalınlığının artarak sırasıyla 26 nm (Şekil 4.28c) ve 57 nm (Şekil 4.28d) olarak belirlenmiştir.

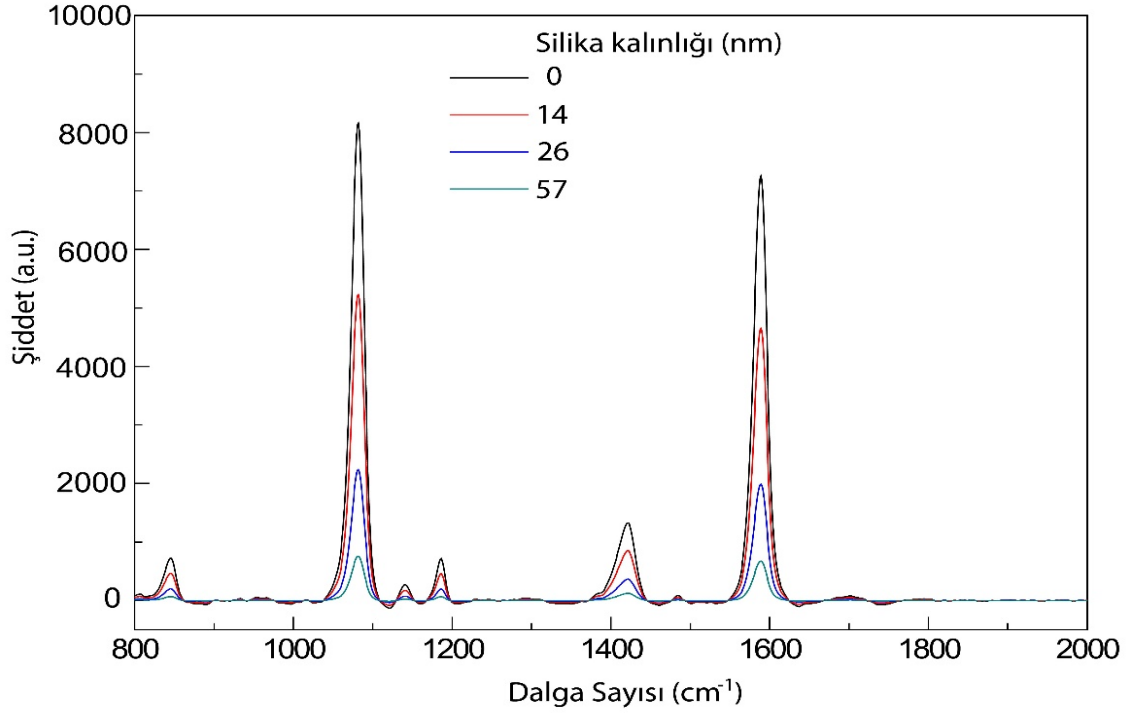
Hazırlanan nanopartiküllerin optik özellikleri UV-vis ve floresans spektrofotometresi ile incelenmiştir. Şekil 4.29a'da partiküllerin UV-vis spektrumu incelendiğinde 521 nm civarında maksimum absorbans vermesi, oluşan parçacıkların içeriğinin altın olduğunu göstermekle birlikte elde edilen spektrumun hem nispeten dar bir dağılım vermesi hem de tek bir absorbans vermesi parçacıkların izotropik bir şekilde oluştuğunu ve herhangi bir topaklanmanın olmadığını göstermektedir (Underwood ve Mulvaney, 1994). Bununla birlikte, partiküller üzerindeki silika tabakasının kalınlığı arttıkça maksimum absorbans değerlerinde de azalma meydana gelmiştir. Bunun en önemli sebebi silika tabaka kalınlığının artması ile birlikte baskın gelen saçılmanın partikülün plazmon bandını baskılamasındandır (Liz-Marzán ve ark., 1996). Şekil 4.29.b'de farklı silika tabaka kalınlıklarına sahip partiküllerin floresans spektrumu verilmiştir. Şekil incelendiğinde kontrol olarak adlandırılan ve 1 μ g/mL FITC sulu çözeltisinden elde edilen 530 nm'deki emisyon spektrumu silika kaplı tüm nanopartiküllerde de elde edilmiştir. Bu durum boyar maddenin silika tabakası içerisine gömülü olduğunun en güçlü kanıtıdır. Bununla birlikte silika tabakası 14 nm olduğunda kontrol spektrumun göre floresans şiddeti oldukça fazladır. Bu durum FITC molekülü ile çekirdekte bulunan altın nanopartiküllere oldukça yakın olmasından kaynaklanmaktadır. Silika tabakası 26 nm olduğunda ise bir önceki duruma göre floresans şiddeti azalmış ancak yine de kontrol spektrumuna göre floresans şiddeti daha fazladır. Bununla birlikte silika tabaka kalınlığı 57 nm olduğunda floresans şiddeti daha da azalmış ve kontrol spektrumuna yakın bir floresans şiddetine sahip olmuştur. Bu durum silika tabaka kalınlığının artması ile çoğu FITC molekülünün metalden daha uzak bir konuma sahip

olmasındandır. Sonuç olarak metal ile boyar madde arasındaki mesafe arttıkça metalin floresans üzerindeki güçlendirme etkisi azalmaktadır (Zhang ve ark., 2013).



Şekil 4.29. Sentezlenen partiküllerin (a) UV-vis ve (b) Floresans spektrumları.

Silika tabaka kalınlığının SERS üzerine etkisi de incelenmiştir. Bu amaçla, sentezlenen partiküller 0.5 cm x 0.5 cm ebatlarındaki temiz cam yüzeylere damlatılmış ve ardından SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.30'da sentezlenen partiküllerin SERS spektrumları verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde tüm partiküller için 1081 cm^{-1} ve 1588 cm^{-1} dalga sayılarında benzen halkasına ait saçılmalarından kaynaklanan bandlar elde edilmiş olup bu bandlar sadece ve sadece MBA molekülüne aittir. SERS'te partikül yüzeyine kovalent olarak bağlı ya da partikül yüzeyine oldukça yakın moleküllerin saçılması gerçekleşmiş olup bu saçılma oranı molekülün partikül yüzeyi ile arasındaki mesafe arttıkça saçılma oranı da düşmektedir (Kneip ve ark., 2002). Bu nedenle elde edilen bandlar FITC molekülündeki benzen halkasından ziyade MBA molekülüne aittir. Spektrumlar incelenmeye devam edildiğinde silika tabakasının artması ile birlikte Raman saçılmalarında da azalma meydana gelmiştir. Bu durum silika tabaka kalınlığının artması ile ışının optik yolunun uzaması ve lazer odaklanma spotlarının altın çekirdeğinden sapması sonucudur (Kong ve ark., 2012).

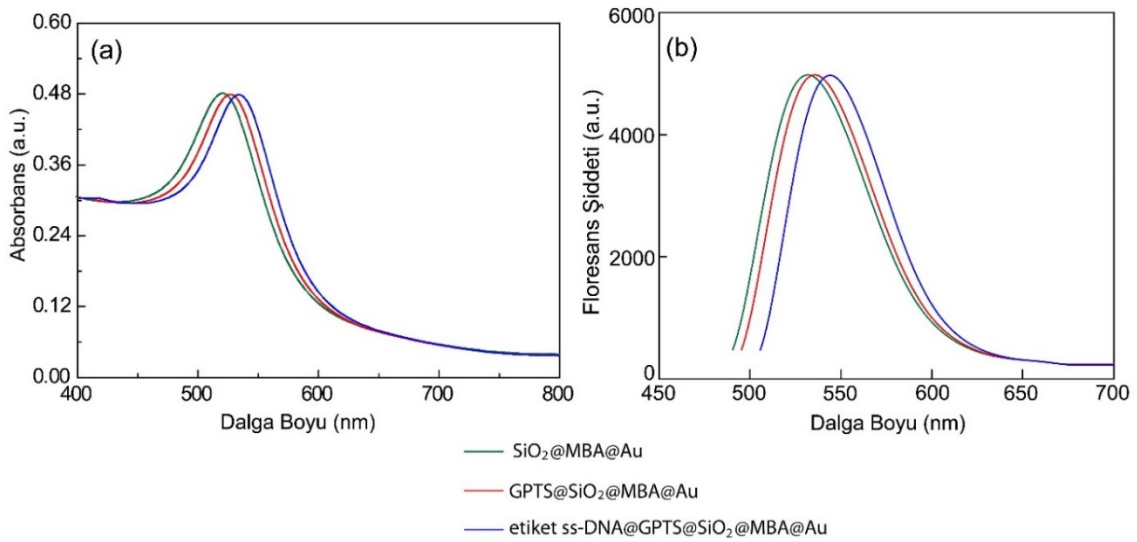


Şekil 4.30. Sentezlenen partiküllere ait SERS spektrumu.

UV-vis ve floresans spektrumları ile SERS spektrumları incelendiğinde etkin bir SERS/SEF nanopartikül için yapılan deneysel koşullar içerisinde en uygunu 14 nm silika kaplı nanopartiküllerdir. Bu nedenle, tezde bu nanopartiküller kullanılmıştır.

Raman etiketi ile kaplı altın nanopartiküllerin üzerine silika tabakası kaplandıktan sonra hazır olan SERS/SEF özellikteki partiküllerin İPV teşhisinde kullanılabilirliğini test etmek için partiküllerin üzerine etiket-ss-DNA bağlanmıştır. DNA iplikçığının kovalent bağlanması için partiküller ilk olarak GPTS ara bağlayıcı ile modifiye edilmiş ve ardından bir ucu $-NH_2$ fonksiyonel grubu ile modifiye edilmiş etiket ss-DNA, GPTS molekülündeki oksiran grubu ile DNA iplikçığındeki amin grupları arasındaki halka açılması reaksiyonu sonucu partikül yüzeylerine kovalent bağlanması gerçekleştirilmiştir. Her bir aşamada modifiye edilmiş partiküllerin optik özellikleri UV-GB ve floresans spektrofotometresi ile incelenmiş ve ilgili spektrumlar Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Şekil 4.31a’da UV-GB spektrumları incelendiğinde silika kaplı ve Raman etiketi ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller ($SiO_2@MBA@Au$) 521 nm’de maksimum absorbans verirken bu partiküller üzerine GPTS bağlandıktan sonra ($GPTS@SiO_2@MBA@Au$) bir önceki duruma göre daha yüksek dalga boyuna kayma gözlenmiş ve maksimum absorbans verdiği dalga boyu 532 nm olarak belirlenmiştir.

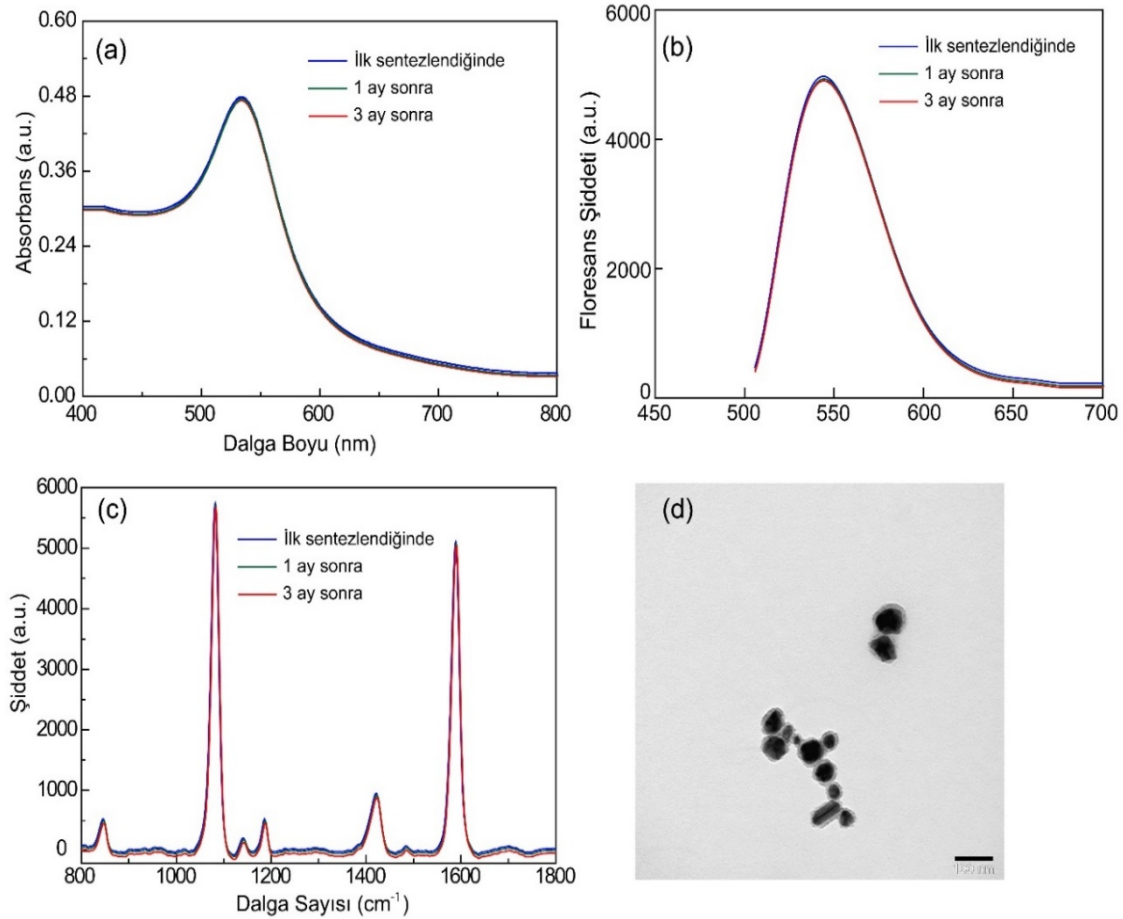
GPTS modifiyeli partiküllerin üzerine etiket ss-DNA bağlandıktan sonra (etiket ss-DNA@GPTS@SiO₂@MBA@Au) maksimum absorbans verdiği dalga boyu daha uzun dalga boyuna kayma göstererek 539 nm'ye ulaşmıştır. Şekil 4.31b'de her bir modifikasyon sonrası partiküllere ait emisyon spektrumları verilmiştir. Spektrumlara bakıldığında UV-GB spektrumlarında olduğu gibi her bir modifikasyondan sonra maksimum emisyon verdiği dalga boyları uzun dalga boylarına kaymıştır. Görüldüğü gibi her bir modifikasyondan sonra partiküllerin maksimum absorbans ve emisyonlarına ait dalga boylarında uzun dalga boylarına kayma olmuştur. Bunun en önemli sebebi altın nanopartiküllerin her bir modifikasyondan sonra kırılma indisinin değişmesinden kaynaklanmaktadır (Tokareva ve ark., 2004; Nath ve Chilkoti, 2004; Zhang ve ark., 2013).



Şekil 4.31. Her bir modifikasyondan sonra nanopartiküllere ait (a) UV-GB absorbans spektrumları ile (b) floresans emisyon spektrumları.

SERS/SEF özellikteki nanopartiküllerin kararlılığı da hem SERS hem de SEF performansını etkileyen en önemli parametreler arasındadır. Özellikle herhangi bir biyomolekül ile modifiye edilmiş nanopartikülün kararlılığı aynı zamanda dizayn edilen biyosensörün kararlılığını da doğrudan etkiler. Bu nedenle etiket ss-DNA ile modifiye edilmiş nanopartiküller PBS tamponunda (pH 7.4) farklı zaman aralıklarında +4 °C'de bekletilmiş ve belirli zaman aralıklarında UV-GB, floresans ve SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.32a ve 4.32b'de UV-GB absorbans spektrumları ile floresans emisyon spektrumları incelendiğinde 3 ay gibi bir süre sonunda dahi ne absorbans ne de

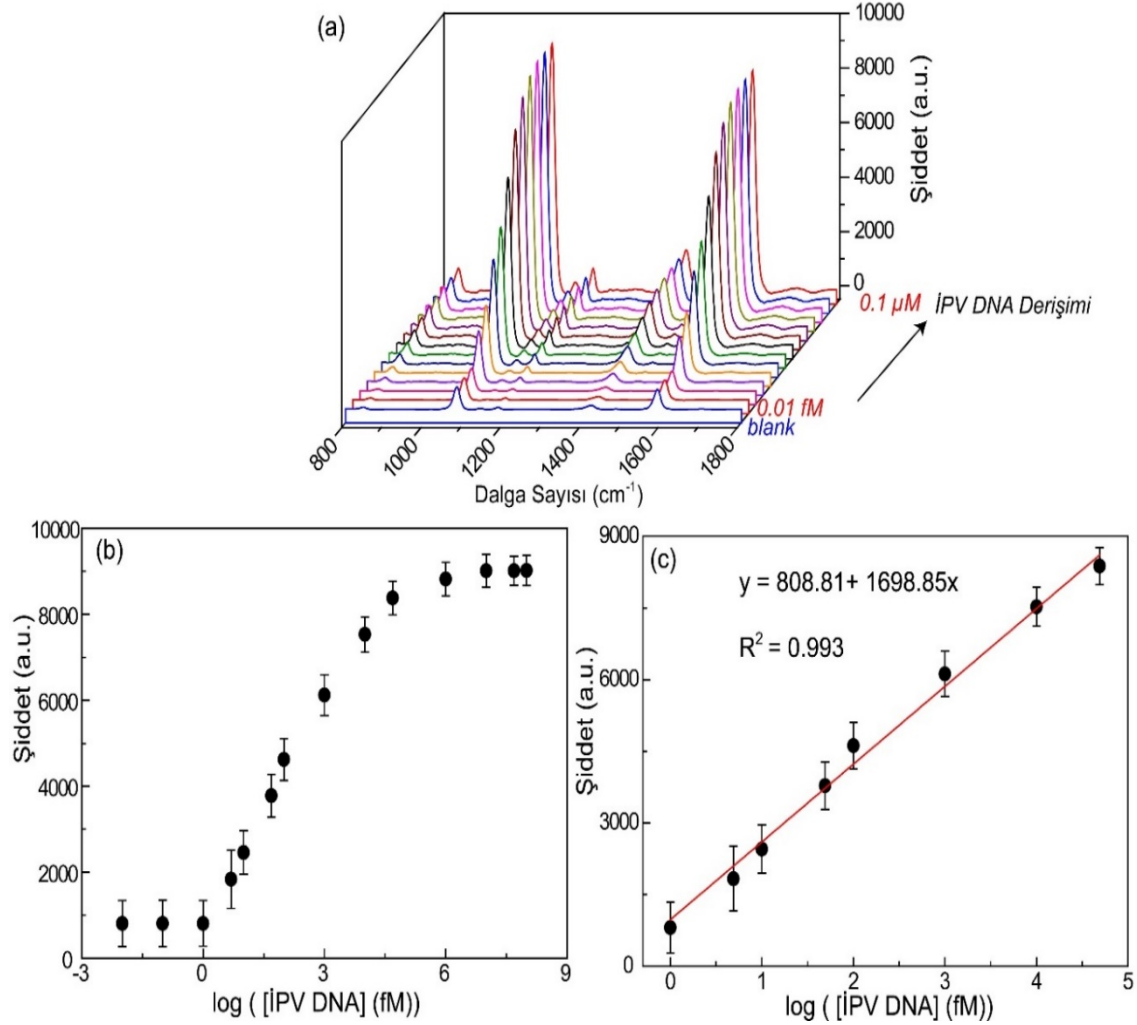
emisyon şiddetlerinde ilk sentezlendiği zamana göre herhangi bir değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte maksimum absorbans ve emisyon verdiği dalga boylarında da değişiklik olmamıştır. Şekil 4.32c’de nanopartiküllere ait farklı zaman aralıklarında alınan SERS spektrumları verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde 3 ay sürenin sonunda SERS şiddetlerinde hemen hemen hiç değişiklik olmamıştır. Bununla birlikte her bir saçılma bandının dalga sayısında da değişiklik gözlenmemiştir. Şekil 4.32d’de etiket ss-DNA bağlı ve 3 ay bekletme süresinin sonrasında alınan TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsü incelendiğinde, modifikasyondan sonra partiküllerin morfolojik yapısını korunduğu ve herhangi bir topaklaşmanın olmadığı tespit edilmiştir. Tüm bu sonuçlar dikkate alındığında etiket ss-DNA bağlı partiküllerin en az 3 ay süre boyunca kararlı olduğu belirlenmiştir.



Şekil 4.32. Farklı zaman aralıklarında etiket ss-DNA bağlı partiküllerin (a) UV-GB absorbans spektrumları (b) floresans emisyon spektrumları, (c) SERS spektrumları ve (d) 3 ay bekletme süresi sonrasında elde edilen TEM görüntüsü.

SERS/SEF özellikteki nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonunun tamamlanmasının ardından hazırlanan sensörün İPV teşhisinde kullanılabilirliği araştırılmıştır. Bunun için ilk olarak sensörün tayin edebilme sınırı (limit of quantification, LOQ) ve gözlenebilme sınırı (limit of detection, LOD) belirlenmiştir. Bu amaç doğrultusunda farklı derişimlerde İPV DNA (0.01 fM-0.1 µM), prob ss-DNA bağlı silisyum yüzeylere bağlanmış ve hemen ardından etiket ss-DNA bağlı nanopartiküllere etkileştirilerek “sandviç tip hibridizasyon” gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon sonrası ilk olarak SERS analizi gerçekleştirilmiş ve her bir İPV DNA derişimine karşı gelen SERS spektrumları Şekil 4.33a’da verilmiştir. Spektrumlar incelendiğinde her bir derişim için MBA’ya ait tipik saçılma pikleri elde edilmiştir (Wang ve ark., 2012). Bu durum yüzeyler üzerinde hibridizasyonun gerçekleştiğinin iyi bir kanıtıdır. Şekil 4.33b’de farklı İPV DNA derişimleri ile muamele edilerek elde edilen “sandviç hibrit” sisteme ait kalibrasyon grafiğı görölmektedir (en baskın pik olan 1081 cm⁻¹ referans alınmıştır). Şekilden de göröleceğı gibi DNA derişiminin artması ile birlikte SERS şiddetlerinde artışlar meydana gelmektedir. DNA derişimi 0.01 fM ve daha az olduğunda SERS şiddetlerinde önemli bir değışiklik olmamıştır. Bu durum yüzeylerde bu derişim aralığında gerçekleşen hibridizasyonun SERS cihazının tayin edebileceğı bir aralıkta olmamasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte spektrumlarda blank olarak belirtilen spektrum ise yüzeyler üzerinde İPV DNA olmadan etiket-ss-DNA ile etkileştirilmesi sonucu elde edilmiştir. Yüzeylerde hedef-ss-DNA olmadan da belirli bir spektrumun elde edilmesinin sebebi yüzeyler üzerinde non-spesifik bağlanmaların olduğunu göstermektedir (Kang ve ark., 2010; Li ve ark., 2013). Spektrumlar DNA derişimi 10 nM ve daha fazla olduğunda ise SERS şiddetleri hemen hemen değışmemiştir. Bu durum yüzeylerin hibridizasyon bakımından doyduğunun göstergesidir. Şekil 4.33b incelendiğinde SERS şiddetindeki anlamlı ilk artış İPV DNA derişimi 5.0 fM olduğunda meydana gelmiştir. Kaba bir yorumla hazırlanan bu sistemin LOQ değeri 5.0 fM olduğu söylenebilir. Elde edilen grafiğın doğrusal olduğu aralık referans alınıp grafiğı geçirildiğinde (Şekil 4.33c) korelasyon katsayısı (R^2) 0.993 olan ve $y = 808.81 + 1698.85 \log([DNA] \text{ (fM)})$ şeklinde tanımlanan bir doğru denklemi elde edilmiştir. Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğı’nin (International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC) LOD hesaplanması için belirlediğı 3 s/m kriteri ile LOQ hesaplanması için belirlediğı 10 s/m kriteri (s: İPV DNA ile etkileştirilmemiş ancak etiket ss-DNA ile etkileştirilmiş

yüzeylerin on farklı okuma sonucu elde edilmiş SERS şiddetlerin standart sapması ve m: kalibrasyon grafiğinin eğimi) (Gilfrich ve Briks, 1984) dikkate alınarak yapılan hesaplama sonucu hazırlanan hibrit sistemin İPV teşhisindeki LOD değeri 1.4 fM ve LOQ değeri 4.6 fM olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.33. (a) Farklı derişimlerde İPV DNA ile etkileştirilmiş yüzeylerin SERS spektrumları, (b ve c) 1081 cm⁻¹ referans alınarak log ([DNA]) karşı SERS şiddetlerindeki değışim (grafiklerdeki standart saplamalar beş farklı ölçüm sonucu elde edilmiştir).

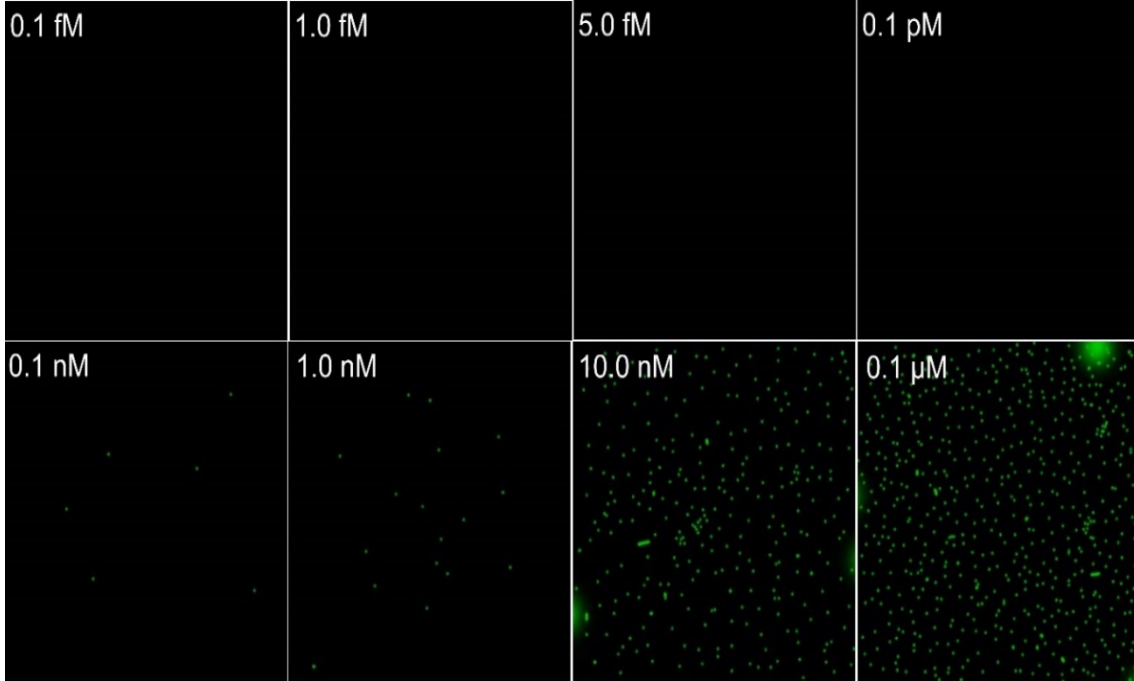
Son zamanlarda İPV teşhisi için literatürde floresans, elektrokimyasal ve optik temelli birçok sensör dizaynı gerçekleştirilmiştir. Çalışma kapsamında silisyum nanoteller ile hazırlanan hibrit sistemin rapor edilen sensörlere göre oldukça düşük LOD değerine sahiptir. Bu durum, hazırlanan SERS substratın lokal plazmonik alanı sayesinde sinyal kuvvetlendirme özelliğinin olması, SERS cihazlarının mevcut diğer klasik analitik

cihazlara göre sinyal/gürültü oranının yüksek olması, polimer fırça kullanımı ile birlikte yüzeylerde moleküler kırılmaların önlenmesi (basit organik moleküllerin çoğu rijid yapıya sahiptir) gibi birçok parametrenin etkili olmasından kaynaklanmaktadır.

Çizelge 4.2. Literatürdeki İPV teşhisi tasarlanan analiz sistemlerin karşılaştırılması.

Sensör Dizaynı	Analiz Yöntemi	LOD	Referans
DNA/Sistein/Au elektrot	Elektrokimya	18.13 nM	Campos-Ferreira ve ark. (2013)
Sandviç hibridizasyon	Elektrokimya	110 pM	Fragoso ve ark. (2010)
DNA/ Hematoksin/Sistein/Au elektrot	Elektrokimya	3.8 nM	Nasirizadeh ve ark. (2010)
DNA/(3-aminopropil) dimethylethoxysilane	Fotonik kristal/Optik	1.5 nM	Pal ve ark. (2013)
DNA/Au elektrot	Piezoelektrik	50 nM	Dell'Atti ve ark. (2007)
DNA/Kuantum nokta	Floresans spektroskopisi	0.2 nM	Shamsipur ve ark. (2017)
Au/Antikor/Antijen	Floresans	100 pM	Jimenez ve ark. (2017)
Antikor/Kuantum nokta	spektroskopisi		

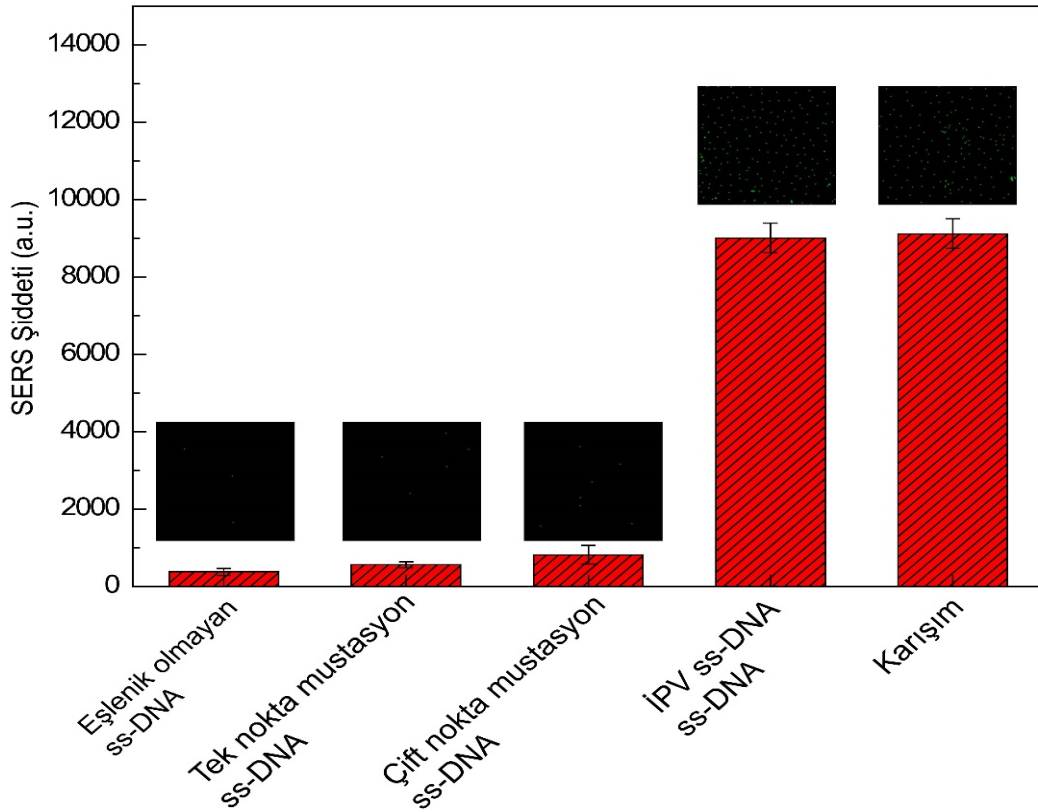
Hazırlanan nanopartiküllerin aynı zamanda floresans özelliğinin olması nedeni ile hibridizasyon aynı zamanda floresans mikroskobu ile takip edilmiştir. Şekil 4.34'te farklı İPV derişimler ile gerçekleştirilen sandviç hibridizasyona ait floresans mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Şekil incelendiğinde İPV derişimi SERS ile elde edilen LOQ değerinin altında (4.6 fM) ve üstünde (5.0 fM-1.0 pM) olduğunda floresans mikroskobu ile herhangi bir sinyal alınmamıştır. Bunun nedeni dizayn edilen sensör ile bu derişim aralıklarında floresans mikroskobu ile mümkün olmadığını göstermektedir. Bu durum, bu derişim aralıklarında floresans mikroskobunu ile tayin edebileceği derişim aralığında olmamasından kaynaklanmaktadır. İPV derişimi 0.1 nM olduğunda yüzeyden ilk floresans sinyalleri alınmış ve derişim 2.0 nM - 0.1 μ M aralığında değiştiğinde yüzeylerden elde edilen floresans desenlerinde artış meydana gelmiştir. Sonuç olarak hazırlanan sensör ile İPV derişimi 0.1 nM ve daha fazla olduğunda SERS ile birlikte floresans mikroskobu ile de kalitatif analiz yapılarak hibridizasyon takip edilebilir.



Şekil 4.34. Farklı İPV DNA derişimleri ile gerçekleştirilen hibridizasyon sonrası elde edilen floresans mikroskop desenleri (Skala: 100 μm).

Dizayn edilen herhangi bir biyosensörün en önemli diğerk özelliğii ise sensörün seçiciliğidir. Çalışma kapsamında dizayn edilen sensörün seçiciliğii için tek nokta, çift nokta ve eşlenik olmayan DNA iplikçikleri kullanılmıştır. Prob ss- DNA bağılı silisyum teller üzerine DNA iplikçik içeren her bir çözeltiden belirli miktar (10 nM, 100 μl) damlatıldıktan ve yüzeyler yıkanıp kurutulmuş ve sonra etiket-ss-DNA bağılı nanopartiküller ile muamele edildikten sonra SERS ve floresans mikroskobu analizleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.35’te 1081 cm^{-1} dalga sayısında elde edilen SERS şiddetinin değışimi ile ilgili DNA iplikçilerine ait floresans mikroskobu görüntüleri verilmiştir. Grafikten de anlaşılaçağı üzere tek nokta mutasyona uğramış DNA iplikçiiğinin SERS şiddetinin İPV ss-DNA bağılı yüzeylere göre yaklaşık 11 kat, çift nokta mutasyona uğramış DNA iplikçiklerinin ise yaklaşık 16 kat ve eşlenik olmayan DNA iplikçiiğinin ise yaklaşık 24 kat daha az SERS şiddetine sahiptir. Aynı zamanda tüm DNA iplikçiklerini içeren çözelti (karışım her bir DNA iplikçiiğinden 10 nM içermektedir) ile yapılan hibridizasyon sonucu elde edilen şiddet ise hemen hemen sadece İPV DNA içeren karışım ile aynı SERS şiddetine sahiptir. Floresans desenler incelendiğinde ise tek nokta, çift nokta ve eşlenik olmayan DNA iplikçikleri için çok az floresans desenleri elde edilirken sadece İPV DNA ile yapılan hibridizasyonda ise oldukça fazla sinyal elde edilmiştir.

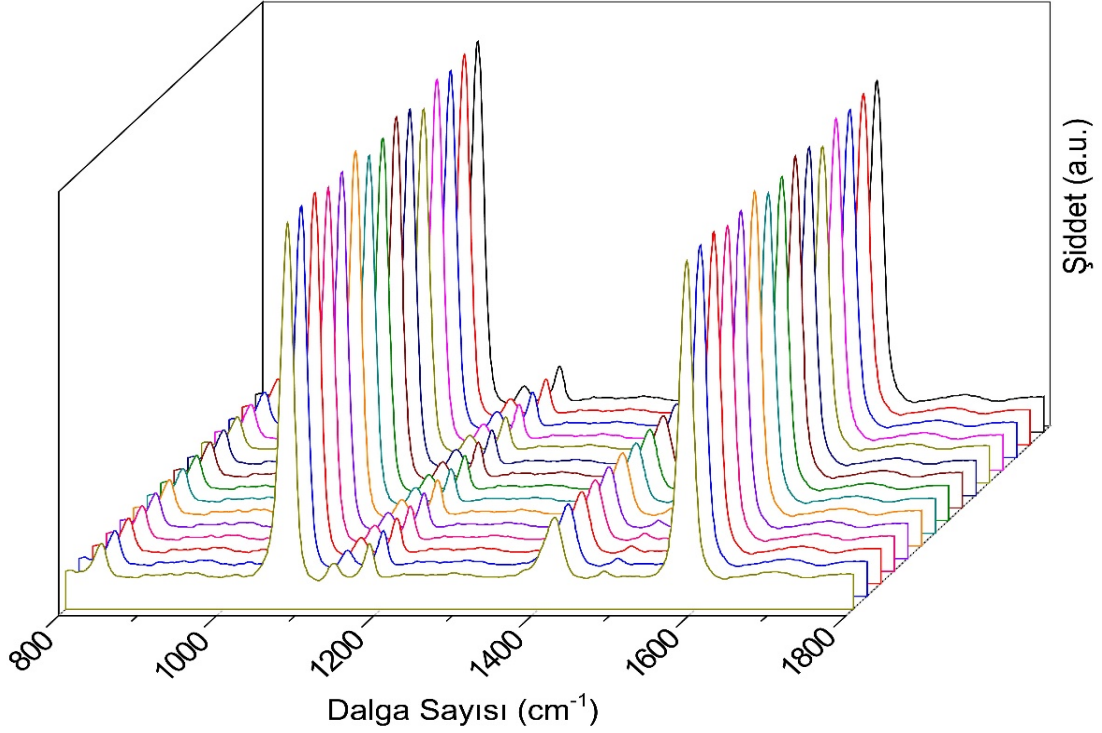
Bununla birlikte karışımın floresans deseni ise hemen hemen İPV DNA için elde edilen desen ile aynıdır. Elde edilen sonuçlardan anlaşılacağı üzere hazırlanan hibrit sisteminin seçiciliğinin yüksek olduğunu göstermektedir. Bununla birlikte tek nokta, çift nokta ve eşlenik olmayan DNA iplikçilerinde az da olsa SERS sinyalleri ile floresans sinyallerinin alınması prob ss-DNA ile diğer DNA iplikçikleri arasında non-spesifik etkileşimlerin olmasından kaynaklanmış olabilir (Liang ve ark., 2006; Lin ve ark., 2010; Wang ve ark., 2010).



Şekil 4.35. Farklı hedef ss-DNA türlerine karşı elde edilen SERS şiddetleri (1081 cm^{-1} dalga sayındaki şiddet referans alınmıştır. Standart saplamalar beş farklı ölçüm sonucu elde edilmiştir. ss-DNA iplikçik derişimi: 10.0 nM . Floresans görüntüleri için skala: $100\text{ }\mu\text{m}$).

Bir biyosensörün seçiciliğinin yanı sıra hazırlanan sensör yüzeyinin homojenliği de oldukça önemlidir. Yüzeydeki modifikasyonların homojenliği tekrarlanabilir sinyallerin alınmasına katkısı büyüktür. Hazırlanan sandviç hibridizasyonunun yüzey üzerinde homojen olduğunu gösterebilmek için hazırlanan yüzeyler üzerinden rastgele 15 farklı bölge seçilerek SERS analizi gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.36’da elde edilen SERS spektrumları gösterilmektedir. Şekilden de görüldüğü gibi her bir bölgede elde edilen

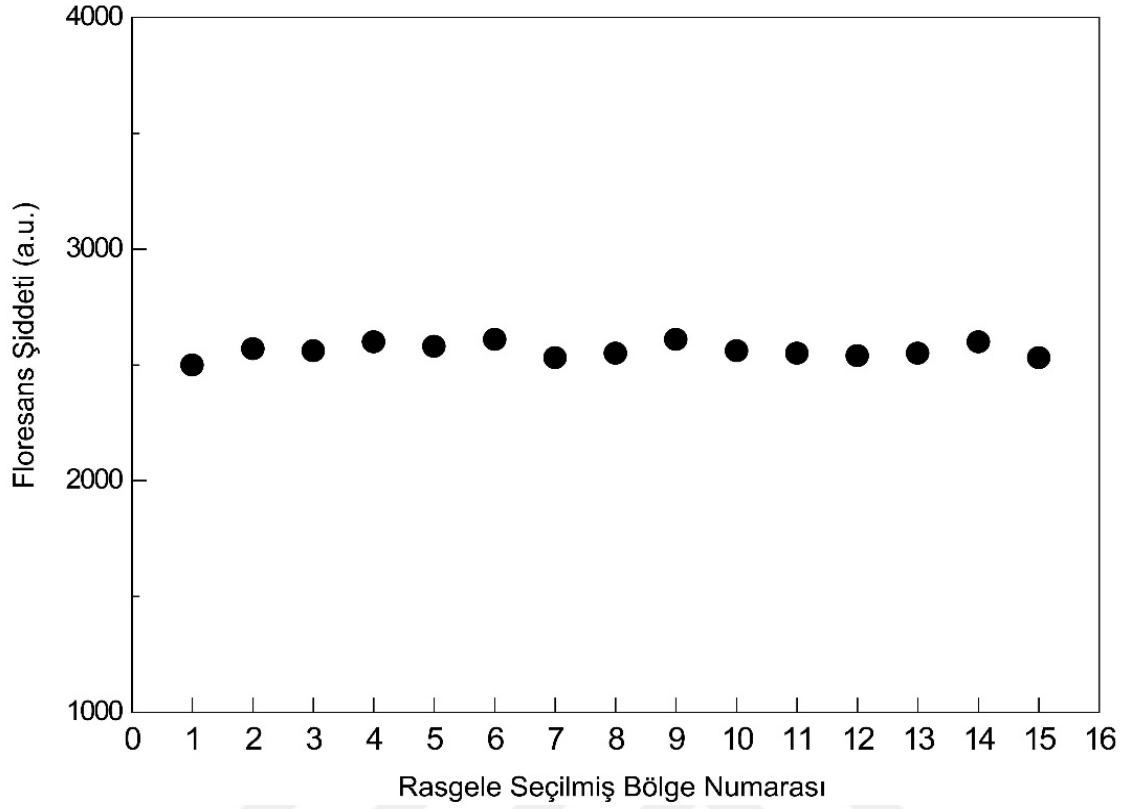
SERS spektrumları ve bu spektrumların şiddetleri birbirine oldukça yakındır. 1081 cm^{-1} 'deki band şiddeti referans alındığında % bağıl standart sapması %4.28 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.36. Sandviç hibridizasyona ait rastgele seçilen 15 farklı bölgeye ait SERS spektrumları (İPV DNA derişimi: 10.0 nM).

Dizayn edilen sensör yüzeyinin homojenliği aynı zamanda floresans mikroskobu ile de araştırılmıştır. Bu amaç doğrultusunda yüzeyin 15 farklı bölgesinden floresans mikroskobu görüntüleri alınmış ve görüntüler ImageJ programı vasıtası ile floresans şiddetleri belirlenmiştir. ImageJ programı Java tabanlı bir program olup genellikle mikroskobik yöntemlerden elde edilen görüntülerin işlenmesinde/düzenlenmesinde kullanılan programdır (Lederman, 2018) (Burada verilen floresans şiddetleri programın kendi algoritması ile çözülmüş bağıl şiddetler olup floresans spektrofotometresi ile çözelti fazında elde edilen emisyon şiddetleri arasında bir bağlantı bulunmamaktadır). Şekil 4.37'de farklı bölgelerden elde edilen floresans şiddetlerinin değişimi gösterilmiştir. Şekilden de anlaşılacağı üzere her bir bölgenin floresans şiddetleri birbirine çok yakın çıkmıştır.

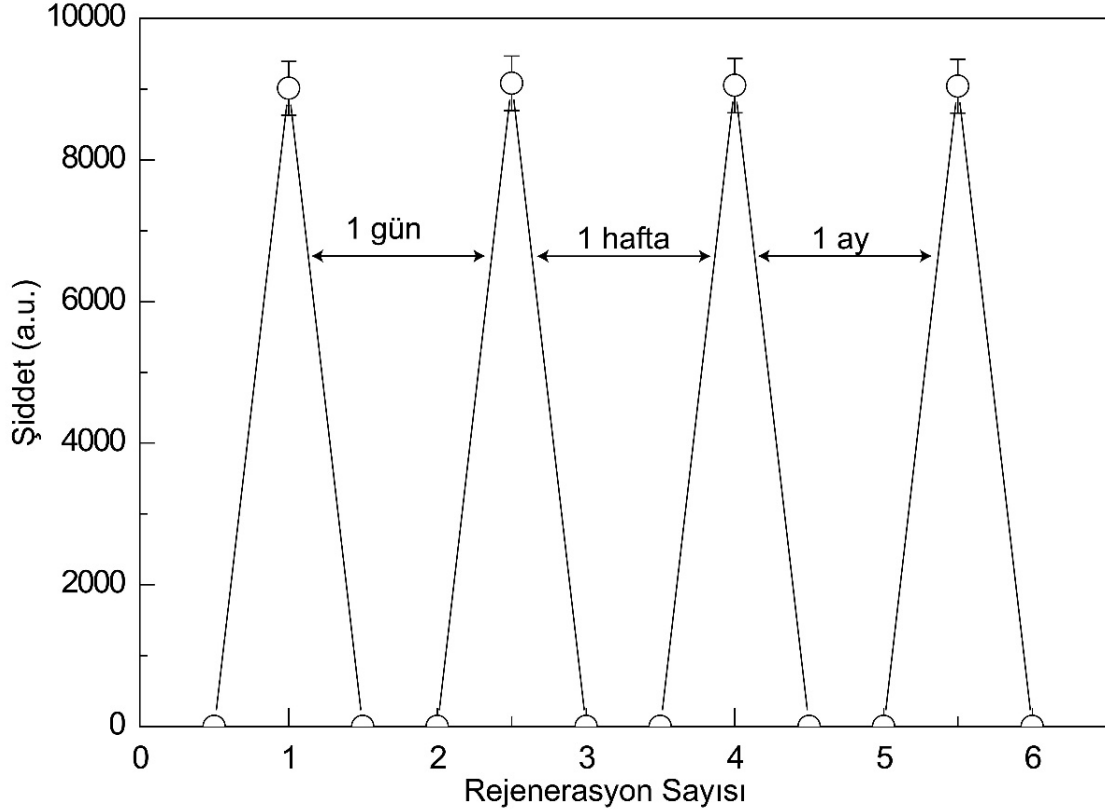
Sonuç olarak hem SERS hem de floresans analizi silisyum yüzeylerde homojen bir sandviç hibridizasyon yapıldığını göstermektedir.



Şekil 4.37. Sandviç hibridizasyona ait rastgele seçilen 15 farklı bölgeye ait floresans şiddetinin değişimi (İPV DNA derişimi: 10.0 nM).

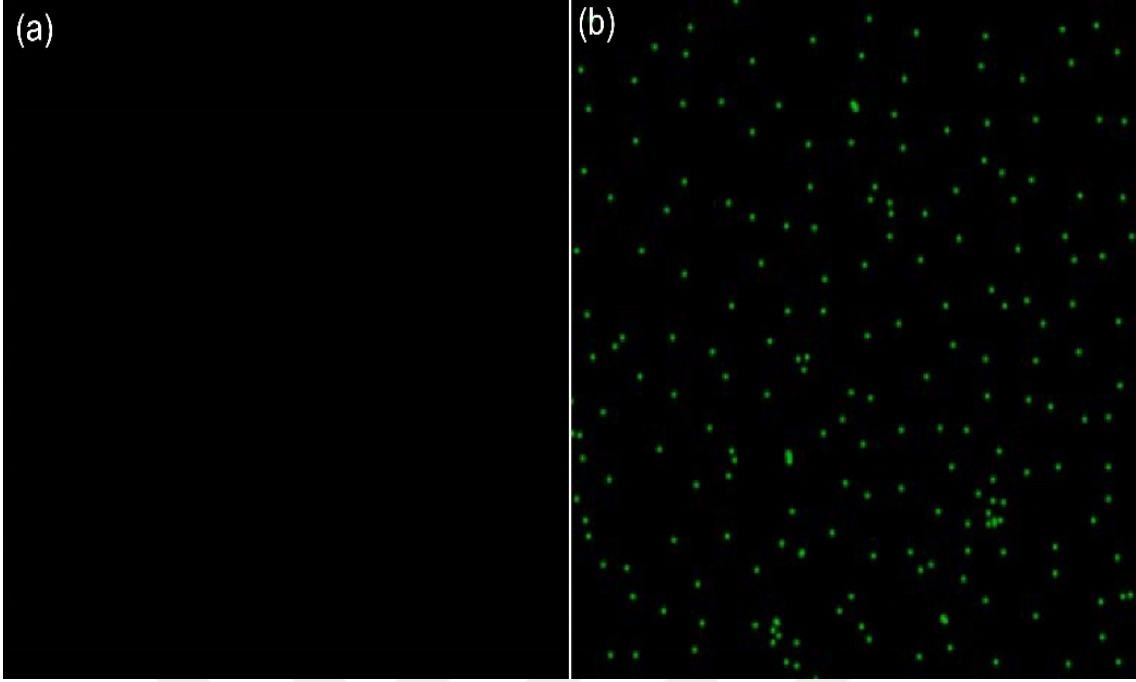
Bir DNA sensörün klinik uygulamalarda seçiciliğinin ve sensör yüzeyinin homojenliğinin yanı sıra sensörün stabilitesi, rejenerasyon sayısı hem yeniden kullanılabilirlik hem de maliyet açısından oldukça önemlidir. Çalışma kapsamında hazırlanan SERS/SEF tabanlı hibrit sistemin stabilitesi, rejenerasyon sayısı ile birlikte incelenmiştir. Prob ss-DNA bağlı silisyum yüzeyler İPV DNA bağlanıp “sandviç tip” hibridizasyon gerçekleştirildikten sonra yüzeyler %10'luk SDS çözeltisi içerisinde 50 °C'de bekletilmiş ve yüzeyler su ile yıkanp kurutularak SERS ve floresans mikroskobu analizine hazır hale getirilmiştir. Yüzeylerin nispeten daha derişik SDS çözeltisinde bekletilmesi DNA iplikçikleri arasındaki hidrojen bağlarını kopararak zincirlerin açılmasına ve sonunda hedef DNA'nın yüzeyden ayrılmasına neden olur. Bu işlem yüzey üzerinde kovalent olarak bağlı olan prob ss-DNA'nın yüzeydeki konumunu etkilemez ve sonuçta yüzeyler hibridizasyon öncesine çevrilmiş olur (Wang ve ark., 2012). Yüzeyler kurutulduktan sonra nispeten derişik SDS çözeltisinde bekletilerek yüzeylerden eşlenik-ss-DNA iplikçığının uzaklaşması sağlanmıştır. Bu aşamadan sonra tekrar hibridizasyon yapılarak SERS analizi gerçekleştirilmiş ve daha sonra yüzeyler buzdolabında (+4 °C)

belirli süreler bekletilerek rejenerasyon-hibridizasyon işlemleri tekrar edilmiştir. Şekil 4.38’de farklı günlerde rejenerasyon sayısı ile birlikte SERS şiddetlerindeki değişim verilmiştir. Grafik incelendiğinde birinci rejenerasyon ve bir gün buzdolabında bekletilmesinden sonra SERS şiddetlerinde herhangi bir değişiklik olmamış ve bu durum bir ay bekletme ve dördüncü rejenerasyon dahi geçerlidir.



Şekil 4.38. Hazırlanan sensörün rejenerasyon sayısı ve kararlılığının incelenmesi (1081 cm^{-1} dalga sayısındaki saçılma şiddeti referans olarak alınmıştır. Standart saplamalar beş farklı ölçüm sonucu elde edilmiştir. İPV DNA iplikçik derişimi: 10.0 nM).

Dizayn edilen sensörün rejenerasyon kabiliyeti aynı zamanda floresans mikroskobu ile de takip edilmiştir. Şekil 4.39a’da 4. rejenerasyon ve 1 ay bekletmeden sonra elde edilen floresans mikroskop görüntüsüne bakıldığında herhangi bir sinyal alınamamıştır. Bu durum yüzey üzerinde etiket ss-DNA bulunmadığının göstergesidir. Bu yüzey ile tekrar sandviç hibridizasyon gerçekleştirildiğinde homojen dağılım gösteren bir floresans deseni alınmıştır (Şekil 4.39b). Sonuç olarak hem SERS ile hem de floresans mikroskop sonuçları sensörün en az 4 defa kullanılabilmesinin yanı sıra en az 1 ay kararlı olduğunu göstermektedir.



Şekil 4.39. (a) 4. Rejenerasyon ve 1 ay bekletmeden sonra elde edilen floresans deseni ile (b) aynı yüzeylerin sandviç hibridizasyonunda kullanımı sonucu elde edilen floresans deseni (İPV DNA derişimi: 10.0 nM).

Çalışma kapsamında dizayn edilen sensörün, düşük LOD değerine sahip olması, seçici olması, sensör yüzeyinin homojen olması, rejenere özelliği ile kararlılığının iyi olması hem kalitatif hem de kantitatif analizinin yapılabilir olması sonucu sensörün klinik uygulamalarda kullanılabilme potansiyelini de doğurmaktadır. Klinik çalışmalarda hem hızlı ölçümlerin hem de minimum örnek kullanılma prensibi de göz önüne alındığında analitik bir cihaz olarak SERS'in klinik çalışmalarda kullanılan cihazlara alternatif olabilecek özellikte olduğu söylenebilir. Bu amaçla ticari olarak satın alınan kan eş değer madde kullanılmıştır. Kan eş değer madde içerisindeki büyük proteinler ilk olarak asetonitril ile çöktürülmüş ve santrifüj işleminin ardından ortamdan asetonitril uzaklaştırılmıştır. Elde edilen çözeltiye farklı derişimlerde İPV ss-DNA eklenmiş ve ardından sandviç hibridizasyon gerçekleştirilerek SERS analizi yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3.'te verilmiştir. Çizelge incelendiğinde geri kazanım oranının oldukça yüksek olması ve bağıl standart sapmaların oldukça düşük olması hazırlanan teşhis sisteminin klinik uygulamalar için kullanılabilirliğini destekler niteliktedir.

Çizelge 4.3. Kan eşdeğer maddeden İPV DNA örneklerinin hazırlanan sensör ile geri kazanımı.

İlave edilen İPD DNA derişimi	Bulunan DNA derişimi	% Geri kazanım ^a	% Bağlı standart sapma ^b
0	-	-	-
2.0 fM	1.96 ± 0.08 fM	98.0	4.08
10.0 fM	9.96 ± 0.39 fM	99.6	3.92
2.0 pM	1.99 ± 0.07 pM	99.5	3.52
10.0 pM	9.98 ± 0.31 pM	99.8	3.11
2.0 nM	2.00 ± 0.06 nM	100.0	3.00

^a Her bir derişim için beş farklı okumanın ortalama sonucudur.

^b bağlı standart sapma = (standart sapma/ortalama değer) X 100

Günümüzde klinik olarak İPV teşhisinde çeşitli moleküler ve moleküler olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Çıplak gözle muayene, kolkoskopi (bir mikroskop ve ışık yardımıyla serviksin görüntülendiği bir işlem) ya da serviksten alınan doku örneğinin sitolojik ve histolojik değerlendirilmesi yapılarak İPV teşhis edilmektedir. İPV teşhisinde kullanılan moleküler yöntemler ise üç ana başlık altında toplanmaktadır: (1) polimeraz zincir reaksiyonu (PCR); (2) Enzim bağlı immunosorbent assay (ELISA) ve (3) hibrid yakalama (hybrid capture, HC) yöntemleridir. Bahsi geçen bu yöntemler günümüzde sıklıkla kullanılsa da hastalıkların erken teşhisine imkân vermemektedir. ELISA testi temel olarak antijen-antikor etkileşimine dayanmaktadır. İPV teşhisinde kullanılan ELISA tekniğinde prob-antikor ilk olarak İPV antijenini yakaladıktan sonra antijen-antikor ikilisi bu sefer enzim bağlı ikinci bir antikor ile etkileştirilir. Ortama enzim substratının ilavesi ile gerçekleşen enzimatik reaksiyon sonucu ortamda bulunan ilave reaktifler renkli bir ürün oluşturur. Oluşan renkli ürünün emit ettiği ışığın miktarı uygun bir okuyucu ile anlamlı sinyallere dönüştürüldükten sonra İPV miktarı teşhis edilmiş olur. İPV teşhisinde ELISA testinin kullanılmasını kısıtlayan en önemli etken hastalığın erken teşhise imkân verememesidir. Hastalığın erken dönemlerinde antikor seviyesi düşük olduğundan bu yöntem ve diğer serolojik testler her zaman doğru sonuç vermeyebilir. İPV teşhisi için klinik olarak uygulanan ve ELISA testine göre daha avantajlı olan diğer bir yöntem ise PCR'dır. Bu yöntemde hastalıklı bireyde bulunan virüs DNA'sının bir bölümünün kopyalanması ve çoğaltılması esasına dayanır. Bu teknikte özel enzimlerin kullanılması, işlemlerin birden farklı sıcaklıklarda yapılıyor olması ve en az birkaç hafta hastalık evresinin olması gibi dezavantajları vardır. Hibrit yakalama yönteminde ise

yüksek riskli İPV'ler teşhis edilse bile bu yöntemle gruplar halinde bir başka deyişle birden fazla İPV çeşidi bulunması durumunda çalışmakta tek bir İPV teşhisine olanak vermemektedir. Çalışma kapsamında hazırlanan hibrit sistemin en önemli özelliği ELISA, PCR ve HC sistemlerinin bu dezavantajlarını karşılayacak düzeyde olmasıdır. Ayrıca SERS analizinin oldukça kısa süreli olması ve örneklerin analiz sırasında hiçbir zarar görmemesi gibi avantajları da vardır. Bununla birlikte hazırlanacak olan hibrit sistemin SEF ile de karakterize edilebilecek olması İPV teşhisinde histolojik olarak yapılan incelemelerin tamamlayıcısı olmasına aday özellikte olacağı düşünülmektedir.





5. SONUÇ

Çalışma kapsamında, SERS/SEF tabanlı silisyum nanotel/polimer fırça/nanopartikül hibrit sistemi hazırlanmış ve rahim ağzı kanserine sebep olan İPV genetik kodunun belirli bir parçasını içeren DNA iplikçiğinin hibridizasyonuna dayalı bir tanı sistemi hazırlanmıştır. Detaylı yüzey karakterizasyonu ile SERS/SEF analizi ile hazırlanan hibrit sistemin nihai hedef için uygun olduğu gösterilmiştir. Hazırlanan sensörün çok düşük LOD değerine sahip olması, kararlılığının ve tekrar kullanım sayısının iyi olması, hali hazırda klinikte kullanılan ELISA ve PCR gibi tekniklerin dezavantajlarını karşılar nitelikte olması, geliştirilen sensörün klinik uygulamalarda İPV teşhisinde kullanılması için umut verici olduğunu söylemek mümkündür. Sonuçları sunulan bu çalışmanın biyomedikal, biyoanaliz ve biyosensör uygulamaları açısından ülkemizde bir model çalışma olup bundan sonraki çalışmalara bir ışık tutacağı düşünülmektedir. Bununla birlikte, hazırlanan İPV tanı kitinin uzun vadede ve alanında uzman araştırmacılar tarafından yapılacak in vivo modellemeler ile hibridizasyon etkinliğinin belirlenmesinin klinik uygulamalarda büyük yarar sağlayacağını öngörmek ve önermek mümkündür. Diğer yandan, tez kapsamında model hastalık olarak İPV tercih edilmiştir. Hazırlanan sistemde farklı DNA dizilimleri ya da biyo-terör ajanları olan veba, difteri, şarbon, risin gibi toksinlerin antikorları bağlanarak hazırlanan sistemin kullanım alanı genişletilebilir. Bunların yanı sıra diğer hastalık belirteçleri olan örneğin Alzheimer hastalığının belirteci olan Tau proteinine özgü olan anti-Tau ya da akciğer kanseri hastalığının belirteci olan karsinio embriyonejik antijene özgü anti-CEA antikoru bağlanarak da farklı hastalıkların tayininde de kullanılabilir. Ayrıca bu yüzeylere hücre, enzim de bağlanarak farklı biyosensörler tasarlanabilir. Görüldüğü gibi hazırlanan düşünülen bu sistemin biyoyouygulaması açısından oldukça zengindir. Bu açıdan bakıldığında hazırlanan nanotel-polimer fırça hibrit sisteminin farklı hastalıkların teşhisinde de kullanılabilecek sensörlerin tasarımı da imkan sağlayacaktır. Ayrıca, önerilen iyileştirmeler ile uzun vadede çıktıların ticari ürüne dönüştürülebilmesi için tanı kitinin klinik uygulamalarının gerçekleştirilebileceği düşünüldüğünden ticari ve ekonomik katkısının yüksek olacağı düşünülmektedir. Hazırlanan hibrit sistem yüksek ekonomik getirisi olan yeni nesil nanoteknolojik tanı kitlerin hazırlanmasında alt yapı oluşturarak ülkemizde bu çalışmayı temel alarak yeni çalışmaların ortaya çıkmasına

olanak sağlayacaktır. Bununla birlikte, tez konusu ve çıktıları itibari ile Avrupa Birliği Horizon 2020 Çerçeve Programında yer alan “Sağlık, Demografik Değişim ve Refah”, “Sağlığın geliştirilmesi, hastalıkların önlenmesi hazırlık ve tarama” ve “Teşhisin İyileştirilmesi” tematik alanlarıyla ilgili olup uluslararası boyutta yapılacak çalışmalar için de önemli bir alt yapı oluşturma niteliği taşıdığı düşünölmektedir.



KAYNAKLAR

- Adam, H., Gopinath, S. C. B., Arshad, M. K. M., Adam, T., Hashim, U., 2019. Perspectives of nanobiotechnology and biomacromolecules in parkinson's disease. *Process Biochemistry*, **86**: 32-39.
- Addou, R., Wallace, R. M., 2019. Using photoelectron spectroscopy in the integration of 2d materials for advanced devices. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **231**: 94-103.
- Akhan, S.E., 2007. Ülkemizde servikal kanser epidemiyolojisi ve HPV serotipleri. *ANKEM Dergisi*, **21**: 96-98.
- Aspnes, D. E., 2014. Spectroscopic ellipsometry - past, present, and future. *Thin Solid Films*, **571**: 334-344.
- Bhalla, N., Jolly, P., Formisano, N., Estrela, P., 2016. Introduction to biosensors. *Essays in Biochemistry*, **60**: 1-8.
- Block, R. J., 1950. Estimation of amino acids and amines on paper chromatograms. *Analytical Chemistry*, **22**: 1327-1332.
- Bompart, B., Goto, A., Wattraint, O., Sarazin, C., Tsujii, Y., Gonzato, C., Haupt, K., 2015. Molecularly imprinted polymers by reversible chain transfer catalysed polymerization. *Polymer*, **78**: 31-36.
- Bradley, J., Barone, T.M., Mahe, C., Lewis, R., Luciani, S., 2005. Delivering cervical cancer prevention services in low-resource setting. *International Journal of Gynecology and Obstetrics*, **89**: 21-29.
- Campos-Ferreira, D.S., Nascimento, G.A., Souza, E.V.M., Souto-Maior, M.A., Arruda, M.S., Zanforlin, D.M.L., Ekert, M.F.H., Bruneska, D., Lima-Filho, J.L., 2013. Electrochemical DNA biosensor for human papillomavirus detection in real samples. *Analytica Chimica Acta*, **804**: 258-263.
- Casolaro, M., 1995. Vinyl polymers containing L-valine and L-leucine residues: Thermodynamic behavior of homopolymers and copolymers with n-isopropylacrylamide. *Macromolecules*, **28**: 2351-2358.
- Casolaro, M., Paccagnini, E., Mendichi, R., Ito, Y., 2005. Stimuli-responsive polymers based on l-phenylalanine residues: Protonation thermodynamics of free polymers and cross-linked hydrogels. *Macromolecules*, **38**: 2460-2468.
- Cate, D. M., Adkins, J. A., Mettakoonpitak, J., Henry, C. S., 2015. Recent developments in paper-based microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, **87**: 19-41.
- Ceyhan, M., 2007. İnsan papilloma virüsü (HPV) aşısı uygulamasında ülkemizde mevcut problemler. *ANKEM Dergisi*, **21**: 102-104.
- Chen, J., Liu, M., Chen, C., Gong, H., Gao, C., 2011. Synthesis and characterization of silica nanoparticles with well-defined thermoresponsive PNIPAM via a combination of raft and click chemistry. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **3**: 3215-3223.
- Chen, M., Wang, X., Yu, Y. H., Pei, Z. L., Bai, X. D., Sun, C., Huang, R. F., Wen, L. S., 2000. X-ray photoelectron spectroscopy and auger electron spectroscopy studies of Al-doped zno films. *Applied Surface Science*, **158**: 134-140.
- Chen, T., Shao M., Xu, H., Zhuo, S., Liu, S., Lee, S.-T., 2012. Molecularly imprinted polymer-coated silicon nanowires for protein specific recognition and fast separation. *Journal of Materials Chemistry*, **22**: 3990-3996

- Chen, W.-L., Cordero, R., Tran, H., Ober, C. K., 2017. 50th anniversary perspective: Polymer brushes: Novel surfaces for future materials. *Macromolecules*, **50**: 4089-4113.
- Civit, L., Fragoso, A., O'Sullivan, C.K., 2010. Electrochemical biosensor for the multiplexed detection of human papillomavirus genes. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**: 1684-1687.
- Cochran, E. W., Morse, D. C., Bates, F. S., 2003. Design of ABC triblock copolymers near the ODT with the random phase approximation. *Macromolecules*, **36**: 782-792.
- Cutts, F.T., Franceschi, S., Goldie, S., Castellsague, X., de Sanjose, S., Garnett, G., Edmunds, W.J., Claeys, P., Goldenthal, K.L., Harper, D.M., Markowitz, L., 2007. Human papilloma virus and HPV vaccines: A review. *Bulletin of the World Health Organization*, **85**: 719-726.
- Dehn, D., Torkko, K.C., Shroyer, K.R., 2007. Human papilloma virus testing and molecular markers of cervical dysplasia and carcinoma. *Cancer*, **111**: 1-12.
- Dell'Atti, D., Zavaglia, M., Tombelli, S., Bertacca, G., Cavazzana, A.O., Bevilacqua, G., Minunni, M., Mascini, M., 2007. Development of combined DNA-based piezoelectric biosensors for the simultaneous detection and genotyping of high risk human papilloma virus strains. *Clinica Chimica Acta*, **383**: 140-146.
- Ebrahimi, A., Ravan, H., Khajouei, S., 2019. DNA nanotechnology and bioassay development. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **114**: 126-142.
- Endo, T., Kerman, K., Nagatani, N., Takamura, Y., Tamiya, E., 2005. Label-free detection of peptide nucleic acid DNA hybridization using localized surface plasmon resonance based optical biosensor. *Analytical Chemistry*, **77**: 6976-6984.
- Fischer, H., 2001. The persistent radical effect: A principle for selective radical reactions and living radical polymerizations. *Chemical Reviews*, **101**: 3581-3610.
- Fu, W., Huang, Q., Wang, J., Liu, M., Huang, J., Chen, B., 2004. Detection of human papilloma virus with piezoelectric quartz crystal genesensors. *Sensors and Transducers*, **42**: 214-219.
- Fukuda, T., 2004. Fundamental kinetic aspects of living radical polymerization and the use of gel permeation chromatography to shed light on them. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **42**: 4743-4755.
- Georges, M. K., Veregin, R. P. N., Kazmaier, P. M., Hamer, G. K., 1993. Narrow molecular weight resins by a free-radical polymerization process. *Macromolecules*, **26**: 2987-2988.
- Gilfrich, J. V., Birks, L. S., 1984. Estimation of detection limits in x-ray fluorescence spectrometry. *Analytical Chemistry*, **56**(1), 77-79.
- Goto, A., Fukuda, T., 2004. Kinetics of living radical polymerization. *Progress in Polymer Science*, **29**: 329-385.
- Goto, A., Hirai, N., Wakada, T., Nagasawa, K., Tsuj, Y., Fukuda, T., 2008. Living radical polymerization with nitrogen catalyst: reversible chain transfer catalyzed polymerization with n-iodosuccinimide. *Macromolecules*, **41**: 6261-6264.
- Goto, A., Tsuji, Y., Fukuda, T., 2008. Reversible chain transfer catalyzed polymerization (RTCP): A new class of living radical polymerization. *Polymer*, **46**: 5177-5185.
- Goto, A., Zush, H., Hirai, N., Wakada, T., Kwak, Y., Fukuda, T., 2007. Germanium- and tin-catalyzed living radical polymerizations of styrene and methacrylates. *Macromolecular Symposia*, **248**: 126-131.

- Goto, A., Zush, H., Kwak, Y., Fukuda, T., 2006. Germanium- and tin-catalyzed living radical polymerizations of styrene. *ACS Symposium Series*, **944**: 595-603.
- Güner, H., Taşkıran, Ç., 2007. Epidemiology of cervical cancer and the role of human papilloma virus. *Türk Jinekoloji ve Obstetrik Derneği Dergisi*, **4**: 11-19.
- He, L., Musick, M. D., Nicewarner, S. R., Salinas, F. G., Benkovic, S. J., Natan, M. J., Keating, C. D., 2000. Colloidal Au-enhanced surface plasmon resonance for ultrasensitive detection of dna hybridization. *Journal of the American Chemical Society*, **122**: 9071-9077.
- Higaki, Y., Kobayashi, M., Hirai, T., Takahara, A., 2017. Direct polymer brush grafting to polymer fibers and films by surface-initiated polymerization. *Polymer Journal*, **50**: 101.
- Hong, S.ve Li, X., 2013. Optimal size of gold nanoparticles for surface-enhanced raman spectroscopy under different conditions. *Journal of Nanomaterials*, **2013**: 9.
- Hu, Y., Fine, D. H., Tasciotti, E., Bouamrani, A., Ferrari, M., 2011. Nanodevices in diagnostics: Wiley interdisciplinary reviews. *Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **3**: 11-32.
- İyibozkurt, A.C., Berkman, S., 2009. HPV testleri ve HPV tespitinde yeni yöntemler. *Türkiye Klinikleri Jinekoloji ve Obstetrik Dergisi*, **2**: 38-41.
- Jain, K. K., 2005. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. *Clinica Chimica Acta*, **358**: 37-54.
- Jimenez Jimenez, A. M., Rodrigo, M. A. M., Milosavljevic, V., Krizkova, S., Kopel, P., Heger, Z., Adam, V., 2017. Gold nanoparticles-modified nanomaghemite and quantum dots-based hybridization assay for detection of HPV. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **240**: 503-510.
- Jin, Q., Xu, J.-P., Ji, J.ve Shen, J.-C., 2008. Zwitterionic phosphorylcholine as a better ligand for stabilizing large biocompatible gold nanoparticles. *Chemical Communications*, **26**: 3058-3060.
- Johnson, P.A., Levicky, R., 2003. Polymercaptosiloxane anchor films for robust immobilization of biomolecules to gold supports. *Langmuir*, **19**: 10288-10294.
- Josefsson, A., Lıvak, K., Gyllensten, U., 1999. Detection and quantitation of human papillomavirus by using the fluorescent 59 exonuclease assay. *Journal of Clinical Microbiology*, **37**: 490-496.
- Kang, T., Yoo, S. M., Yoon, I., Lee, S. Y., Kim, B., 2010. Patterned multiplex pathogen DNA detection by au particle-on-wire SERS sensor. *Nano Letters*, **10**: 1189-1193.
- Kawai, J., 2010. Total reflection X-ray photoelectron spectroscopy: A review. *Journal of Electron Spectroscopy and Related Phenomena*, **179**: 268-272.
- Kim, W., Ng, J.K., Kunitake, M.E., Conklin, B.R., Yang, P.D., 2007. Interfacing silicon nanowires with mammalian cells. *Journal of American Chemical Society*, **129**: 7228-7229.
- Kimling, J., Maier, M., Okenve, B., Kotaidis, V., Ballot, H., Plech, A., 2006. Turkevich method for gold nanoparticle synthesis revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, **110**: 15700-15707.
- Kitano, H., Kago, H., Matsuura, K., 2009. Temperature-responsive polymer brush constructed on a colloidal gold monolayer. *Journal of Colloid and Interface Science*, **331**: 343-350.
- Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., & Dasari, R.R., 2002. Surface-enhanced raman scattering and biophysics. *Journal of Physics Condensed Matter* **14**: 597-624.

- Kodama, Y., Barsbay, M., Güven, O., 2014. Radiation-induced and RAFT-mediated grafting of poly(hydroxyethyl methacrylate) (PHEMA) from cellulose surfaces. *Radiation Physics and Chemistry*, **94**: 98-104.
- Kong, X., Yu, Q., Zhang, X., Du, X., Gong, H.ve Jiang, H., 2012. Synthesis and application of surface enhanced raman scattering (SERS) tags of Ag@SiO₂ core/shell nanoparticles in protein detection. *Journal of Materials Chemistry*, **22**: 7767-7774.
- Krishnamoorthy, M., Hakobyan, S., Ramstedt, M., Gautrot, J. E., 2014. Surface-initiated polymer brushes in the biomedical field: Applications in membrane science, biosensing, cell culture, regenerative medicine and antibacterial coatings. *Chemical Reviews*, **114**: 10976-11026.
- Kumar, S., Nehra, M., Kedia, D., Dilbaghi, N., Tankeshwar, K., Kim, K.-H., 2019. Nanotechnology-based biomaterials for orthopaedic applications: Recent advances and future prospects. *Materials Science and Engineering: C*, **1**: 169-176.
- Kwak, M., Han, L., Chen, J.J., Fan, R., 2015. Interfacing inorganic nanowire arrays and living cells for cellular function. *Analysis Small*, **11**: 5600-5610.
- Lederman, L., 2007. High-content screening. *BioTechniques*, **43**: 25-27.
- Li, J.-M., Ma, W.-F., You, L.-J., Guo, J., Hu, J., Wang, C.-C., 2013. Highly sensitive detection of target ss-dna based on SERS liquid chip using suspended magnetic nanospheres as capturing substrates. *Langmuir*, **29**: 6147-6155.
- Lin, L., Guo, S., Sun, X., Feng, J., Wang, Y., 2010. Synthesis and photoluminescence properties of porous silicon nanowire arrays. *Nanoscale Research Letters*, **5**: 1822.
- Liu, X.-H., Zhang, G.-B., Lu, X.-F., Liu, J.-Y., Pan, D., Li, Y.-S., 2006. Dibenzyl trithiocarbonate mediated reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization of acrylonitrile. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **44**: 490-498.
- Liu, Y., Wu, P., 2013. Meditating metal coenhanced fluorescence and SERS around gold nanoaggregates in nanosphere as bifunctional biosensor for multiple DNA targets. *ACS Applied and Materials and Interfaces*, **5**: 5832-5844.
- Liz-Marzán, L. M., Giersig, M.ve Mulvaney, P., 1996. Synthesis of nanosized gold-silica core-shell particles. *Langmuir*, **12**: 4329-4335.
- Matyjaszewski, K., Gaynor, S., Wang, J-S., 1995. Controlled radical polymerizations: The use of alkyl iodides in degenerative transfer. *Macromolecules*, **28**: 2093-2095.
- Mehrotra, P., 2016. Biosensors and their applications. *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, **6**: 153-159.
- Milde-Langosch, K., Riethdorf, S., Löning, T., 2000. Association of human papillomavirus infection with carcinoma of the cervix uteri and its precursor lesions: Theoretical and practical implications. *Virchows Archiv* **437**: 227-33.
- Miura, Y., Yamauchi, T., Sato, H., Fukuda, T.2008. The self-assembled monolayer of saccharide via click chemistry: Formation and protein recognition. *Thin Solid Films*, **516**: 2443-2449.
- Mori, H., Matsuyama, M., Sutoh, K., Endo, T., 2006. RAFT polymerization of acrylamide derivatives containing l-phenylalanine moiety. *Macromolecules*, **39**: 4351-4360.

- Motoyama, S., Ladines-Llave, C.A., Villanueva, S.L., Mauro, T., 2004. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe Journal of Medical Sciences*, **50**: 9-19.
- Nasirizadeh, N., Zare, H.R., Pournaghi-Azar, M.H., Hejazi, M.S., 2011. Introduction of hematoxylin as an electroactive label for DNA biosensors and its employment in detection of target DNA sequence and single-base mismatch in human papilloma virus corresponding to oligonucleotide. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**: 2638-2644.
- Nath, N., Chilkoti, A., 2004. Label-free biosensing by surface plasmon resonance of nanoparticles on glass: Optimization of nanoparticle size. *Analytical Chemistry*, **76**: 5370-5378.
- Olivier, A., Meyer, F., Raquez, J.-M., Damman, P., Dubois, P., 2012. Surface-initiated controlled polymerization as a convenient method for designing functional polymer brushes: from self-assembled monolayers to patterned surfaces. *Progress in Polymer Science*, **37**: 157-181.
- Öztürk, E., Turan, E., Caykara, T., 2010. Fabrication of ultrahydrophobic poly(lauryl acrylate) brushes on silicon wafer via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Applied Surface Science*, **257**: 1015-1020.
- Pal, S., Yadav, A.R., Lifson, M.A., Baker, J.E., Fauchet, P.M., Miller, B.L., 2013. Selective virus detection in complex sample matrices with photonic crystal optical cavities. *Biosensors and Bioelectronics*, **44**: 229-234.
- Palantavida, S., Guz, N.V., Woodworth, C.D., Sokolov, I., 2013. Ultrabright fluorescent mesoporous silica nanoparticles for prescreening of cervical cancer. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **9**: 1255-1262.
- Pelton, R., 2009. Bioactive paper provides a low-cost platform for diagnostics. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **28**: 925-942.
- Peng, K. Q., Hu, J. J., Yan, Y. J., Wu, Y., Fang, H., Xu, Y., Lee, S. T., Zhu, J., 2006. Fabrication of single-crystalline silicon nanowires by scratching a silicon surface with catalytic metal particles. *Advanced Functional Materials*, **16**: 387-394.
- Petit, T., Puskar, L., 2018. FTIR spectroscopy of nanodiamonds: Methods and interpretation. *Diamond and Related Materials*, **89**: 52-66.
- Pirri, G., Chiari, M., Damin, F., Meo, A., 2006. Microarray glass slides coated with block copolymer brushes obtained by reversible addition chain-transfer polymerization. *Analytical Chemistry*, **78**: 3118-3124.
- Scott, M., Nakagawa, M., Moscicki, B., 2001. Cell-mediated immune response to human papillomavirus infection. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, **8**: 209-220.
- Sehr, P., Müller, M., Höpfl, R., Widschwendter, A., Pawlita, M., 2002. HPV antibody detection by ELISA with capsid protein L1 fused to glutathione s-transferase. *Journal of Virological Methods*, **106**: 61-70.
- Shalek, A.K., Robinson, J.T., Karp, E.S., Lee, J.S., Ahn, D.R., Yoon, M.H., Sutton, A., Jorgolli, M., Gertner, R.S., Gujral, T.S., MacBeath, G., Yang, E.G., Park, H., 2010. Vertical silicon nanowires as a universal platform for delivering biomolecules into living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **107**: 1870-1875.
- Shamsipur, M., Nasirian, V., Mansouri, K., Barati, A., Veisi-Raygani, A., Kashanian, S., 2017. A highly sensitive quantum dots-dna nanobiosensor based on fluorescence resonance energy transfer for rapid detection of nanomolar amounts of human

- papillomavirus 18. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **136**: 140-147.
- Shi, W.S., Peng, H.Y., Zheng, Y.F., Wang, N., Shang, N.G., Pan, Z.W., Lee, C.S., Lee, S.T., 2000. Synthesis of large areas of highly oriented, very long silicon nanowires. *Advanced Materials*, **12**: 1343-1345.
- Siddiqui, M. A. Q., Ali, S., Fei, H., Roshan, H., 2018. Current understanding of shale wettability: A review on contact angle measurements. *Earth-Science Reviews*, **181**: 1-11.
- Singh, T. A., Lantigua, D., Meka, A., Taing, S., Pandher, M., Camci-Unal, G., 2018. Paper-based sensors: Emerging themes and applications. *Sensors*, **18**: 1-9.
- Siqueira Petri, D. F., Wenz, G., Schunk, P., Schimmel, T., 1999. An improved method for the assembly of amino-terminated monolayers on SiO₂ and the vapor deposition of gold layers. *Langmuir*, **15**(13): 4520-4523.
- Stanley, M.A., Pett, M.R., Coleman, N., 2007. HPV: from infection to cancer. *Biochemical Society Transactions*, **35**: 1456-1460.
- Stoler, M.H., 2000. Human papillomaviruses and cervical neoplasia: A model for carcinogenesis. *International Journal of Gynecological Pathology*, **19**: 16-28.
- Sun, Y., Ma, W., Yang, Y., He, M., Li, A., Bai, L., Yu, B., Yu, Z., 2019. Cancer nanotechnology: Enhancing tumor cell response to chemotherapy for hepatocellular carcinoma therapy. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*, In Press.
- Tang, C., Kowalewski, T., Matyjaszewski, K., 2003. Preparation of polyacrylonitrile-block-poly(n-butyl acrylate) copolymers using atom transfer radical polymerization and nitroxide mediated polymerization processes. *Macromolecules*, **36**: 1465-1473.
- Tanishima, M., Goto, A., Lei, L., Ohtsuki, A., Kaji, H., Nomura, A., Tsujii, Y., Yamaguchi, Y., Komatsu, H., Miyamoto, M., 2014. Macromolecular architectures designed by living radical polymerization with organic catalysts. *Polymers*, **6**: 311.
- Tokareva, I., Minko, S., Fendler, J. H., Hutter, E., 2004. Nanosensors based on responsive polymer brushes and gold nanoparticle enhanced transmission surface plasmon resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, **126**: 15950-15951.
- Turan, E., Caykara, T., 2010. Construction of hydroxyl-terminated poly(N-isopropylacrylamide) brushes on silicon wafer via surface-initiated atom transfer radical polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **48**: 3880-3887.
- Turan, E., Caykara, T., 2011. A facile route to end-functionalized poly(N-isopropylacrylamide) brushes synthesized by surface-initiated SET-LRP. *Reactive and Functional Polymers*, **71**: 1089-1095.
- Turan, E., Demirci, S., Caykara, T., 2010. Synthesis of thermoresponsive poly(n-isopropylacrylamide) brush on silicon wafer surface via atom transfer radical polymerization. *Thin Solid Films*, **518**: 5950-5954.
- Underwood, S.ve Mulvaney, P., 1994. Effect of the solution refractive index on the color of gold colloids. *Langmuir*, **10**: 3427-3430.
- Urrego, L.F., Lopez, D.I., Ramirez, K.A., Ramirez, C., Osma, J.F., 2015. Biomicrosystem design and fabrication for the human papilloma virus detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **207**: 97-104.

- VanDersarl, J.J., Xu, A.M., Melosh, N.A., 2012. Nanostraws for direct fluidic intracellular access. *Nano Letters* **12**: 3881-3886.
- Vernon, S.D., Farkas, D.H., Unger, E.R., Chan, V., Miller, D.L., Chen, Y-P., Blackburn, G.F., Reeves, W.C., 2003. Bioelectronic DNA detection of human papillomaviruses using esensor™: A model system for detection of multiple pathogens. *BMC Infectious Diseases*, **3**: 12-22.
- Wang, F., Widejko, R. G., Yang, Z., Nguyen, K. T., Chen, H., Fernando, L. P., Christensen, K. A., Anker, J. N., 2012. Surface-enhanced raman scattering detection of pH with silica-encapsulated 4-mercaptobenzoic acid-functionalized silver nanoparticles. *Analytical Chemistry*, **84**: 8013-8019.
- Wang, H., Wang, L., Zhang, P., Yuan, L., Yu, Q., Chen, H., 2011. High antibacterial efficiency of pDMAEMA modified silicon nanowire arrays. *Colloids and Surface B*, **83**: 355-359.
- Wang, H., Wang, Y., Yuan, L., Wang, L., Yang, W., Wu, Z., Li, D., Chen, H., 2013. Thermally responsive silicon nanowire arrays for native/denatured-protein separation. *Nanotechnology*, **24**: 105101.
- Wang, J. H., Bartlett, J. D., Dunn, A. C., Small, S., Willis, S. L., Driver, M. J., 2005. The use of rhodamine 6g and fluorescence microscopy in the evaluation of phospholipid-based polymeric biomaterials. *Journal of Microscopy*, **217**: 216-224.
- Wang, L., Wang, H., Yuan, L., Yang, W., Wu, Z., Chen, H., 2011. Step-wise control of protein adsorption and bacterial attachment on a nanowire array surface: tuning surface wettability by salt concentration. *Journal of Materials Chemistry*, **21**: 13920-13925.
- Wang, X., Ishii, Y., Ruslinda, A. R., Hasegawa, M., Kawarada, H., 2012. Effective surface functionalization of nanocrystalline diamond films by direct carboxylation for PDGF detection via aptasensor. *ACS Applied Materials & Interfaces*, **4**: 3526-3534.
- Wang, X., Lou, X., Wang, Y., Guo, Q., Fang, Z., Zhong, X., Mao, H., Jin, Q., Wu, L., Zhao, H., Zhao, J., 2010. QDs-DNA nanosensor for the detection of hepatitis b virus DNA and the single-base mutants. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**: 1934-1940.
- Wang, Y. Q., Ma, S., Yang, Q. Q., Li, X. J., 2012. Size-dependent SERS detection of r6g by silver nanoparticles immersion-plated on silicon nanoporous pillar array. *Applied Surface Science*, **258**: 5881-5885.
- Wolpers, A., Ackermann, L., Vana, P., 2011. H-Phosphonic acid derivatives as catalysts for reversible chain transfer catalyzed polymerization (RTCP) at ambient and high pressure. *Macromolecular Chemistry and Physics*, **212**: 259-265.
- Xi, Y., Zhang, W., Fan, Z., Ma, Q., Wang, S., Ma, D., Jiang, Z., Li, H., Zhang, Y., 2018. A facile synthesis of silicon nanowires/micropillars structure using lithography and metal-assisted chemical etching method. *Journal of Solid State Chemistry*, **258**: 181-190.
- Yang, W., Zhou, F., 2017. Polymer brushes for antibiofouling and lubrication. *Biosurface and Biotribology*, **3**: 97-114.
- Yu-Hong, W., Rui, C., Ding, L., 2011. A quantum dots and superparamagnetic nanoparticle-based method for the detection of HPV DNA. *Nanoscale Research Letters*, **6**: 461-469.

- Zdyrko, B., Klep, V., Luzinov, I., 2003. Synthesis and surface morphology of high-density poly(ethylene glycol) grafted layers. *Langmuir*, **19**: 10179-10187.
- Zelikin, A.N., Such, G.K., Postma, A., Caruso, F., 2007. Poly(vinylpyrrolidone) for bioconjugation and surface ligand immobilization. *Biomacromolecules*, **8**: 2950-2953.
- Zengin, A., Caykara, T., 2011. Formation and properties of surface-anchored amine-terminated poly(dimethylsiloxane) assemblies with tunable physico-chemical characteristics. *Thin Solid Films*, **519**: 3135-3140.
- Zengin, A., Caykara, T., 2011. Immobilization of immunoglobulin G in a highly oriented manner on a protein-A terminated multilayer system. *Applied Surface Science*, **257**: 2111-2117.
- Zengin, A., Caykara, T., 2012. Controlling immunoglobulin g orientation on a protein-a terminated bilayer system. *Materials Science and Engineering: C*, **32**: 1107-1111.
- Zengin, A., Caykara, T., 2012. RAFT-Mediated synthesis of poly(oligoethylene glycol) methyl ether acrylate brushes for biological functions. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **50**: 4443-4450.
- Zengin, A., Tamer, U.ve Caykara, T., 2015. Fabrication of a SERS based aptasensor for detection of ricin b toxin. *Journal of Materials Chemistry B*, **3**: 306-315.
- Zengin, A., Yildirim, E., Caykara, T., 2013. RAFT-Mediated synthesis and temperature-induced responsive properties of poly(2-(2-methoxyethoxy)ethyl methacrylate) Brushes. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, **51**: 954-962.
- Zhang, Q.ve Subramanian, V., 2007. DNA hybridization detection with organic thin film transistors: Toward fast and disposable DNA microarray chips. *Biosensors and Bioelectronics*, **22**: 3182-3187.
- Zhang, X., Guo, Q., Cui, D., 2009. Recent Advances in Nanotechnology Applied to Biosensors. *Sensors*, **9**: 1033-1053.
- Zhang, X., Kong, X., Lv, Z., Zhou, S., Du, X. Bifunctional quantum dot-decorated Ag@SiO₂ nanostructures for simultaneous immunoassays of surface-enhanced raman scattering (SERS) and surface-enhanced fluorescence (SEF). *Journal of Materials Chemistry B*, **1**: 2198-2204.
- Zhang, X., Kong, X., Lv, Z., Zhou, S.ve Du, X., 2013. Bifunctional quantum dot-decorated Ag@SiO₂ nanostructures for simultaneous immunoassays of surface-enhanced raman scattering (SERS) and surface-enhanced fluorescence (SEF). *Journal of Materials Chemistry B*, **1**: 2198-2204.
- Zhou, X., Liu, X., Xie, Z., Zheng, Z., 2011. 3D-patterned polymer brush surfaces. *Nanoscale*, **3**: 4929-4939.

ÖZ GEÇMİŞ

1987 yılında Kütahya'nın Tavşanlı ilçesinde doğdu. İlköğretimi ve liseyi sırasıyla Tavşanlı Fatih İlköğretim Okulu ve Tavşanlı Anadolu Öğretmen Lisesi'nde tamamladı. 2007 yılında girdiği Orta Doğu Teknik Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği'nden 2011 yılında mezun oldu. 2013-2014 yılında Yeni Yüzyıl Üniversitesi'nde İş Sağlığı ve Güvenliği Anabilim Dalı'nda tezsiz yüksek lisans yaptı ve girdiği sınav neticesinde B sınıfı İş Güvenliği Uzmanlığı Belgesi almaya hak kazandı. 2014 yılında Yüzüncü Yıl Üniversitesi Mühendislik-Mimarlık Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'ne Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı kapsamında Araştırma Görevlisi olarak atandı ve burada yüksek lisans eğitimine başladı. 2016 yılının haziran ayında yüksek lisans eğitimini başarıyla tamamladı ve aynı yılın Eylül ayında Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı'nda doktora eğitimine başladı. 2019 Kasım ayında üniversitedeki araştırma görevlisi kadrosundan istifa ederek TÜBİTAK-TEYDEB'de Bilimsel Programlar Uzmanı olarak çalışmaya başladı ve halen çalışmaktadır.

T.C
VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
LİSANSÜSTÜ TEZ ORJİNALLİK RAPORU

Tarih: 13/01/2021

Tez Başlığı : İnsan Papilloma Virüs Teşhisi İçin Nanotel-Polimer Fırça Hibrit Sistemlerin Hazırlanması

Yukarıda başlığı belirlenen tez çalışmamın Kapak sayfası, Giriş, Ana bölümler ve Sonuç bölümlerinden oluşan toplam 125 sayfalık kısmına ilişkin, 13/01/2021 tarihinde şahsım tarafından Turnitin intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtreleme uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı %4 (yüzde dört) 'tür.

Uygulanan filtreler aşağıda verilmiştir:

- Kabul ve onay sayfası hariç,
- Teşekkür hariç,
- İçindekiler hariç,
- Simge ve kısaltmalar hariç,
- Gereç ve yöntemler hariç,
- Kaynakça hariç,
- Alıntılar hariç,
- Tezden çıkan yayınlar hariç,
- 7 kelimeden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç (Limit inatch size to 7 words)

Van Yüzüncü Yıl Üniversitesi Lisansüstü Tez Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılmasına İlişkin Yönergeyi inceledim ve bu yönergede belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

13/01/2021

Adı Soyadı: Mehmet Utku BADAĞ

Öğrenci No: 169101053

Anabilim Dalı: Kimya Mühendisliği Anabilim Dalı

Programı: Kimya Mühendisliği

Statüsü: Y. Lisans ☐

Doktora ☒

DANIŞMAN ONAYI
UYGUNDUR

ENSTİTÜ ONAYI
UYGUNDUR

Doç. Dr. Adem ZENGİN