

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

BELİRLİ MİKOPLAZMA TÜRLERİNİN
TANISINA YÖNELİK OPTİK
BİYOSENSÖR TASARIMI

Burcu İNANÇ
Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

GEBZE
2008

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BELİRLİ MİKOPLAZMA TÜRLERİNİN
TANISINA YÖNELİK OPTİK
BİYOSENSÖR TASARIMI

Burcu İNANÇ
Yüksek Lisans Tezi
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Ferruh ÖZCAN

II. DANIŞMAN
Yrd. Doç. Dr. A. Yavuz ORAL

GEBZE
2008



**GEBZE YÜKSEK
TEKNOLOJİ
ENSTİTÜSÜ**

**MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
JÜRİ ONAY FORMU**

JÜRİ

ÜYE (BAŞKAN) : **Prof. Dr. Füsun Gümüşel**

ÜYE (Danışman) : **Doç. Dr. Ferruh Özcan**

ÜYE (II. Danışman) : **Doç. Dr. A. Yavuz Oral**

ÜYE : **Doç. Dr. M. Hasan Aslan**

Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .../...../..... tarih ve/..... sayılı kararı ile yukarıdaki öğretim elemanlarından oluşmuş jüri tarafından düzenlenen 12/05/2008 tarihli Tez Savunma Tutanağı neticesinde **Yüksek Lisans** / Doktora öğrencisi **Burcu İnanc**'ın çalışması GYTE Mühendislik ve Fen Bilimleri Yönetim Kurulu/...../..... tarih ve /.... /..... sayılı kararıyla **Moleküler Biyoloji** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** / Doktora tezi olarak onaylanmıştır.

İMZA/MÜHÜR

ÖZET

TEZİN BAŞLIĞI: Belirli mikoplazma türlerinin tanısına yönelik optik biyosensör tasarımı

YAZAR ADI: Burcu İNANÇ

Hücre kültürü çalışmaları, tıbbi ve biyolojik bilimlerin yanısıra, kanser kök hücre araştırmalarında da en önemli deney sistemlerinden biridir. Mikoplazma kontaminasyonları ilgili deneylerin sonuçlarını güvenilir kılmakta, değerli hücre soylarının kaybolmasına, materyal ve zaman kaybına neden olmaktadır. Bakteri ve mantar enfeksiyonlarının aksine, mikoplazmaların, hücre kültürlerinde gözle görülen değişiklikler oluşturmamasından dolayı, araştırmacı tarafından belirlenmeleri oldukça uğraştırıcı ve zordur. Çalışmamızda hücre ve doku kültürlerinde kontaminasyona neden olan belirli mikoplazma türlerinin hızlı ve etkin bir biçimde belirlenmesine yönelik SPR temelli ve dalga kılavuzu temelli sol-jel tabanlı optik biyosensörlerin tasarlanması hedef alınmıştır.

SPR temelli DNA biyosensörü oluşturulması amacıyla mikoplazma 16SrDNA'sına özgül tiyol modifiye DNA problemleri, altın yüzeyine immobilize edilerek, yüzey özellikleri SEM ile incelenmiştir. Tiyol modifiye problemlerin yüzeye adsorpsiyonunu takiben, biyosensörün DNA hibridizasyon verimliliği, eşlenik sentetik oligonükleotitler kullanılarak belirlenmiştir. Deneysel olarak, çeşitli laboratuvarlardan toplanarak mikoplazma bakımından incelenmiş hücre kültürlerine ait denature PCR ürünleri ve genomik DNA örnekleri kullanılmıştır. Tasarımı yapılan SPR temelli biyosensörün, sentetik oligonükleotitler ve mikoplazma 16S rDNA'sından çoğaltılan PCR ürünlerine özgül ve tekrar tekrar kullanılabilir olduğu gösterilmiştir. Fakat mikoplazmaya ait genomik DNA örnekleriyle yapılan ölçümlerde, kırılma indisi değişimine (ΔRIU) rastlanmamıştır.

Sol-jel yapıda optik dalgakılavuzu temelli DNA biyosensörü, boyut artışı nedeniyle, SPR temelli biyosensörlere göre yaklaşık 100 kat artmış hassaslığa sahiptir. Bunun yanısıra, sol-jel matrisi hibridizasyon reaksiyonu ve

biyomoleküllerin kararlılığını sağlamak üzere sulu bir ortam sunmaktadır. Sol-jel yapısındaki sensör yüzeyinin prizma çiftleyici cihazında dalgakılavuzu olarak kullanılabileceği gösterilmiştir. Prizma çiftleyici ile yapılan efektif refraktif indis ölçümleri, amin modifiye tek zincirli DNA probunun sol-jel yüzeyine amin kimyasıyla başarılı bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. İmmobilizasyonun oranı, eşlenik floresan işaretli oligonükleotitler kullanılarak floresan mikroskopunda incelenmiştir. Her ne kadar bağlanmış oligonükleotitlerin miktarını sayısal olarak belirlemek zor olsa da kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında, elde edilen floresan yoğunlukları tatmin edicidir. Gelecekte, 16SrDNA'ya özgül problemlerin sol-jel yüzeyinde immobilizasyonunun geliştirilmesi ve yüzeyin optik, mikroskopik aletler kullanılarak karakterize edilmesi planlanmaktadır.

Bu çalışmada, geliştirilen SPR temelli DNA biyosensörü şu an için mikoplazma genomik DNA'sının belirlenmesi için yeterli duyarlılıkta değildir, fakat sentetik oligonükleotitler ve PCR ürünlerinin analizi için etkin bir sistem olarak ortaya çıkmaktadır. Bundan dolayı, bu koşullar altında SPR sinyalinin arttırabilmek için, hedef DNA molekülleri floresan veya kütle artışı sağlayacak işaretlerle, birleştirilmelidir. Ancak, SPR biyosensörlerine göre yaklaşık 100 kat daha hassas olduğundan, sol-jel temelli mikoplazma özgül biyosensörde, bu gereklilik ortadan kaldırılabilir.

Anahtar kelimeler: Biyosensör, hücre kültürü, mikoplazma, yüzey plazmon rezonans (SPR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), kırınım indisi değişimi (ΔRIU).

SUMMARY

TITLE OF THESIS: Development of optic biosensors to detect certain mycoplasma species

AUTHOUR: Burcu İNANÇ

Cell culture systems are important tools for basic research in medicine and biological sciences as well as for the stem cell and cancer research. Mycoplasma contaminations cause unreliable results in cell culture experiments leading to loss of valuable cell lines, materials, and time. Unlike from bacterial and fungal contamination, mycoplasma does not produce any visible change in cell cultures making its detection a very cumbersome and formidable task for the scientist. In this study we aimed to develop a novel optical DNA biosensor based on SPR and a sol-gel based optical waveguide sensor for fast and effective detection of Mycoplasmas in cell cultures.

In order to construct a DNA biosensor based on SPR, thiol-derivatised DNA probes specific to mycoplasma 16S rDNA are directly immobilized onto gold surface and the characterization of the surface was made by SEM. Following adsorption of modified oligonucleotides onto surface, DNA hybridization efficiency was tested using complementary synthetic oligonucleotides. Experimental set up included both denaturized PCR products and genomic DNA samples isolated from tested cell cultures collected from various laboratories. We demonstrated that the designed SPR based biosensor was reproducible and robust for the specific hybridization reactions with synthetic oligonucleotides and specific PCR products from mycoplasma 16S rDNA. However, we were not able to produce significant refractive index (ΔRIU) change with the mycoplasma genomic DNA samples.

Sol-gel based optical waveguide DNA biosensor promises ~100 fold increased sensitivity compared to SPR based sensors due to the increased dimension. Besides sol-gel matrix provides aqueous environment for the hybridization reaction

and for the stability of biomolecules. It has been shown that the sensor surface in the sol-gel structure can be used as a waveguide in the prism coupler. The effective refractive index measurements made by prism coupler have suggested that the amine-derivatised ss-DNAs successfully immobilized on the sol-gel surface via amine chemistry. Primarily we tested the immobilization efficiency by using fluorescent labeled complementary oligonucleotides to the immobilized probes under fluorescent microscope. Although it is quantitatively hard to calculate bound oligonucleotides, the relative fluorescent intensities suggest that there is a decent amount of bound oligonucleotide compared to control samples. We are planning to further characterize and improve the sol-gel immobilization of 16S rDNA specific probes using both optic and microscopic instruments.

SPR based DNA sensor designed in this study is currently below the required resolution level for detecting mycoplasma genomic DNA but it appears rather efficient for detecting synthetic oligonucleotides and PCR products. Therefore under defined circumstances either fluorescent or bulk tag should be conjugated to target DNA molecules to enhance SPR signal. However, sol-gel based mycoplasma specific biosensor may remove this requirement by providing ~100 fold increased sensitivity over SPR based sensors.

Key words: Biosensor, cell culture, mycoplasma, surface plasmon resonance (SPR), scanning electron microscopy (SEM), polymerase chain reaction (PCR), refractive index change (ΔRIU).

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince görüş ve önerileriyle beni yönlendiren, her türlü yardım ve desteğini esirgemeyen, değerli bilgi birikiminden faydalandığım hocam ve danışmanım Doç. Dr. Ferruh Özcan'a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunuyorum.

Tez çalışmam esnasında bana yardımcı olan ve fikirlerini benimle paylaşan II. Danışmanım Doç. Dr. A. Yavuz Oral'a, Doç. Dr. M. Hasan Aslan'a ve İstanbul Teknik Üniversitesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Araştırma Görevlisi Urartu Ş. Şeker'e çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın son halini almasındaki katkı ve önerileri için hocam Prof. Dr. Füsün Gümüşel'e teşekkür ederim. Bu çalışma esnasında benden yardımlarını esirgemeyen tüm laboratuvar arkadaşlarıma ayrıca teşekkür ederim.

Öğrenim hayatım boyunca maddi ve manevi yardımlarını esirgemeyen, anneme ve tüm aileme, her zaman yanımda olan sevgili arkadaşım Serkan Onur'a ve Karamel'ime sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iii
SUMMARY	v
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
1. GİRİŞ	1
1.1 Biyomoleküllerin İmmobilizasyonu	3
1.1.1. Adsorpsiyon	3
1.1.2. Mikro-Kapsülleme	3
1.1.3. Kovalent Bağlama	4
1.1.4. Çapraz Bağlama	4
1.2. DNA Molekülü ve Yapısı	4
1.3. DNA Hibridizasyon Biyosensörleri	7
1.4. Katı Yüzeyler Üzerinde DNA Hibridizasyonu	7
1.4.1. Hibridizasyon Verimliliği ve Duyarlılığı	8
1.4.2. Prob Oligonükleotit Yapı ve Dinamiği	9
1.4.2.1 Prob Uzunluğu ve Konumu	9
1.4.1.2. Prob'un Yüzey Konsantrasyonu	10
1.4.1.3. İyonik Kuvvet	10
1.4.1.4. Sıcaklık	10
1.4.1.5. Kütle Transferi	11
1.5. Kendiliğinden Oluşan Tektabakalar (KOT)	11
1.5.1. Altın Yüzeyine ss-DNA İmmobilizasyonu	12
1.6. Hücre ve Doku Kültürlerinde Mikoplazma Kontaminasyonu	14
1.6.1. Mikoplazma	14
1.7. Optik Özellikler	20

1.7.1. Sınır Açısı ve Tam Yansıma	20
1.8. Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörler	22
1.8.1. Yüzey Plazmon Rezonans	22
1.8.2. Biyomoleküler Etkileşimler ve Yüzey Plazmon Rezonans	25
1.8.3. Reichert SR7000 SPR Cihazının Deneysel Kurulumu	27
1.9. Sol-Jel Süreci	28
1.9.1. Sol-Jel ve Optik Biyosensörler	33
1.9.2 Sol-Jel Kimyası	35
1.9.3. Sol-Jel ve Kaplama	39
1.9.4. DNA ve Sol-Jel	39
1.9.5. Silan Kaplı Yüzeye DNA İmmobilizasyonu	39
1.10. İnce Filmler	41
1.10.1. Daldırarak Kaplama	42
1.10.2. Döndürerek Kaplama	43
1.11. Optik Dalgakılavuzu	44
1.11.1. Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü	44
1.11.2. Prizma Çiftleyici Cihazının Ölçüm Teorisi	45
1.12. Çalışmanın Amacı	47
2. MATERYAL ve YÖNTEM	48
2.1. Materyal	48
2.1.1. Kimyasal Maddeler	48
2.1.2. Cihazlar ve Diğer Malzemeler	49
2.1.3. Kullanılan Çözeltiler	50
2.2. Yöntem	54
2.2.1. Çalışılan Hücre Kültürleri	54
2.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması	55
2.2.1.2. Hücre Stoklama ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi	55
2.2.2.1. QIAGEN DNA Saflaştırma Kiti Protokolü	56
2.2.2. DNA İzolasyonu	56
2.2.3. 16S rDNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı	57
2.2.4. Prob Tasarımı	58
2.2.5 Kaplama Yapılacak Altlıkların Temizlenmesi	60
2.2.6 Cam Yüzeylerin Altın ile Kaplanması	60

2.2.7. HS-ssDNA İmmobilizasyon Çalışmaları	60
2.2.7.1. Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	61
2.2.8. Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi Çalışmaları	61
2.2.8.1. Altın Yüzeyin Temizlenmesi	61
2.2.8.2. İmmobilizasyon	61
2.2.8.3. Sentetik Oligonükleotitlerle Hibridizasyon	62
2.2.8.4. PCR Ürünleriyle Hibridizasyon	62
2.2.9. Genomik DNA'nın Enzimatik Kesimi ve SPR'da İncelenmesi	63
2.2.10. Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü Tasarımı	64
2.2.10.1. Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörüne ait	65
Yüzeylerin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi	
3. BULGULAR	66
3.1. Mikoplazma Kontaminasyonunu Belirlemek Amacıyla 16S	66
rRNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı	
3.2. SEM Sonuçları	69
3.3. DNA Tabanlı SPR Biyosensörü	70
3.4. Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü Tasarımı	79
3.5. Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörüne ait	80
Yüzeylerin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi	
4. TARTIŞMA VE SONUÇ	82
KAYNAKLAR	87
ÖZGEÇMİŞ	93

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Å	Angstrom
APTES	3-aminopropilttriethoksisilan
Biotin-ssDNA	Biotin modifiye tek zincirli DNA
D-MEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
EDTA	Etilenediaminetetraasetik asit
Et-Br	Ethidium-bromide
FBS	Fetal bovine serum
FITC	Fluorescein isotiyosiyanat
FITC-ssDNA	FITC işaretli tek zincirli DNA
H₂O₂	Hidrojen peroksit
HCl	Hidrojen klorür
Hepes	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetansülfonik asit
HS-ssDNA	Tiyol modifiye tek zincirli DNA
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum fosfat monobazik
KOT	Kendiliğinden Oluşan Tektabakalar
MCH	6-merkapt-1-heksanol
MgCl₂	Magnezyum klorür
Na₂HPO₄	Disodyumfosfat
NaCl	Sodyum klorür
NaHCO₃	Sodyum bikarbonat
NH₂-ssDNA	Amin modifiye tek zincirli DNA
PBS	Phosphate buffered saline
PDC	4-fenilendiisotiyosiyanat
PCR	Polinükleotit zincir reaksiyonu
PO₄	Fosforik asit
RU	Rezonans birimi
RIU	Refraktif indis birimi

SDS	Sodyum dodesil sülfat
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SPR	Yüzey plazmon rezonans
ss-DNA	Tek zincirli DNA
TAE	Tris-asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEOS	Tetraetilortosilikat
TIR	Toplam iç yansıma
T_m	Erime sıcaklığı

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi	2
1.2. DNA molekülü ve nükleotitlerin yapısı	6
1.3. DNA hibridizasyon sensöründe yüzeyin hazırlanması	13
1.4 SPR temelli DNA hibridizasyon biyosensöründe ideal bir sensör yüzeyinin hazırlanışı	14
1.5 a) <i>HELA</i> hücrelerinde <i>M. penetrans</i> enfeksiyonu (30 000 X büyütme) b) <i>MDCK</i> hücre soyunda <i>M. arginini</i> enfeksiyonu (30 000 X büyütme)	17
1.6 Işığın kırılması	21
1.7 Toplam iç yansıma	23
1.8 Yüzey plazmon rezonansı (SPR)	23
1.9 Kretschmann konfigürasyonunda, sönendalga varlığında SPR uyarımı	24
1.10 Yüzey plazmon rezonansın belirlenmesi	26
1.11 Optik bir biyosensöre ait tipik bir bağlanma döngüsü	26
1.12 $f=2$ Fonksiyonelliğine Sahip Monomerin Polimerizasyonu	31
1.13 $f>2$ 'ye Sahip Monomerin Polimerizasyonu ³²	32
1.13 Sol-jel Süreci	35
1.14 Sol-gel matris içinde tutuklanmış proteinin olası mikroçevresi	38
1.15 Sol-jel tabanlı inorganik, organik, nanobileşiklere biyomoleküllerin tutundurulma yöntemleri	38
1.17 DNA bağlanması için yüzeyin silan modifikasyonu	40
1.18 Daldırarak Kaplama İşlemi	43
1.19 Optik Dalgakılavuzu Ölçüm Prensibi	44
1.20 Gözenekli silikon yapıdaki dalgakılavuzu temelli biyosensör	45
1.21 Prizma çiftleyicinin şematik gösterimi	46
3.1 Çeşitli hücre kültürü örneklerinde mikoplazma kontaminasyonunu gösteren MYA-MYB primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ürünlerinin (460 bp) agaroz jel görüntüsü.	67
3.2 Çeşitli hücre kültürü örneklerinde mikoplazma kontaminasyonunu gösteren MYPR-MYPF primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ürünlerinin (310 bp) agaroz jel görüntüsü	68

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.3 Tiyo1 modifiye ss-DNA immobilizasyonu çalışması yapılan altın yüzeyin yüksek büyütmedeki SEM görüntüleri	70
3.4 SH-ssDNA'nın altın yüzeyine immobilizasyon grafiği	71
3.5 Sentetik oligonükleotidlere ait hibridizasyon grafiği	71
3.6 C6: Mikoplazma pozitif C6 hücre soyuna ait PCR'la oğaltılmış örneğin termal denatürasyon sonrası SPR analizi	73
3.7 420 bazlık tek zincirli PCR ürünün oluşturacağı olası sekonder yapılardan biri	73
3.8 Kalıp DNA içermeyen PCR karışımının sisteme verilmesiyle elde edilen μ RIU değişiminin zamana göre grafiği	74
3.9 Mikoplazma pozitif 293T hücre soyuna ait PCR'la oğaltılmış örneklerin SPR analiz grafikleri	75
3.10 Mikoplazma negatif sıçan primer kemik iliği hücrelerine ait PCR'la oğaltılmış örneklerin SPR analiz grafikleri	76
3.11 Mikoplazma pozitif Ishikawa hücre soyununun genomik DNA fragmanlarının SPR analizi	78
3.12 Mikoplazma negatif SC111 hücre soyunun genomik DNA fragmanlarının SPR analizi	79
3.13 Sol-jel temelli dalgakılavuzu optik biyosensör tasarımı	79
3.14 Dalgakılavuzu sensör yüzeyinde prob DNA immobilizasyonu takiben FITC işaretili oligonükleotitlerle hibridizasyon sonrası floresan görüntüleri	81

ÇİZELGELER DİZİNİ

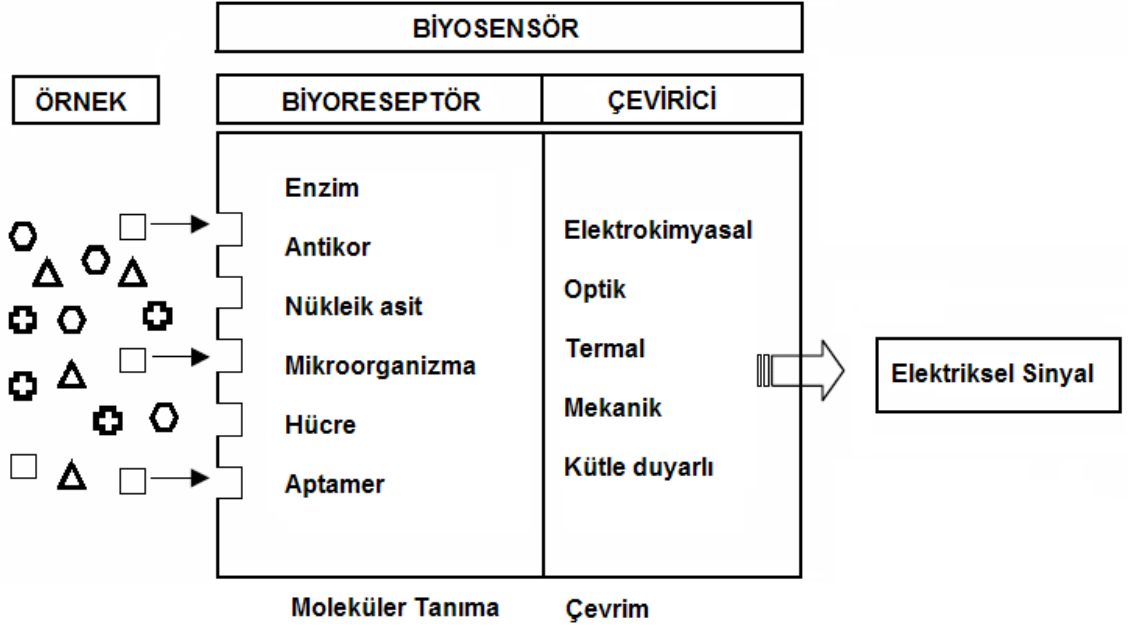
<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Mikoplazma türlerinin ökaryotik hücreler üzerindeki etkileri	18
1.2 Hücre kültürü kontaminasyonlarından sorumlu mikoplazma türleri	19
1.3 Mikoplazma Belirleme Yöntemleri	20
1.4 Hücre kültürü kontaminasyonundan sorumlu çeşitli Mikoplazma türlerine ait 16SrRNA gen dizilerinin ‘alignent’ sonucundan bir bölüm.	21
1.5 Kullanılan ligandlar	30
2.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları	56
2.2 Primerler listesi	58
2.3 Prob ve hedef DNA’ların dizileri ve yapıları	60
2.4 Genomik DNA’nın enzimatik kesim reaksiyonu koşulları	64
3.1 Hücre kültürü örneklerine ait PCR ürünlerinin mikoplazma varlığı bakımından, jel-elektroforezi ve SPR sinyali sonuçlarının karşılaştırılması	78
3.2 PCR’la çoğaltılmış Mikoplazma negatif ve pozitif çeşitli hücre kültürü örneklerinin (n=3)incelenmesi sonucunda elde edilen SPR sinyali sonuçlarının mikrorefraktif indis değişimi ortalamaları bakımından karşılaştırılması	78
3.3 TEOS kaplı yüzeyin kırılma indis ölçüm değerleri	80

1.GİRİŞ

Biyosensörler, biyomoleküller arasındaki özgün etkileşimleri temel alan, biyomoleküllerin sabit özelliklerinin yanı sıra, farklılıklarını da anında ve yüksek hassasiyetle saptamaya yarayan optik, elektrokimyasal, piezoelektrik vb. yapıdaki aletlerdir.

Bir biyosensör, üç temel bileşenden oluşur : (i) tanıyıcı bölüm; (ii) tanıyan ile tanınan arasındaki etkileşmeyi elektrik sinyaline çeviren “çevirici “ (“transducer”); ve (iii) elektronik bölüm. Tanıyıcı bölümde immobilize edilmiş biyomoleküller bulunmaktadır.

Biyosensörün tanıyıcı tabakasına takılmış bulunan ligand (“algılayıcı”) ile tayini gerçekleşecek olan analit (“tanınan”) arasında, sensör yüzeyinde yüksek düzeyde seçici ve özgün etkileşme gerçekleşir. Etkileşmenin sonucunda oluşan değişiklik, örneğin, kimyasal bir ürün olabileceği gibi, başlangıçta ortamda bulunan ve etkileşme ile kaybolan bir kimyasal madde olabilir. Bunun yanı sıra, etkileşim sonucu, elektrokimyasal değişiklik olabilir, ısı açığa çıkabilir veya kaybolabilir; optik özellikler değişebilir; veya kütle değişimi gözlenebilir. Cihazdaki “çevirici” birimi bu değişimi algılar ve elektrik sinyaline çevirir, ki bu da elektronik bölüm tarafından değerlendirilir ve sayısal okunabilir verilere dönüştürülür.



Şekil 1.1. Biyosensörlerin yapısı ve çalışma prensibi (Temiz ve ark., 2006).

Bir biyosensörün ana elemanı, çoğunlukla uygun bir çevirici sistemin yüzeyine immobilize edilmiş, antikor, enzim veya tek zincirli DNA gibi biyolojik materyallerdir. Bu sistemde, biyolojik materyalin çevirici yüzeyde analiti özgül olarak tanıma olgusu bir sinyale dönüştürülür. Biyomolekülün analiti özgül ve seçici olarak tanınması biyokimyasal bir reaksiyon sonucunda mümkün olur. Affinite biyosensörlerinde yüzeye bağlı affinite kompleksi oluşurken, katalitik biyosensörlerde ise analit enzimatik bir reaksiyonla ürüne dönüşür. Biyosensörün sinyal iletim mekanizması olarak hangi fiziksel yöntem kullanılıyor olursa olsun, biyosensör tasarımında en önemli nokta, çevirici sistemin yüzeyine immobilize edilmiş biyolojik materyalin fonksiyonel aktivitesini en üst düzeyde korumasını sağlamaktır. Bu durum çevirici yüzeyin mikro, nano boyutlara indirgendiği durumlarda özellikle önemlidir. Immobilize biyomolekülün fonksiyonel bütünlüğünün yanında, bir biyosensörden alınan sonuçların özgüllüğü, kararlılığı ve güvenilirliği bakımından dikkat edilmesi gereken diğer bir nokta, yüzeydeki her bir biyomolekülün, analit moleküllerle etkileşime girmelerini sağlamaktır (Telefoncu A., 1999).

1.1 Biyomoleküllerin İmmobilizasyonu

Biyosensörler farklı özellikteki iki farklı elemanın (biyomolekül ve çevirici sistem) kombinasyonu ile oluşurlar. Uygun biyomolekül ve çevirici sistem seçildikten sonra bunların birbirine bağlanması aşılması gereken en önemli sorundur. Bu bağlama işlemi immobilizasyon olarak adlandırılır. İmmobilizasyon biyoreseptörün kararlılığı ve tekrar kullanımı açısından büyük avantaj sağlar. İmmobilizasyonda en önemli nokta biyomolekülün işlevselliğini korumasını sağlamaktır. İmmobilizasyon yöntemi biyomolekülün kimyasal ve fiziksel yapısı göz önünde bulundurularak belirlenir. Bu amaçla başlıca dört yöntem kullanılmaktadır. (Eggins *et al.*,2002).

1.1.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon ikiye ayrılır; fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon. Fiziksel adsorpsiyon van der Waals kuvvetleri ve bazen de hidrojen bağlarıyla gerçekleşirken, kemisorpsiyon fiziksel adsorpsiyona göre çok daha kuvvetli olan kovalent bağların oluşumuyla gerçekleşir. Bir yüzeye adsorbe olan biyomoleküller pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet değişimlerine çok duyarlıdır. İmmobilizasyon yöntemi olarak adsorpsiyonla oluşturulan bir biyosensörün ömrü yaklaşık bir gündür.

1.1.2 Mikro-Kapsülleme

Bu yöntemde inert bir membran, çevirici sisteme yakın olacak şekilde biyomolekülü hapseder. Çok sayıda avantajlara sahiptir. Farklı şartlara adapte olabilen, güvenilir, pH, sıcaklık, iyonik kuvvet ve kimyasal kompozisyondaki değişimlerle uyumlu bir yöntemdir. Ömrü yaklaşık bir haftadır. Ayrıca, biyodegradasyon ve kontaminasyon olasılığının aza indiği bir yöntemdir (Eggins *et al.*,2002).

1.1.3 Kovalent Bağlama

Biyomolekölün yüzeye bir fonksiyonel grup üzerinden kovalent olarak bağlanmasıdır. Bu fonksiyonel gruplar, NH_2 gibi nükleofilik gruplardır. Ömrü 4-14 ay arasında değişir (Schlecht, 2002).

1.1.4 Çapraz Bağlama

Tutuklama yöntemiyle kimyasal bağlanmanın birleştirilmiş şeklidir. Her ne kadar son derece kararlı bir yöntem olsa da, hedef moleküllerin diffüzyonunu sınırlandırabilir. (Pierce *et al.*, 2004).

1.2 DNA Molekülü ve Yapısı

DNA molekülü, iki polinükleotit zincirinin şeker fosfat omurgalarının ortak bir eksen çevresinde eşit çaplı ve sağ yöne doğru dönüşler oluşturmasıyla meydana gelmiş sarmal yapıda bir moleküldür. Deoksiriboz ile fosfat grupları ester bağlarıyla birbirlerine bağlanmıştır. İki kolun arasındaki merdiven basamaklarında gelişigüzel bir sıralanma yoktur; her zaman Guanin (G), Sitozinin (C ya da S); Adenin (A), Timinin (T) karşısına gelir. Hem pürin (adenin ve guanin) ile pirimidinler (sitozin ile timin) arasındaki hidrojen bağları, hemde diğer bağlar, meydana gelen heliksin düzgün olmasını sağlar. Hidrojen bağları, fosfor bağları kadar kuvvetli olmadığı için pH değişikliği, sıcaklık ve basınç gibi etkenlerle kolaylıkla birbirlerinden ayrılabilir. DNA'nın kendi kopyasını yapması ve gen anlatımı, nükleotitler arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ile gerçekleşmektedir. Hidrojen bağlarının özelleşmesi; uygun nükleotit moleküllerinin karşılıklı gelerek birbirlerine yine uygun sayıda hidrojen bağları ile bağlanmasını sağlar. Böylece zincirin bir kolunda bulunan nükleotitlerin dizilişi, karşı kolda bulunan nükleotitlerin dizilişini kontrol eder (Şekil 1.2).

Nükleotitlerin bazıları molekülün omurgasının iç kısmında bulunur. Bazılar sarmalın eksenine 90 derece açı yapacak şekilde konumlanmıştır. Birbirine komşu baz çiftlerinin dönümleri arasındaki uzaklık $3,4\text{\AA}$ 'dır. Ayrıca her baz çifti komşusuna 36 derecelik açı yapacak şekilde yerleşmiştir. Buna göre, yaklaşık 10 baz çifti 360 derecelik tam bir dönüşü tamamlayacağından, her dönüşün boyu $34\text{\AA}$ dür.

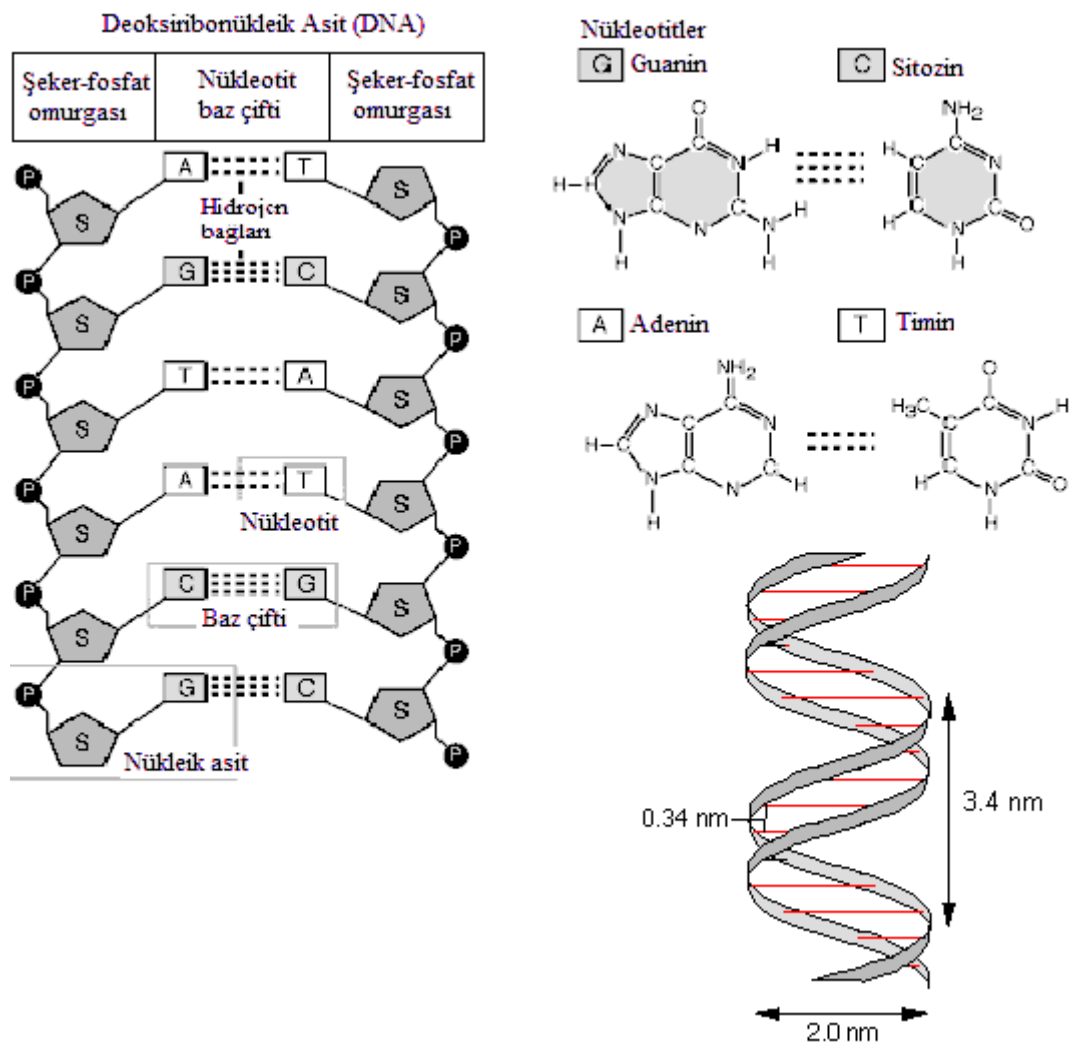
Nükleotitler birbirlerine fosfat bağlarıyla bağlanarak, şeker ve fosfat kısımlarının birbirlerini izlediği serilerden oluşan bir omurgaya sahip uzun ve polinükleotit zincirlerini meydana getirmiştir. Kovalent ester bağları veya fosfodiester bağları olarak da bilinen bu bağlar son derece kuvvetlidir. Fosfodiester bağlarının varlığı DNA molekülünün tek zincirli yapı halinde iken bile dayanıklı ve kararlı bir yapıda olmasını sağlar.

Nükleotitlerin yapısının bazik olmasına karşın omurgadaki PO_4 (fosforik asit) gruplarının varlığı polinükleotit zincirlerin asit özellikte olmalarına yol açar ve nükleik asit terimi de bu özellikten köken alır.

DNA'nın iki zinciri, birbirine sadece H bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olduklarından, nükleotitleri arasındaki kovalent bağlarda herhangi bir kopma olmaksızın çözülebilirler (denatürasyon). Aynı şekilde çözülmüş molekülün zincirleri tamamlayıcı bazları arasında H bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (renatürasyon) (Martin *et al.*, 2002). Bu özellikleri nedeniyle, DNA molekülü biyosensör algılayıcıları için gerekli tüm özelliklere sahiptir denilebilir.

Aptamerler, yüksek özgünlükte moleküler hedeflerine bağlanabilen nükleik asit yapısında veya peptit yapısındaki makromoleküllerdir. Nükleik asitlerde olduğu gibi, tipik bir nükleik asit aptameri A,U,T,C ve G'den oluşan 15-40 nükleotit uzunluğunda doğrusal bir dizidir. Çözelti içinde nükleik asit zincirleri, molekül içi etkileşimlerle 3 boyutlu yapıda bir molekül oluşturacak şekilde katlanır. Aptamerin yapısı, hedef moleküle sıkıca bağlanmasına izin verir.

Aptamerler, küçük moleküller, proteinler, nükleik asitler hatta hücre ve dokular gibi çok çeşitli moleküler hedeflere bağlanabilirler. Aptamerler, biyoteknolojik ve tedavi amaçlı uygulamalarda, sıklıkla kullanılan antikorlara göre çok daha üstün tanıma özellikleri sergilerler. Üstün ayırt edici tanıma özelliklerine ek olarak, aptamerler tamamiyle test tüplerinde üretilmeleri nedeniyle antikorlara nazaran, kolaylıkla kimyasal olarak sentezlenebilen, tercih edilir saklama özelliklerine sahip moleküllerdir. Tüm bu nedenlerden dolayı, aptamerler, biyosensör uygulamalarında biyoreseptör olarak kullanılmak üzere oldukça elverişli ve umut vericidirler.



Sekil 1.2 DNA molekülü ve nükleotitlerin yapısı

(http://www.mbscientific.com/1_MorphogenesisGeneAngle.htm).

1.3 DNA Hibridizasyon Biyosensörleri

Tek zincirli iki DNA (ssDNA) molekülünün yüksek seçicilikle hibridizasyon reaksiyonu ile birbirlerine bağlanarak çift zincirli DNA (dsDNA) hibrid molekülü oluşturmaları prensibinden yararlanılarak, genetik hastalıklarla ilişkili olarak tek nükleotit varyasyonları (SNP'ler) veya farklı tipte nokta mutasyonlarının belirlenmesi veya biyolojik örneklerde özgül olarak mikrobiyolojik kontaminasyonların belirlenmesi mümkün olmaktadır.

DNA biyosensörlerinin çalışma prensibi, çevirici yüzeye immobilize edilmiş özgül tek-zincirli DNA dizilerine (prob), analit içinde eşlenik olan tek-zincirli DNA (ssDNA) dizilerinin eşleşmesine dayanır. DNA dizilerini, özgül ve seçici olarak (tek baz uyumsuzluğunu belirleyecek düzeyde) belirleyebilme kabiliyeti, bir DNA biyosensöründe aranan en önemli özelliktir. Günümüzde, jel bazlı yöntemler gibi diğer hibridizasyon yöntemleri oldukça yavaştır ve güvenilir sonuçların alınması saatler sürmektedir. Biyosensörlerde ise yapılan gerçek zamanlı hibridizasyon analizleriyle hızlı, özgül ve güvenilir sonuçlar elde edilir.

DNA biyosensörlerinde, hibridizasyonun belirlenmesi optik, yüzey akustik dalga veya elektrokimyasal çeviricilerle sağlanır.

1.4 Katı Yüzeyler Üzerinde DNA Hibridizasyonu

Katı yüzeyler üzerine DNA hibridizasyonu, ilk olarak membran üzerinde 1970'lerde geliştirilmiştir. Uygulama alanı ne olursa olsun, bir biyosensörün en önemli özelliği yüzeyde sınırlandırılmış biyokimyasal bir sürecin ölçülebilir bir sinyale dönüşmesidir. DNA biyosensörlerinde çevirici element katı yüzey üzerindeki tek veya çift zincirli oligonükleotit varlığını belirleyebilmektedir. Maksimum duyarlılığı sağlamak, yani en yüksek hibridizasyon verimliliğini oluşturmak üzere gereken koşulların belirlenmesi, biyosensör tasarımında çok önemli bir basamaktır. Yüzey üzerinde hibridizasyon, çözelti içinde hibridizasyonla benzer bir süreç olarak görünse de farklı koşulların oluşturulması gerekmektedir.

Optimum hibridizasyon için göz önünde bulundurulması gereken faktörler şöyle sıralanabilir:

- a) Yüzey üzerinde sınırlandırılmış bir prob'un karakterizasyonu; prob'un çevre koşullarının tanımlanması, bağlanma yöntemi ve yüzey yapısı.
- b) Yüzeye tutundurulmuş prob oligonükleotitlerin, sıvı fazdaki hedef oligonükleotitlerle etkileşimlerinin hibridizasyon koşulları.

İki eşlenik zincirin rastgele çarpışması, katı yüzey üzerinde hibridizasyonun meydana gelebilmesi için en önemli gerekliliktir. Çarpışma sıklığı veya olasılığı hibridizasyon prosesinin kinetiğini belirler. Çarpışma olduğu anda hibrid oluşturmak üzere birleşme (annealing) meydana gelmelidir. Eğer oluşan hibrid tamamıyla eşlenik ise hibrid kararlı olur. Baz dizilimleri tamamıyla eşlenik olmasa bile yine hibrid oluşabilir. Fakat bu hibridler tamamen eşlenik hibridler kadar kararlı değildir. Eşlenik ve eşlenik-olmayan hibridlerin oluşumu için gerekli koşullar (pH, iyonik kuvvet, sıcaklık vb.) belirlenerek ayırımları yapılabilir.

Nükleotit çiftinin yapısı birbirine geçmiş 2 antiparalel molekül görünümündedir. Üç boyutlu yapı tek başına zayıf ancak hep birlikte güçlü olan ve çift helikal yapı içinde molekülleri kararlı halde tutabilen bir dizi zayıf etkileşimle sağlanır. Bu etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik, elektrostatik, van der Waals ve dipol dipol etkileşimleridir. Hibridizasyon, sıkıca paketli heliks yapısını oluşturmak üzere bu etkileşimlerle meydana gelir.

İki zinciri bir arada tutan bu güçlerin oluşumu, özellikle bazlar arasındaki hidrojen bağları ve iyonik etkileşimler, deneysel olarak fizikokimyasal parametrelerle değiştirilebilir. Bu parametreler bir bakıma bu zayıf etkileşimlerin oluşumunu veya bozulmasını etkileyerek yüzey üzerinde hangi hibridlerin kalacağını belirleyebilir.

1.4.1 Hibridizasyon Verimliliği ve Duyarlılığı

Sıvı ortamda iki komplementer nükleik asit zincirinin hibridizasyon süreci, iki molekül arasında özgül bir etkileşim olup, çözelti içinde homojen şekilde olur.

Yüzey hibridizasyonunda ise bu proses özgül bir adsorpsiyon prosesidir. Her ne kadar aynı etkileşimler söz konusu olsa da farklı bir şekilde karakterize edilmelidirler.

Hibridizasyon verimliliği yüzeyde, optimum hibridizasyon koşullarında eşlenik zincirlere hibridize olan prob oligonükleotitlerin oranının ölçüsüdür. Hibridizasyon hızı ise hedef zincirlerin yüzeye akış hızıdır (Cooper *et al.*, 2004).

1.4.2 Prob Oligonükleotitin Yapı ve Dinamiği

Her ne kadar çift zincirli DNA'nın yapısı çok iyi çalışılmış olsa da, özellikle katı yüzey üzerindeki tek zincirli DNA'nın yapısı çok az tanımlanabilmiştir. Çünkü yüzeydeki prob yapısı ve prob yoğunluğunun belirlenmesi, yüzeydeki miktarın çok küçük olması nedeniyle oldukça zordur. Prob yapısı, yüzey yükü, hidrofobiklik, prob immobilizasyon yöntemi, fizikokimyasal ve kimyasal koşullar gibi çok sayıda parametreye bağlıdır (Cooper *et al.*, 2004).

1.4.2.1 Prob Uzunluğu ve Konumu

Prob'un çözelti içindeki ulaşılabilirliği hem hibridizasyon verimliliğinde hem de hibridizasyon hızında etkilidir. Probun uzunluğu ve sahip olduğu ara grup (spacer), oluşturacağı sekonder yapıyı belirler. Oligonükleotidin yüzeye tutundurulması eğer ara bir grup ile yapılırsa komşu çevredeki sterik etkiler azalır ve hibridizasyon verimliliği artar.

Prob molekülün konumu büyük ölçüde desteğin yüzey özelliklerine (hidrofobik yapı, yük v.b.) bağlıdır. Negatif yüklü yüzeyler, oligonükleotitleri yüzeyden iterken, pozitif yüklü yüzeyler, fosfat gruplarıyla bağlantıya geçerek, oligonükleotidin yatay konuma gelmesine neden olur. Hidrofobik yüzeyler, oligonükleotitlerin bazlarıyla etkileşime girerek, oligoları hibridizasyon için uygun olmayan bir konuma getirir (Chan V. *et al.*, 1998).

1.4.1.2 Prob'un Yüzey Konsantrasyonu

Yüzeyde oligonükleotitlerin sıkışması sonucunda oluşan sterik engeller hibridizasyon verimliliğinde doğrudan sorun oluşturacaklardır (Southern *et al.*, 1997). Bu nedenle yüzey konsantrasyonunun dikkatli bir şekilde kontrolü, uygun hibridizasyon verimliliğini belirleme sınırlarını oluşturmak için özellikle önemlidir.

Göz önünde bulundurulması gereken diğer bir faktör ise yakın komşular arasındaki hibridizasyonları etkileyebilen hedef zincirler arasındaki uzunluk farklılıklarıdır. Hedef zincir prob'dan küçük ise, hibridizasyon hızı uzunluk farkıyla doğru orantılı olarak artacaktır. Hedef zincir uzadıkça, hibridizasyon hızı azalır (Cooper *et al.*, 2004).

1.4.1.3 İyonik Kuvvet

İyonik kuvvet, hibridlerin kararlılığını, oluşma hızını ve yüzeye bağlı prob moleküllerin etkileşimlerini etkiler. Yüksek iyonik kuvvet, hibridlerin kararlılığını ve hibridizasyon kütle transferiyle sınırlanmadığı müddetçe hibridizasyon hızını artırır.

Yüksek tuz konsantrasyonları yüzeye bağlı tek ve çift zincirli moleküller arasındaki elektrostatik etkileşimleri azaltmak açısından önemlidir. Bu nedenle, yüksek iyonik kuvvete sahip çözeltilerde daha büyük oranlarda prob immobilizasyonu sağlanır (Georgiadis R. M. *et al.*, 2001).

1.4.1.4 Sıcaklık

Hibridizasyonda en önemli parametrelerden birisi sıcaklıktır. Hibridizasyon sıcaklığı, erime sıcaklığına ' T_m ' (verilen bir oligonükleotit için, zincirin %50'sinin eşleniğiyle hibridize olduğu sıcaklık) göre belirlenir. Erime sıcaklığı ' T_m ', baz uzunluğu, kompozisyonu ve tuz konsantrasyonuna bağlıdır.

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

(%G+C: oligonükleotitin G ve C içeriği, L: baz sayısı)

Çözelti içinde, maksimum hibridizasyona T_m 'in yaklaşık 20-25 °C'ta altında ulaşılır. Sıcaklık T_m 'e yaklaştıkça hibridler ayrılmaya başladığından, hibridizasyon miktarında azalma meydana gelir. Her ne kadar yüzeye bağlı hibridizasyon detaylı olarak çalışılmış olmasa da, benzer şekilde davrandığı düşünülmektedir (Cooper *et al.*, 2004).

1.4.1.5 Kütle Transferi

Hedef zincirin yüzeye bağlı eşlenik zincirle çarpışma olasılığı fiziksel olarak hedef zinciri içeren çözeltinin akış hızını artırarak sağlanır. Kütle transferinin düzeyi, hibridizasyon hücrelerini karıştırarak veya sallayarak da artırılabilir. Hacmi azaltarak veya prob modifiye yüzeyin alanının hacme göre oranını artırarak, yüzeydeki difüzyonal kütle transferi daha iyi hale getirilebilir. (Cooper *et al.*, 2004).

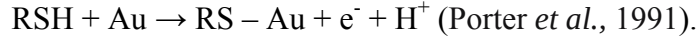
1.5 Kendiliğinden Oluşan Tektapakalar (KOT)

KOT, yüzey aktif moleküllerin katı bir yüzeye adsorpsiyonlarıyla oluşan, düzenli moleküler tabakalardır (Abraham U., 1996). Kendiliğinden bir araya gelme prosesi, belirli deneysel koşullarda, organik bileşiklerin kendiliğinden bir araya gelip kenetlenerek termodinamiksel olarak dengede, iyi bir şekilde düzenlenmiş 2 veya 3 boyutlu supramoleküler yapılar oluşturmalarıdır.

Çok sayıdaki organik molekülün belirli katı substratların üzerinde kendiliğinden bir araya gelerek tek katmanlı tabakalar (KOT) oluşturma kapasitesi güvenilir ve moleküler yapı olarak iyi düzenlenmiş çevirici yüzeylerin tasarlanmasını mümkün kılar. Bu sayede, özgül olmayan adsorpsiyonlar elimine edilir, yani sadece seçilen biyomoleküle, (bölgeye özgül kovalent olmayan etkileşimlerle) onun doğal yapısını bozmaksızın bağlanması sağlanır.

Sülfür bileşikleri, geçiş metallerinin yüzeylerine yüksek affinite gösterirler. Tiyol (R-SH), disülfid (R-S-S-R) ve sülfid (R-S-R) gibi sülfür bileşikleri, çeşitli transisyon metallerinin (altın, gümüş, platin v.b.) temiz yüzeylerinde, yüzeye bağlantı kurarak kendiliğinden adsorbe olurlar. Böylelikle, çok kararlı ve

tekrarlanabilir monomoleküler filmler oluşur. Alkiltiyollerin altın üzerindeki kemisorpsiyon mekanizması şöyle açıklanabilir: Altın yüzeyine S-H bağının oksidatif eklenmesi ve bunu takiben hidrojenin indirgenerek çıkarılması ve alkiltiyolat iyonlarının oluşumu.

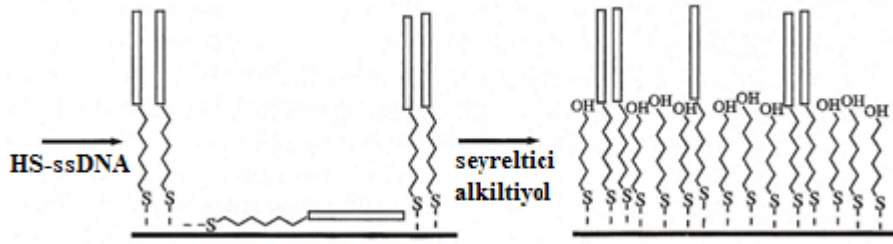


Di-n-alkil disülfürlerin adsorpsiyonu ise S-S bağının altın yüzeyine oksidatif eklenmesidir. Disülfidlerde S-S bağı adsorpsiyon prosesi sırasında kırılır. Bu farklı reaksiyonların sonucunda, alkiltiyol ve di-n-alkil disülfürün altın yüzeyine kemisorpsiyonu, hemen hemen aynı, kendiliğinden oluşmuş monomoleküler tabakalar meydana getirir (Walschus *et al.*, 2005).

1.5.1 Altın Yüzeyine ss-DNA İmmobilizasyonu

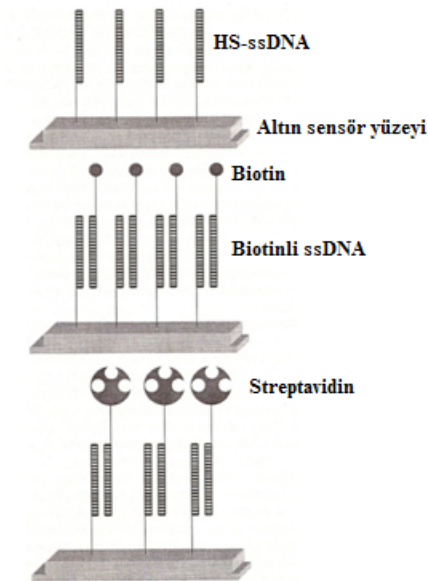
DNA hibridizasyon sensörü hazırlamak için en basit yöntem, altın yüzeyine tiyol içeren ssDNA problemlerinin kemisorpsiyonuyla, sensör yüzeyinde ssDNA tek tabakası oluşturmaktır. Tüm affinite sensörlerinde olduğu gibi, DNA hibridizasyon biyosensörlerinde optimum performans, yüzeye bağlı fonksiyonel olarak aktif ss-DNA probunun sayısını en üst düzeye çıkararak ve ssDNA probuyla yüzey arasındaki özgül olmayan etkileşimleri en aza indirgeyerek sağlanabilir.

Her ne kadar tiyollü ss-DNA problemleri, altın yüzeyiyle tiyol grupları üzerinden etkileşime girmeyi tercih etse de, nükleotit zincirinin nitrojen içeren tarafı da yüzeye etkileşime girebilir. Bu nedenle, sadece tiyollü ss-DNA ile altın yüzeyinin kaplanması, sensör yüzeyine paralel ss-DNA'ların olduğu, yani hedefle etkileşime giremeyen düzensiz bir ss-DNA tabakasının oluşumuna yolaçar. (Şekil 1.3.) Bu durumu ortadan kaldırmak amacıyla, tiyollü ss-DNA'lar, alkiltiyolle seyreltilirler, seyreltici alkiltiyolün yüzeye kemisorpsiyonundan sonra, tiyollü ssDNA'lar kimyasal olarak inert oldukları altın yüzeye tutturulur. Bu sayede hedef ssDNA molekülleri için ulaşılabilir hale gelirler.



Şekil 1.3. DNA hibridizasyon sensöründe yüzeyin hazırlanması: Seyreltici alkiltiyol çözeltisinin altın yüzeyine kemisorpsiyonundan sonra tiyollü ss-DNA problemlerinin altın yüzeyine kemisorpsiyonu (Gorton, 2005).

SPR tabanlı DNA biyosensörlerinin önemli bir dezavantajı, hedef olarak kullanılan ss-DNA moleküllerinin, oldukça düşük olan moleküler ağırlığından dolayı, hibridizasyon reaksiyonu sonucunda sensör yüzeyindeki immobilize tabakanın kalınlığında çok az bir değişime yol açmasıdır. Bu tür biyosensörde hibridizasyon belirleme limiti, yüksek-moleküler-ağırlıklı bir molekül yardımıyla sensör yüzeyinde ikinci bir affinite reaksiyonu oluşturularak, sensörden elde edilen sinyalin güçlenmesi sağlanır. İki büyük protein olan avidin ve streptavidin (70 kDa), 4 bağlanma bölgesiyle biotine yüksek ölçüde affinite gösterir. Örneğin, yüzeye tutuklanmış ss-DNA problemleriyle biotin taşıyan hedef ss-DNA moleküllerinin hibridizasyonu sonrası, streptavidin moleküllerinin ortama katılmasıyla yüzeye bağlı ikincil bir affinite kompleksi oluşturularak, yüzeydeki hibridizasyon reaksiyonu daha yüksek ölçüde belirlenebilir (Şekil 1.4) (Gorton, 2005).



Şekil 1.4 SPR temelli DNA hibridizasyon biyosensöründe ideal bir sensör yüzeyinin hazırlanışı (Corn *et al.*, 1997).

1.6 Hücre ve Doku Kültürlerinde Mikoplazma Kontaminasyonu

Hücre kültürü teknolojisinde, hücre soylarının mikoplazma kontaminasyonu, karşılaşılan en büyük problemlerden biridir. Mikoplazma kontrolünde, kontaminasyon belirleme yönteminin özgün, duyarlı ve güvenilir olması çok önemlidir. Bu nedenle hücre kültürü laboratuvarlarında, yeni gelen hücrelere ek olarak sürekli kültürler de, belirli aralıklarda kontrol edilmelidir.

Rutin hücre kültürü uygulamalarında akut hücre soyu kontaminasyonları sıklıkla gözlenmektedir. Bu kontaminasyonlar kısa bir inkübasyon zamanından sonra besiyerinde görülen bulanıklık veya inverted mikroskop altında numunenin incelenmesi ile belirlenebilir. Hücre kültürlerinde, pseudomonad ve diferoid gibi, Gram negatif ve Gram pozitif bakteri, maya, protozoa ve fungal enfeksiyonlara ek olarak diğer saklı enfeksiyonlar da (mikoplazma ve virüs gibi) meydana gelebilmektedir.

Literatürde hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonu ile ilgili literatürde çok sayıda yayın olmasına rağmen, bilim insanlarının büyük bir kısmı hücre kültürlerindeki potansiyel mikoplazma enfeksiyonundan haberdar değildir veya bu duruma gereken önemi vermemektedir. Bunun bir nedeni de rutin olarak iş gücü gerektirmesi ve zaman almasıdır.

Hücre kültürü tekniğinin ilk yıllarında kullanılan serumlar enfeksiyonların büyük bir çoğunluğundan sorumludur ancak, bu sorun günümüzde aşılmıştır. Mikoplazma temel olarak, laboratuvar ekipmanı, primer doku (<1%), kültür bileşenleri, besiyeri, çözeltiler, laboratuvar çalışanları ve enfekte olmuş kültürlerden çapraz kontaminasyonla yayılmaktadır.

1.6.1 Mikoplazma

Mikoplazmalar, ileri derecede özelleşmiş, sert hücre duvarı yokluğuyla karakterize edilen büyük bir bakteri grubu olan *Mollicutes* sınıfına aittir. Genom büyüklükleri yaklaşık 580 - 2220 kb arasında değişen mikoplazmalar, kendi kendine

çoğalabilen ve tek başına yaşayabilen en küçük (300 nm-800 nm) prokaryotlardır. Çok yüksek konsantrasyonlara ulaşabilen mikoplazmalar (10^6 - 10^8 /ml), çok küçük boyutlarda olduklarından sadece elektron mikroskopuyla saptanabilirler (Naot *et al.*, 1998) (Şekil 1.5).

Mikoplazmalar çift zincirli dairesel DNA genomuna sahiptir. Kodlama bölgelerinde yeniden düzenlemeler yaparak genomlarının kodlama potansiyellerini arttırmaya çalışırlar. Kısıtlı genomlarından dolayı, pekçok bakteri türünde görülen enzimatik yollara sahip değildirler. Bu nedenle, bu organizmaların besin gereksinimleri farklıdır. Yüksek seviyede nükleaz ve proteaz gibi parçalayıcı enzimler üretirler ve gerekli besinleri temel olarak ökaryotik hücrelerden temin ederler (Dybvig *et al.*, 1999).

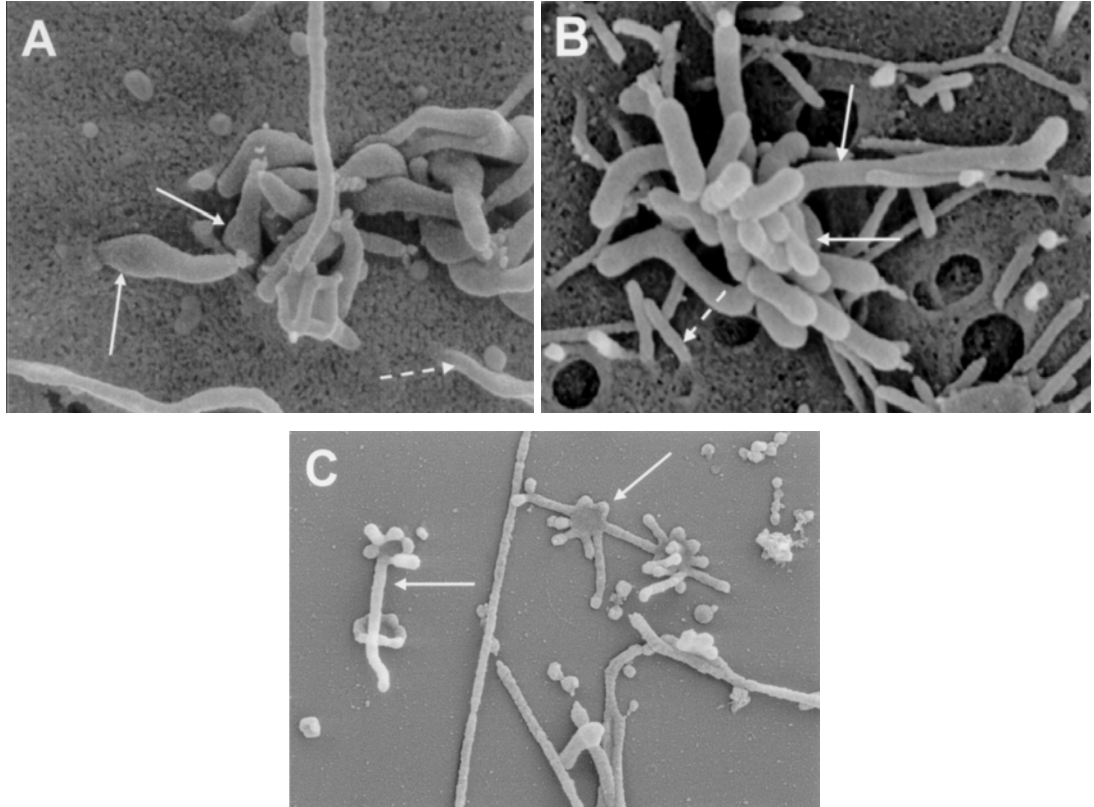
Buna ek olarak, mikoplazma DNA'sı düşük oranda guanin ve sitozin içeriğine sahiptir. Ayrıca, önemli yüzey antijenlerini kodlayan genlere ait tekrarlayan elementler içerirler. Diğer bir farklı özellikleri de kodon kullanımlarıdır. TGA pek çok organizmada bitiş kodonuyken, çoğu mikoplazma türünde triptofanı kodlar (Dybvig *et al.*, 1996). Çoğu mikoplazma türü membran fonksiyonu ve gelişimi için prokaryotlarda az görülen, ekzojen kolestrole ihtiyaç duyar (Baseman *et al.*, 1997).

Mikoplazmalar, konak hücreleriyle çeşitli şekillerde etkileşime girerler. İnsan ve hayvanları enfekte eden çoğu mikoplazma, solunum sistemi ve ürogenital yolların epitel örtülerine sıkıca yapışırlar (Razin *et al.*, 1985). Bazı mikoplazmalar da konak hücre içine giriş için çeşitli mekanizmalar oluşturmuştur. Böylelikle hücre içi ortam paraziti olarak, hem immün sistemden hem de antibiyotiklerin etkisinden korunmuş olurlar (Rottem *et al.*, 2003 ve Citti *et al.*, 2005). Hücre duvarının olmaması mikoplazmanın konak hücreyle doğrudan bağlantı kurmasını kolaylaştırır. Uygun koşullarda, bu durumda hücre füzyonu oluşabilmektedir (Rottem *et al.*, 2003).

Mikoplazmalar, bulundukları konak hücreye çeşitli mekanizmalarla zarar verirler. Mikoplazmalar ve konak hücreler arasındaki biyosentetik öncüller için oluşan rekabet sonucunda konak hücre bütünlüğü bozularak, hücresel fonksiyonlar değişime uğrayabilir. Hücre membranına yapışmış mikoplazma ve konak hücre arasındaki ilişki, membran reseptörlerinde ve hücrenin transport mekanizmalarında

değişime yol açabilir. Ayrıca, hücre, parazit tarafından salgılanan metabolitlere karşı korunmasız olduğundan, hücre veya doku hasarı meydana gelebilir. Hücre membranında, peroksit ve süper-oksit radikallerle oksidatif hasar oluşabilir. Füzyon sürecinde, mikoplazma bileşikleri konak hücreye taşınarak, hücrenin normal fonksiyonlarını etkiler. Örneğin; etkin bir fosfoprotein fosfatazin salınımı, hücrenin normal sinyal iletim sistemlerinde değişikliklere yol açabilir. Bunun dışında, bazı durumlarda ökaryotik hücrelere mikoplazmanın yapışması sitopatik etkilere neden olabilir. Bu etkiler mikro-lezyonların ve küçük nekroz odaklarının meydana gelmesine neden olan mikro-kolonilerin oluşumundan kaynaklanabilir (Rottem et al., 2003). Çoğunlukla hücre dışı parazitler olan fakat hücre içini de invaze edebilen mikoplazmalar kommensal olarak görülebilir ve azalmış metabolik aktiviteleriyle (hücre kültürüne göre) uzun süreli jenerasyon zamanına sahip olabilirler, bu nedenle ökaryotik hücrelerden daha çok büyüyüp hücrelerin ölümüne neden olmazlar. Çizelge 1.1’de görülebileceği gibi, ökaryotik hücrelerin biyolojik özellikleri üzerine etkileri çok çeşitlidir.

Sonuç olarak insan ve hayvan mikoplazma enfeksiyonları, lokalize enfeksiyonlar ve pnömoni, endometrit gibi hastalıklarla sonuçlanabilir (Citti, 2005). Bunun dışında kültür hücrelerinde de barınarak, çoğaldıklarından yapılan araştırmalarda elde edilen verilerin geçerliliğini tehlikeye atarlar. Bu nedenle, hücre kültürlerinde mikoplazma kontaminasyonun belirlenmesi ve kontrolü için ayrıca zaman ve çaba harcanması gerekmektedir. Mikoplazmalar yüksek dozda ve uzun süreli antibiyotik uygulamalarında dahi zorlukla ortadan kaldırılırlar. Ayrıca bakteri hücre duvarı sentezini inhibe ederek çalışan antibiyotiklere dirençlidirler (Citti et al., 2005). Fakat, tetrasiklin, makrolid ve quinolonlara hassastırlar (Razin et al., 1985). Mikoplazmalar çok küçük boyutta olmaları ve esnek yapıdaki hücre membranları sayesinde 0,45 μm ’ ye kadar olan konvansiyonel filtrelerden de kolayca geçebilirler.



Şekil 1.5 A: HELA hücrelerinde *M. penetrans* enfeksiyonu (30 000 X büyütme)
 B: MDCK hücre soyunda *M. arginini* enfeksiyonu (30 000 X büyütme)
 C: HELA hücrelerinde *A. laidlawii* enfeksiyonu (20 000 X büyütme) (Uphoff *et al.*, 2002).

Ökaryotik Hücrelerdeki Genel Etkileri
Değişime uğramış protein, DNA, RNA sentezi
Değişime uğramış hücresel metabolizma
Kromozomal bozukluklar
Membran kompozisyonunda bozukluklar (yüzey antijeni, reseptör ekspresyonu v.b)
Morfolojide değişim
Hücresel transformasyon
Proliferasyon karakteristiğinde değişiklikler (büyüme, yaşam süresi)
Virüslerin çoğalmasında artış veya azalış
Sinyal iletiminde çeşitli etkiler

Çizelge 1.1 Mikoplazma türlerinin ökaryotik hücreler üzerindeki etkileri (Uphoff *et al.*, 2002).

20'den fazla mikoplazma türü kontamine olmuş hücre kültürlerinden izole edilmiştir. Kontamine hücre kültürlerinin tür bakımından, daha ayrıntılı olarak incelenmesiyle, büyük bölümünün belirli *Mycoplasma* ve *Acheloplasma* türlerine ait

olduğu anlaşılmıştır: kontaminasyonların %90-95'inden sorumlu türler *M. orale*, *M. hyorhinae*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. hominis* ve *A. laidlawii*'dir (Çizelge 1.2).

İnsan mikrobiyal florasında ağız boşluğunda bulunan *M. orale*, hücre kültürlerindeki tüm mikoplazma enfeksiyonlarının %20-40'ından sorumludur. Diğer patojenik olmayan, insan kaynaklı, orofarenkste görülen ve aynı zamanda hücre kültürlerinde kontaminasyona yol açan türler; *M. fermentans* ve *M. hominis*'tir. Hücre kültürlerinden izole edilen türler mikoplazma türleri sığır kaynaklıdır. En çok görülenler *M. arginini* ve *A. laidlawii*'dir. Enfeksiyonların büyük bir kısmından sorumlu olan *M. hyorhinae* ise domuz burun boşluğunda yaşayan bir türdür.

Mikoplazma Türü	Görülme Sıklığı	Kaynak
<i>M. orale</i>	20–40%	İnsan
<i>M. hyorhinae</i>	10–40%	Domuz
<i>M. arginini</i>	20–30%	Sığır
<i>M. fermentans</i>	10–20%	İnsan
<i>M. hominis</i>	10–20%	İnsan
<i>A. laidlawii</i>	5–20%	Sığır
<i>M. pirum</i>	Bilinmiyor	Bilinmiyor
<i>M. salivarium</i>	Bilinmiyor	Bilinmiyor

Çizelge 1.2 Hücre kültürü kontaminasyonlarından sorumlu mikoplazma türleri (Uphoff *et al.*, 2002).

Yukarıda bahsedilen tüm bu nedenlerden dolayı her hücre kültürü laboratuvarında mikoplazma kontaminasyonunu belirlemek için hassas, ekonomik ve hızlı yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Mikoplazmaların biyolojik çeşitliliği ve hücre kültürlerine kolay adaptasyonları, tek bir genel tahlilde tüm kontaminasyonların belirlenmesini zorlaştırır. Bu nedenle çok sayıda yöntem kullanılabilir. Mikoplazma türüne özgün

çok sayıda ve değişken yüzey antijeninin ekspresyonu, organizmanın seçici olarak tanınması için uygun hedefler oluşturur. Enfeksiyona neden olan protein veya immünolojik temelli tanı teknikleri rutin olarak mikoplazma türünün tanımlanması için kullanılmaktadır. Bu immünolojik teknikler, mikoplazmaya ait yüzeysel veya sitoplazmik antijenlerin antikorlarla etkileşimine dayanır. Monoklonal antikorlar klinik örneklerde mikoplazma türüne özel tanı için enzim bağlı immün testlerde (ELISA) kullanılırlar (Markham, et al., 2005 ve Sharew et al., 2005).

Mikoplazma DNA'sına özgül olarak DNA'ya bağlanan fluorokrom boyalarının kullanımıyla, mikoplazma enfeksiyonu belirlenebilir. Mikoplazma DNA'sının restriksiyon endonükleazlarla parçalanması ile elde edilen paternler kullanılarak, Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) ile mikoplazma türünün belirlenmesi sağlanabilir (Razin, 1985), (Markham, 2005). Fakat bu yöntemlerin (mikrobiyolojik kültür, ELISA, elektron mikroskobu, radyoaktif DNA boyama v.b.) çoğu uzun ve karmaşık olup rutin hücre kültürlerine uygulanabilir değildir veya sadece bir kısım mikoplazma türlerinin belirlenmesini sağlar. Bu anlamda PCR çok duyarlı ve özgül bir mikoplazma belirleme yöntemidir. PCR'da primer dizilerinin seçilimi en önemli basamaklardan birisidir.

Mikoplazma Belirleme Yöntemleri	
Elektron Mikroskobu	Transmisyon elektron mikroskobu Taramalı elektron mikroskobu
Biyokimyasal Yöntemler	Enzim testleri Protein analizleri
İmmunolojik Prosedürler	Antikorla floresan/ enzimatik işaretleme
DNA fluorokrom boyama	DAPI boyama Hoechst 33258 boyama
Mikrobiyolojik Kültür	Agarda koloni oluşumu
Polimeraz zincir reaksiyonu	Tür / cins- özgül primerlerle PCR Evrensel primerlerle PCR

Çizelge 1.3 Mikoplazma Belirleme Yöntemleri (Uphoff et al. 2002).

Ribozomal RNA genleri, en iyi karakterize edilmiş Mollicute genleridir. Çoğu durumda, 16S rRNA genleri PCR'da hedef dizi olarak kullanılır. Özellikle türler arasında çok iyi korunmuş olan 16S rRNA genlerinin dizileri, filogenetik,

taksonomik ve diagnostik açısından önemli bilgiler sağlar (Naot *et al.*, 1998). *Mollicute* rRNA genlerinin ‘align’ edilmesi sonucunda tür, hatta cinsler arasında korunmuş ve korunmamış bölgeler belirlenmiştir (Çizelge 1.4). Bu sayede mikoplazmaların belirlenip tanımlanabilmesi bu bölgelerden uygun primerlerin seçilimiyle mümkün olmaktadır. Büyük ölçüde korunmuş 16S rRNA gen bölgelerinden evrensel primerlerin seçilimiyle, tüm mikoplazma türleri tek bir reaksiyonla belirlenerek, hücre kültüründe mikoplazma kontaminasyonunun varlığı saptanabilir. Bunun yanında türler arasında az korunmuş 16S-23S intergenik bölgelerden uygun primerlerin seçilimiyle, kültürde hangi tür mikoplazma kontaminasyonu olduğunu belirlemek de mümkün olabilmektedir (Dussurget *et al.*, 1995, Razin., 1994, Drexler *et al.*, 1999).

<i>M. arginini</i>	GCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGC 516
<i>M. hominis</i>	GCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGC 535
<i>M. orale</i>	GCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGC 542
<i>M. salivarium</i>	GCGATGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCNAGC 546
<i>M. fermentans</i>	GCAACGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTTGCNAGC 543
<i>M. hyorhina</i>	GCGACGGCAAACCTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGTCGCAAGC 510
<i>A. laidlawii</i>	GCCCCGGCTAACTATGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACATAGGGGGCGAGC 521
	*** **

Çizelge 1.4 Hücre kültürü kontaminasyonundan sorumlu çeşitli Mikoplazma türlerine ait 16SrRNA gen dizilerinde ‘align’ sonucundan bir bölüm.

1.7. Optik Özellikler

1.7.1 Sınır Açısı ve Tam Yansıma

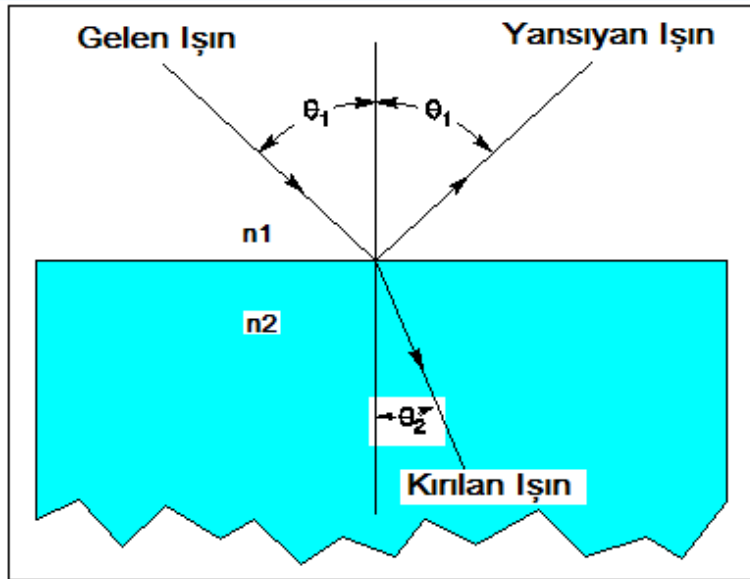
Işığın dalga biçiminde olduğu ve foton denilen parçacıklardan oluştuğu bilinmektedir. Saydam bir maddenin yüzeyine gelen dalganın bir kısmı yansır, bir kısmı da kırılarak kütle içinde ilerler. Işığın boşlukta yayılma hızı c ’nin maddenin içinde yayılma hızı v ’ye oranına kırılma indisi denir.

$$\text{Kırılma indisi } n = c/v$$

Kırılma indisi n_1 olan bir ortamdan kırılma indisi n_2 olan bir ortama geçen ışık için, kırılma indisleri, giriş açısı θ_1 ve kırılma açısı θ_2 , ışığın birinci ortamdaki hızı v_1 ve ışığın ikinci ortamdaki hızı v_2 arasında şu bağıntı vardır (Şekil 1.6).

$$n_1 / n_2 = \sin \theta_1 / \sin \theta_2 = v_1 / v_2 \text{ (snell bağıntısı)}$$

Bir ortamın kırılma indisi ve ışığın normalle yaptığı açı bilirse ışığın ortamda yayılma hızı hesaplanabilir. Kırılma indisi gelen dalgaların enerjisine ve yayıldığı ortamın yoğunluğuna bağlıdır. Yüksek enerjili dalgalar, maddeler içindeki elektronlar ile daha şiddetli etkileşeceğinden hızlarında azalma daha büyük olur. Buna göre saydam bir ortama giren ışık demetinde yüksek enerjili mor ışınlar daha çok, düşük enerjili kırmızı ışınlar daha az sapar. Ortamın yoğunluğu yüksek ise ve yüksek atom numaralı elemanlar içerirse elektron yoğunluğu artar, dolayısıyla ışık dalgaları ile etkileşme daha şiddetli olur ve bunun sonucunda kırılma indisi artar.



Şekil 1.6 Işığın kırılması

Işık ışınları, kırılma indisi küçük ortamlardan büyük ortamlara hangi açı ile gelirse gelsin normale yaklaşarak kırılır ve ikinci ortama geçer. Işık ışınları çok yoğun ortamdan az yoğun ortama geçerken normalden uzaklaşarak kırılır. Çok yoğun ortamdan az yoğun ortama gelen ışınlar ikinci ortama her zaman geçemez. Ancak belli açılardan, küçük açılarla geldiği zaman geçer. Gelme açısı büyüdükçe kırılma

açısı da büyür ve ışığın kırılma açısı 90° olduğu andaki gelme açısına sınır açısı denir. Eğer ışık ışınları sınır açısından daha büyük açıyla gelirse ikinci ortama geçemez ve geldiği ortama normalle eşit açı yaparak geri döner. Bu olaya tam yansıma denir (Serway *et al.*, 2002).

1.8 Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) Biyosensörleri

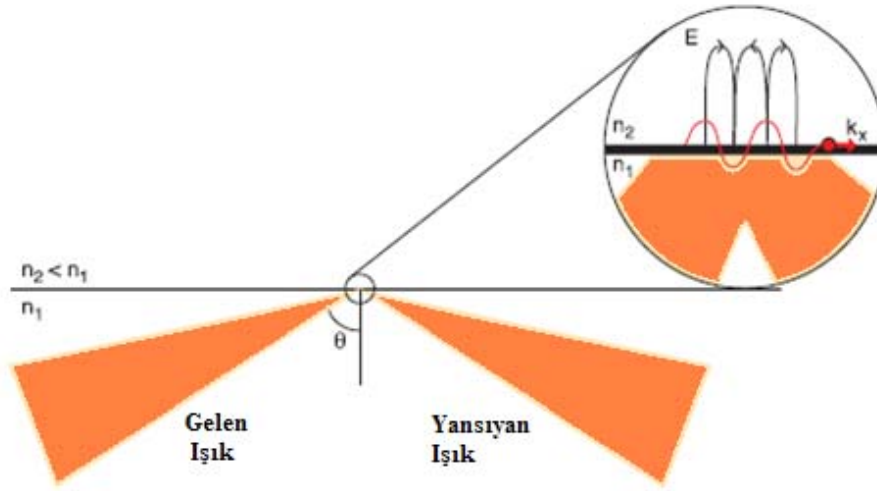
Yüzey Plazmon Rezonans, metal elektronlarının ışıkla etkileşimlerini içeren optik-elektriksel bir olgudur. SPR'nın optik-elektronik temeli, bir metal yüzeyinde bir serbest olarak salınım yapan grup elektrona (plazmon) ışık fotonlarıyla enerji aktarımına dayanır.

Yüzey plazmon rezonansı, makromoleküler etkileşimlerin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. SPR biyosensörleri, sensör yüzeyindeki ve çözeltideki moleküllerin etkileşimlerini molekülleri etiketlemeye gerek kalmadan, kompleks oluşumu ve ayrılmaları, kırılma indisindeki değişimlere bağlı olarak ölçerek belirler. Etkileşimler gerçek zamanlı olarak izlenebilir ve bağlanan ligandın miktarı belirlenip ayrılma (k_{off}) ve bağlanma sabitleri (k_{on}) yüksek duyarlılıkla ölçülebilir. SPR yöntemi son yıllarda biyosensör uygulamalarında yerini almış, protein, oligonükleotit, faj, viral partiküller ve hatta canlı hücrelerin de bulunduğu farklı biyolojik sistemlerdeki etkileşimleri çalışmak için kullanılmaktadır (Gauglitz *et al.*, 1999).

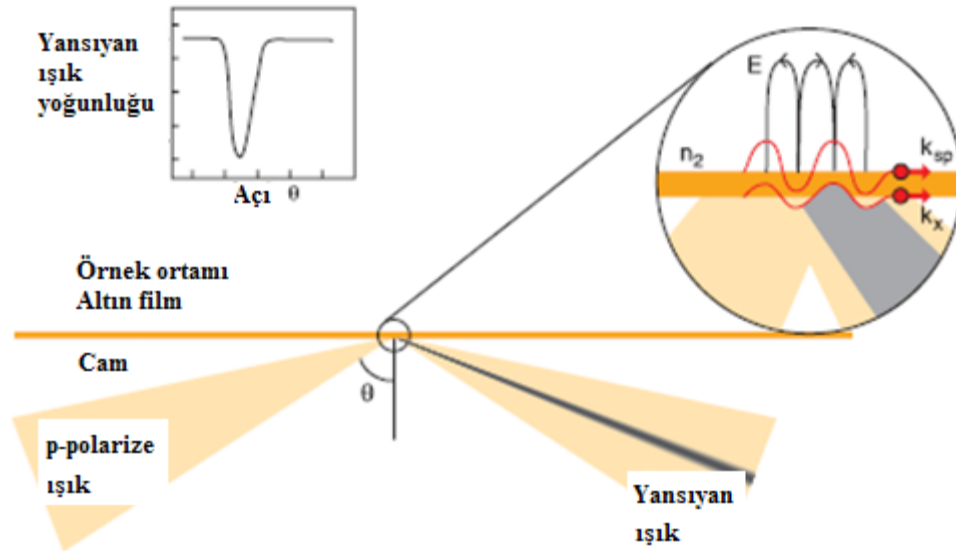
1.8.1 Yüzey Plazmon Rezonans

SPR'ı tanımlayabilmek için, toplam iç yansıma (TIR) kavramını açıklamak gerekir. Yüksek kırılma indisli ortamdan gönderilen ışık demeti düşük kırılma indisli ortamın arayüzünde kritik açıdan yüksek bir açıyla gelerek, yüzeyde tamamen yansır ve yüksek kırılma indisli ortama geri döner (Şekil 1.7). Her ne kadar tam olarak yansıyan ışık TIR yüzeyinde net bir enerji kaybına uğramasa da, ışık ışını düşük kırılma indisli ortama doğru, sönen dalga denilen elektriksel alan olarak sızar. Metal bir tabaka varlığı söz konusu olduğunda sönen dalga alanı artabilir ve dış yüzeydeki serbest elektronlar alan içinde salınım yapmaya başlarlar. Bu durum yüzey plazmon rezonansı olarak adlandırılır (Mirabella *et al.*, 1985).

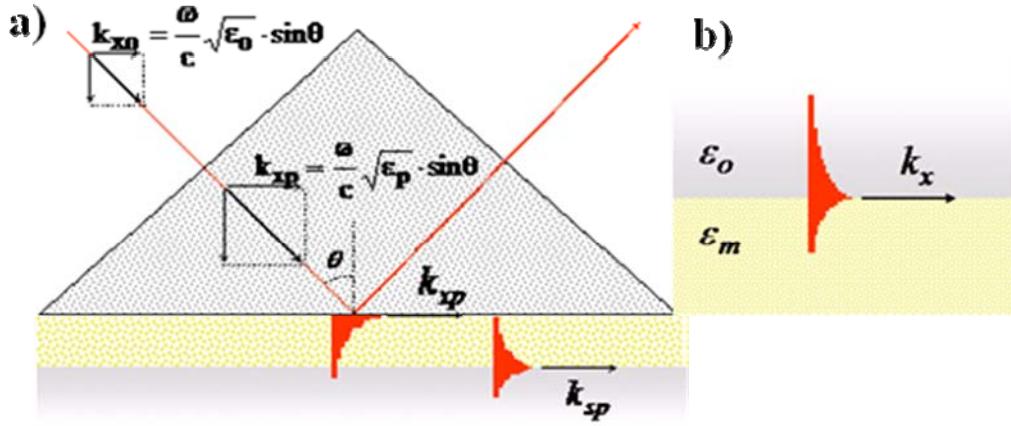
Bir yüzey plazmonun optik uyarımı sönen dalgadan kaynaklanır ve ancak gelen ışık ışını (p veya TM polarize) dielektrik ortam ve ince metal tabakasının arayüzüne rezonans açısı adı verilen belli bir açıyla çarptığında meydana gelir. Rezonans meydana geldiğinde, yani söz konusu rezonans açısında, yansıyan ışığın yoğunluğunda ani bir düşüş yaşanır (Şekil 1.8).



Şekil 1.7 Toplam iç yansımada: Kırılma indisi n_1 olan ortamdan gönderilen ışık daha düşük kırılma indisi (n_2) ortamın yüzeyinde toplam iç yansıma yapar. Sönen dalga, E, çapraz geçişli olmayan tüm uzaysal yönlerde bileşenlere sahip olan, n_2 ortamına doğru alan yoğunluğu azalan bir dalgadır (θ : gelen ışığın açısı, k_x : yüzey plazmon rezonans dalga vektörü) (<http://www.biocore.com>).



Şekil 1.8 Yüzey plazmon rezonans (SPR), metal film yüzeyinde oluşur ve sönen dalga alanı (evanescent field) (E) genliği artar. SPR yansıyan ışık yoğunluğunda yansımının belirli bir açısında, bir düşüş olarak gözlenir (k_{sp} ve k_x : yüzey plazmon rezonans dalga vektörü) (<http://www.biocore.com>).



Şekil 1.9 a) Kretschmann konfigürasyonunda, sönen dalga varlığında SPR uyarımı: (k =gelen ışığın dalga vektörü, ϵ =dielektrik sabiti. **b)** Metal ve dielektrik ortamın arayüzünde gerçekleşen plazmon yayılımının ayrıntılı görünümü.

Yüzeyde elektromanyetik dalga ile birlikte yüzey plazmon oluşumu için, rezonans koşullarının yerine getirilmesi gerekmektedir. Yani, hem yüzey plazmonların (k_{sp}) hem de elektromanyetik dalgaların (k_{xd}) vektörleri eşit olmalıdır.

Havadan gelen ışığın dalga vektörü:

$$K_o = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_o}$$

Burada, ω frekans, ϵ_o ise havanın dielektrik sabitidir. Dalga vektörü eşleşmesi olduğunda, dalga vektörünün yüzeye paralel bileşeni (k_{xd}), rezonans koşullarını sağlamalıdır.

$$K_{xd} = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \cdot \sin \theta = \frac{2\pi}{\lambda} \sqrt{\frac{\epsilon_m \cdot \epsilon_d}{\epsilon_m + \epsilon_d}}$$

Burada θ gelme açısı, ϵ_m metalin dielektrik sabiti ve ϵ_d is prizmanın dielektrik sabitidir. Eşitlikten anlaşıldığı gibi, SPR'nın meydana gelmesi ancak, $\epsilon_m < -\epsilon_d$ olduğunda mümkündür (Şekil 1.9). Bu durum, metalin ve dielektrik ortamın dielektrik geçirgenliğinin zıt işaretlerde olduğunda yüzey plazmonun varolabileceğini açıklamaktadır. Bu koşul sadece spektrumun kızılötesinden görünür bölgesine kadar olan frekanslarda, altın ve gümüş gibi metallerde sağlanır. Metal filmin kalınlığı, minimum yansıma değeri için kritik öneme sahiptir ve optimal kalınlık çevre ortamın optik sabitlerine ve gelen ışığın dalga boyuna bağlıdır.

Rezonans koşullarının yerine getirilmesi için optik uyarılma genellikle iki şekilde sağlanabilir: prizma çiftleyici yapısında toplam yansımayla (Kretschmann konfigürasyonu) ve optik kırınım ağında kırınım. Rezonans açısı, plazmon alanı içinde kalan mesafedeki, metal yüzeyin hemen yakınındaki ortamın refraktif indis değişimlerine son derece duyarlıdır. Bu alan içinde refraktif indisteki herhangi bir değişim, plazmon rezonans açısında açı pozisyonunda bir kaymayla sonuçlanacaktır (<http://www.biacore.com>).

Altın çok sayıda bağlanma kimyasıyla uyumlu olması ve zamanla okside olmaması bakımından SPR çalışmalarında en çok tercih edilen metaldir. Sönen dalga kısa penetrasyon derinliğine sahip olduğundan, bulk çözeltideki proseslerin SPR açısında (minimum yansıma açısı) etkisi azdır. Bu durum rezonans eşleşmesinin, sensör yüzeyine çok yakın bölgelerin (birkaçyüz nanometrelilik mesafe) optik özelliklerine bağlı olduğunu göstermektedir (Cooper, 2003).

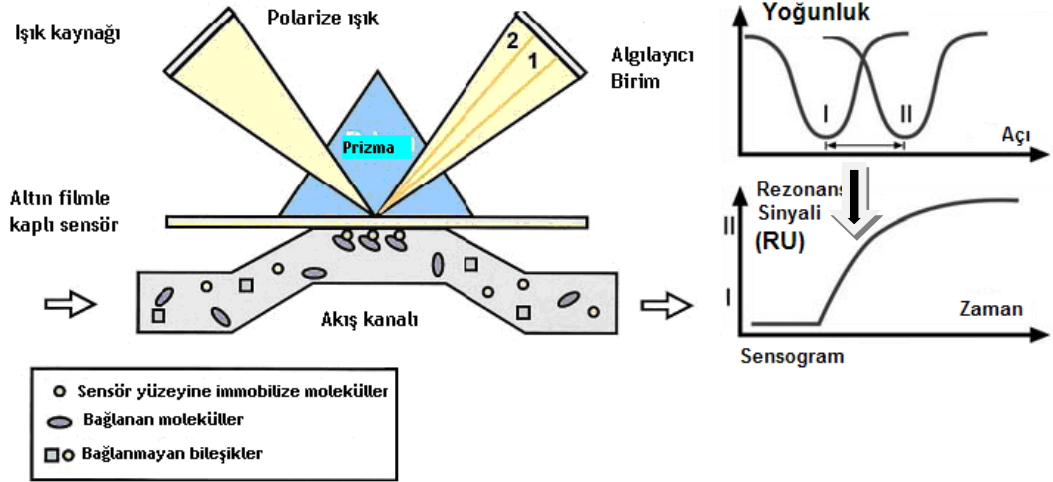
1.8.2. Biyomoleküler Etkileşimler ve Yüzey Plazmon Rezonans

Plazmon frekansının yüzeyde olabilecek değişikliklere hassas bir şekilde bağlı olması bize bu fiziksel mekanizmanın algılayıcı olarak kullanılabilmesi imkanını sağlar (Şekil 1.10).

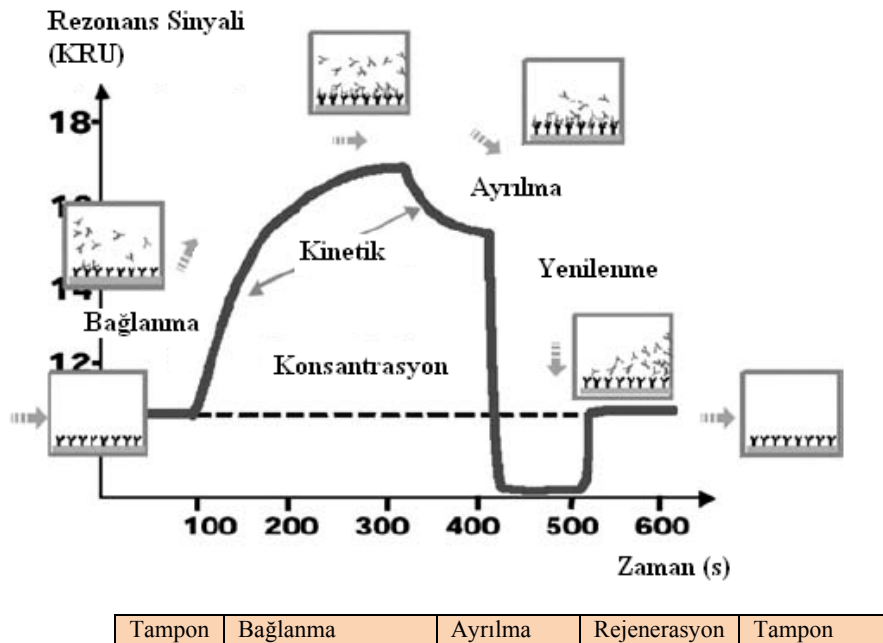
Sensör yüzeyindeki kırılma indisindeki bir değişim rezonans açısında bir kayma olarak gözlenebilir (Şekil 1.11). Gerçek zamanlı olarak bu değişim hassas bir şekilde şu ölçümleri yapmak için kullanılabilir:

- 1) bağlı analitin miktarı
- 2) reseptörün affinitesi
- 3) bağlanma ve ayrılma kinetiği (Şekil 1.11)

Analit yüzeydeki moleküllere bağlandıkça, sensör yüzeyine komşu ortamın kırılma indisi artar, bu durum rezonans sinyalinde artışa neden olur (Cooper, 2003).



Şekil 1.10 Yüzey plazmon rezonansının belirlenmesi: Polarize ışık altın sensör yüzeyine gönderilir, kritik açıda enerji transferi meydana gelerek, yansımada düşüş meydana gelir. Bu açı sensör yüzeyine yakın akış kanalındaki veya sensör yüzerindeki bölgelerdeki kırılma indis farklılıklarına göre değişim gösterir. Moleküllerin bağlanmasıyla kütsel değişimdeki farklılık kırılma indiste değişimler meydana getirir. Bu değişim algılayıcı birim tarafından sinyale çevrilir ve yansımanın zamana bağlı değişimi kaydedilir (<http://www.reichertspr.com/principles.html>). (Bir rezonsan birimi (RU), 1 pg/mm^2 'a denk gelen SPR açısındaki 0.0001° 'lık değişime karşılık gelmektedir (Tien *et al.*, 1999))



Şekil 1.11 Optik bir biyosensöre ait tipik bir bağlanma döngüsü: Uygun bir kimyayla reseptör moleküller yüzeye bağlanır. $t=0$ s' de, mikrofluidik bir sistemde tampon çözelti reseptörle buluşur. $t=100$ s' de analit çözeltisi, reseptör üzerinden geçmeye başlar. Analit yüzeye bağlandıkça, sensör yüzeyinin hemen yakınındaki ortamın kırınım indisi artarak, rezonsan sinyalinde artış meydana gelir. Elde edilen bu eğrinin analizi gözlenen bağlanma hızını (k_{obs}) verir. Eğer analitin konsantrasyonu biliniyorsa, etkileşimin bağlanma hız sabiti (k_{ass}) belirlenebilir. Dengede, reseptöre bağlanan ve ayrılan analit miktarı birbirine eşittir. $t=320$ s' de analit çözeltisi tampon çözeltisiyle yer değiştirilir ve reseptör-analit kompleksi ayrılmaya başlar. Bu bilginin analizi etkileşimin ayrılma hız sabitini (k_{diss}) verir. Etkileşimin affinitesi hız sabitlerinin oranıyla ($K_D=1/K_A=k_{diss}/k_{ass}$) hesaplanabilir (Cooper, 2003, Ross *et. al.*, 1998, Zeder-Lutz *et al.*, 1997).

SPR tekniğiyle, DNA etiketlenmeksizin altın sensör yüzeyindeki, tek ve çift zincirli DNA bölgeleri ayırt edilebilir. Bu özellik DNA örneklerinin hazırlanmasını kolaylaştırdığından ve DNA'lar arasındaki etkileşimler sırasında etiket tarafından oluşturulacak problemleri ortadan kaldırdığından, çoğu DNA hibridizasyonu belirleme yöntemlerine göreceli bir üstünlük sağlar. SPR tekniği gerçek zamanlı olarak sensör yüzeyindeki değişimlerin gözlenmesine olanak sağladığından, artan DNA analitini yıkama gereği yoktur. Bu sayede hibridizasyon ve denatürasyon in situ olarak takip edilebilir. Çoğu DNA hibridizasyon tekniğinde tek baz uyumsuzluklarının ayırımını yapmak için gereken yıkama koşullarını belirlemek zor olduğu için, SPR bu özelliği ile öne çıkar (Serge *et al.*, 2001).

1.8.3 SPR Cihazının Deneysel Kurulumu

Çalışmamızda kullanılan SPR cihazı, dört ana bileşenden oluşmaktadır: Sensör, enjektör, peristaltik pompa ve veri toplama birimi. İlgili kimyasallar, çözeltiler ve örnekler, sensörün akım hücresinden akıtılmaktadır. Sensör dalga kılavuzu olarak Kretschmann geometrisindeki prizma içermektedir. Akım hücresi, prizma yüzeyinin üzerinde bulunan sensör yüzeyini barındırmaktadır. Prizma ve altın yüzey arasındaki optik devamlılık, refraktif indeks uyumlu yağ ile sağlanmaktadır. Çözeltilerin ve örneklerin akım hücresine akışı, mikrofluidik birim kontrolünde yapılmaktadır. “SPR v2.21a alpha”, veri toplama yazılımı, zamanı, piksel sayısını, rezonans açısındaki ve mikrorefraktif indisteki (μ RIU) değişimi ve sıcaklığı ayrı sütunlarda kaydetmektedir. Işık kaynağı 780 nm’lik lazer diyottur ve 3700 piksel yüke bağlı CDD detektör, yansıyan ışığı yakalamaktadır. Sensör çip, 0,95mm kalınlığındaki cam üzerine 1 nm krom tabakası ve onun üzerinde 50 nm altın kaplı tabakadan oluşmaktadır. Analitin sensör yüzeyine bağlanması sırasında oluşan cevap, cihaz tarafından zamana göre mikro refraktif indis birimi (μ RIU) şeklinde kaydedilmektedir. Bir rezonans birimi (RU), SPR açısındaki 0.0001°’lik değişime karşılık gelmektedir (Tien *et al.*, 1999). SPR 4-phase Fresnel yansıma hesaplamalarına göre refraktif indis birimi (RIU) ile, rezonans birimi (RU) arasında göreceli olarak bağlantı kurulabilir: $1\mu\text{RIU}=0.733 \text{ RU}$. RIU’nun zamana göre değişimiyle, sensogramda meydana gelen etkileşimlerin ayrılma ve bağlanma kinetiği görüntülenmektedir (Subramanian *et al.*, 2006).

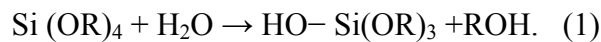
1.9 Sol-Jel Süreci

Kolloid, dağınık fazın çok küçük olduğu ($\sim 1-1000\text{nm}$), bu nedenle yerçekimi kuvvetlerinin ihmal edilebildiği ve kısa mesafeli etkileşimlerin hakim (van der Waals etkileşimleri ve yüzey yükleri) olduğu bir süspansiyondur. Sol, sıvı içindeki katı partiküllerin kolloidal süspansiyonudur. Aerosol, partiküllerin gaz içindeki kolloidal süspansiyonudur. Emülsiyon bir sıvı içindeki başka bir sıvının damlacıklarının süspansiyonudur. Tüm bu kolloid türleri, seramik malzemelerinin yapılabileceği polimer veya partiküllerin oluşturulması amacıyla kullanılabilir. Sol-jel prosesinde kolloid oluşumu için öncüler (başlangıç bileşikleri) çok sayıda ligandla (metal veya metalsi atom içermeyen uzantılar) çevrelenmiş bir metal veya metalsi elementten oluşur. Örneğin; alüminyum oksit için yaygın öncüler karbon içermeyen $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ gibi inorganik tuzlar ve $\text{Al}(\text{OC}_4\text{H}_9)_3$ gibi organik bileşiklerdir. $\text{Al}(\text{OC}_4\text{H}_9)_3$, sol-jel çalışmalarında sıklıkla kullanılan *alkoksit* öncü sınıfına ait bir örnektir. Alkan genel formülü $\text{C}_n \text{H}_{2n+2}$ olan, metan (CH_4) ve etanda (C_2H_6) olduğu gibi, tek bağ ile bağlı karbon ve hidrojen atomlarından oluşan bir moleküldür. Alkil, metil ($\cdot\text{CH}_3$) veya etil ($\cdot\text{C}_2\text{H}_5$) gibi bir alkan molekülünden 1 hidrojenin (proton) atılmasıyla oluşan ligandır. ($\cdot$ bağ yapmak için uygun olan elektronun varlığını belirtir.) Alkol, metanol (CH_3OH) ve etanolde ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$) olduğu gibi bir alkil molekülüne (veya başka bir moleküle) hidroksil (OH) grubunun eklenmesiyle oluşan bir moleküldür. Alkoksit ise, metoksil ($\cdot\text{OCH}_3$) ve etoksil ($\cdot\text{OC}_2\text{H}_5$) gibi bir alkolden bir protonun uzaklaştırılmasıyla oluşan bir ligandır.

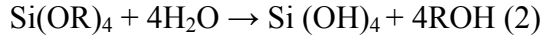
<i>Alkyl</i>		<i>Alkoxy</i>	
methyl	•CH ₃	methoxy	•OCH ₃
ethyl	•CH ₂ CH ₃	ethoxy	•OCH ₂ CH ₃
<i>n</i> -propyl	•CH ₂ CH ₂ CH ₃	<i>n</i> -propoxy	•O(CH ₂) ₂ CH ₃
<i>iso</i> -propyl	H ₃ C(•C)HCH ₃	<i>iso</i> -propoxy	H ₃ C(•O)CHCH ₃
<i>n</i> -butyl	•CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₃	<i>n</i> -butoxy	•O(CH ₂) ₃ CH ₃
<i>sec</i> -butyl	H ₃ C(•C)HCH ₂ CH ₃	<i>sec</i> -butoxy	H ₃ C(•O)CHCH ₂ CH ₃
<i>iso</i> -butyl	•CH ₂ CH(CH ₃) ₂	<i>iso</i> -butoxy	•OCH ₂ CH(CH ₃) ₂
<i>tert</i> -butyl	•C(CH ₃) ₃	<i>tert</i> -butoxy	•OC(CH ₃) ₃
<i>Other</i>			
acetylacetonate	$ \begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{H} \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \text{C} - \text{O} - \text{C} - \text{C} - \text{C} - \text{O} - \text{C} \text{H} \\ \quad \quad \quad \quad \\ \text{H} \quad \quad \text{O} \quad \quad \text{O} \quad \quad \text{H} \\ \quad \quad \bullet \quad \quad \bullet \end{array} $		
acetate	$ \begin{array}{c} \text{H} \\ \\ \text{H} \text{C} - \text{C} - \text{O} \bullet \\ \\ \text{O} \end{array} $		

Çizelge1.5 Kullanılan Ligandlar

Metal alkoksitler, metal veya metalsi bir atoma bağlı organik bir liganda sahip metalorganik bileşikler sınıfının bir üyesidir. En çok çalışılmış örneği silikon tetraetoksittir (veya tetraetoksisilan, veya tetraetil ortosilikat TEOS) Si(OC₂H₅)₄. Organometalik bileşikler, metal alkoksitlerde görülen metal-oksijen-karbon bağına sahip olmayan, doğrudan doğruya metal-karbon bağına sahip bileşiklerdir. Bu nedenden ötürü, literatürde sıklıkla kullanılmalarına rağmen, metal alkoksitler organometalik bileşikler değildir. Metalalkoksitler suyla kolayca reaksiyona girdiğinden popüler bileşiklerdir. Bu bir hidroliz reaksiyonudur, sonuç olarak görüldüğü gibi bir hidroksil iyonu metal atomuna bağlı hale gelmektedir:

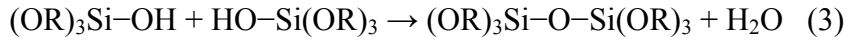


R bir proton veya başka bir ligandı belirtir (eğer R alkil ise, •OR alkoksi grubudur), ROH bir alkoldür (çizgi (–) kimyasal bağı göstermek amacıyla kullanılır). Varolan su ve katalizör miktarına bağlı olarak, hidroliz tamamlanmaya kadar gidebilir, böylelikle tüm OR grupları OH ile yer değiştirir,

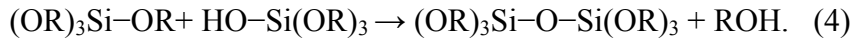


veya metal kısmi olarak hidrolize durumdayken reaksiyon sonlanır, $\text{Si(OR)}_{4-n}(\text{OH})_n$.

Kısmen hidrolizlenmiş moleküller yoğunlaşma reaksiyonuyla tekrar birbirlerine bağlanabilirler.



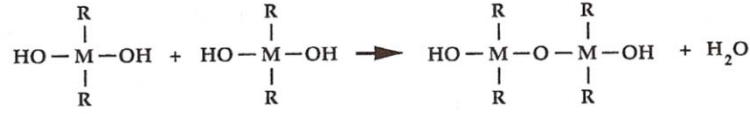
veya



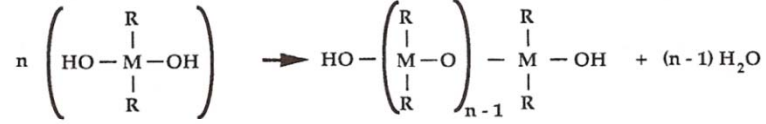
Tanım olarak, yoğunlaşma reaksiyonu, su veya alkol gibi küçük bir molekülü serbest bırakır. Bu tür bir reaksiyon devam ederek, polimerizasyon işlemiyle giderek daha büyüyen ve silikon içeren moleküllerin oluşmasını sağlayabilir.

Bir polimer ('çok üyeli') en az iki bağ yapabilme özelliğine sahip ve monomer denilen yüzlerce veya binlerce birimden oluşan çok büyük bir moleküldür (makromolekül olarak da tanımlanabilir). Oligomer , "mono"dan daha büyük, "makro"dan daha küçük olmak üzere orta boyutta bir moleküldür . Bir monomerin oluşturabildiği bağ sayısı, onun fonksiyonelliği (f) olarak adlandırılır. Tipik bir oksit monomeri bifonksiyonel ($f=2$), trifonksiyonel ($f=3$), tetrafonksiyonel ($f=4$) olur, bunların herbirisi polifonksiyonel olarak da adlandırılabilir. İki reaktif olmayan R grubu ve 2 reaktif hidroksil grubuna sahip olan, dört ligandlı bir metal atomu $\text{MR}_2(\text{OH})_2$ ele alındığında, bu bileşik Şekil 1.12' de görüldüğü gibi ancak lineer zincir ve halkalara polimerize olabilir.

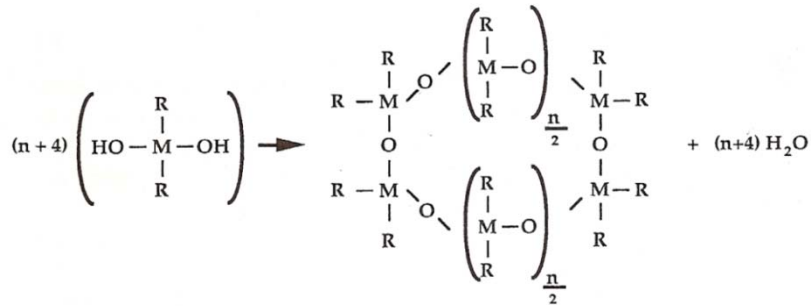
DİMER



ZİNCİR

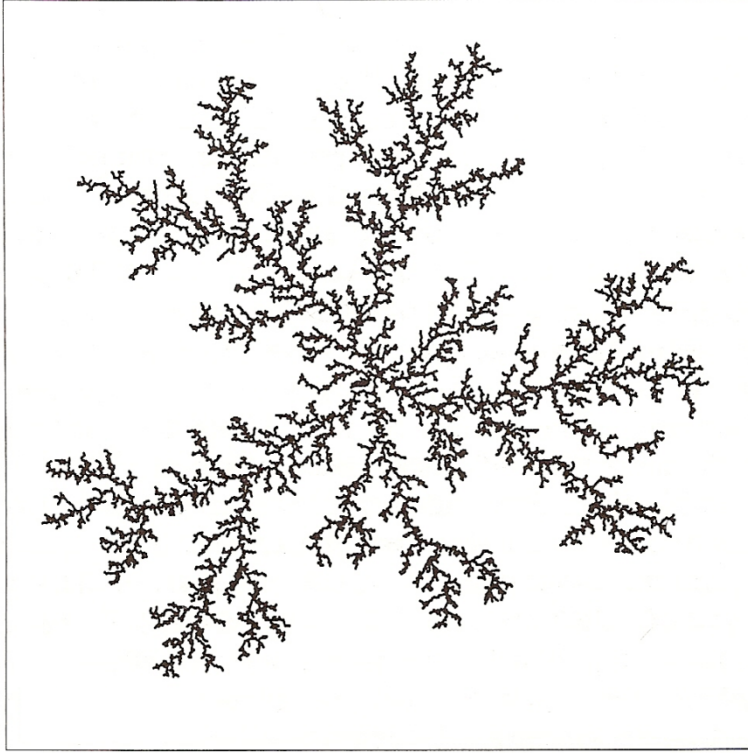


HALKA



Şekil 1.12 $f=2$ Fonksiyonelliğine Sahip Monomerin Polimerizasyonu

Eğer $f > 2$ olan çok-fonksiyonlu bir ünite varsa, zincirler üçboyutlu bir yapı oluşturacak şekilde çapraz bağlantılarla birleşebilir. Örneğin, silikon alkoksitin polimerizasyonu, tamamiyle hidrolize $\text{Si}(\text{OH})_4$ monomeri tetrafonksiyonel olduğundan, polimerin kompleks dallanmasına neden olabilir. Diğer yanda, düşük su konsantrasyonu gibi belirli koşullarda dört liganddan daha azı yoğunlaşma yeteneğine sahiptir, böylelikle az miktarda dallanma meydana gelir (Şekil 1.13).



Şekil 1.13 $f > 2$ 'ye Sahip Monomerin Polimerizasyonu (Brinker *et al.*, 1990)

Bir monomer ikiden fazla bağ kurabiliyorsa, o zaman oluşabilecek molekülün boyutunda bir kısıtlama olamaz. Eğer bir molekül makroskopik boyutlara ulaşırsa ve bulunduğu çözeltinin içinde her yere yayılırsa, bu maddeye jel denir. Jel noktası, bu dev molekülün oluşumunu tamamlayan son bağın yapıldığı zamandır (veya reaksiyon derecesidir). Bu nedenle jel, sürekli sıvı fazı çevreleyen sürekli katı iskeletine sahip bir maddedir. Katı yapının sürekliliği jelle esneklik kazandırır. Jeller aynı zamanda parçacıklı kolloid çözeltilerinden de oluşabilir, dağılma kuvvetlerinin etkisiyle, parçacıklı kolloid çözeltiler bir ağ oluşturacak şekilde birbirlerine yapıştığında bu durum söz konusu olur. Jellerin özellikleri bağ yapısına bağlı değildir: polimerik jeller kovalent bağ ile, jelatin jeller zincirlerin birbirine dolaşmasıyla, parçacıklı jeller ise van der Waals etkileşimleriyle oluşurlar. Jel, kolloidal boyutlarda sürekli katı ve akışkan fazdan oluşur. Süreklilik, örneğin bir ucundan diğer ucuna katı faz içinde sıvı faza girmeden veya sıvı faz içinde katı faza girmeden gerçekleştirilen yolculuk olarak tanımlanabilir.

Bağ oluşumu jelleşme noktasında sona ermez. İlk aşamada, ağ uyumludur, bu nedenle jel ağının parçaları daha fazla yoğunlaşmaya izin verecek ölçüde yakın bir

biçimde hareket edebilirler. Buna ek olarak, jel ağı içinde hala kolloid çözeltisi bulunmaktadır ve daha küçük partikül ve polimerler ağ içine katılmaya devam ederler. Yıllanma, monomerler veya oligomerlerin daha da yoğunlaştırılmasını, çözünmesini ve yeniden çökmesini veya katı ve sıvı faz içindeki faz dönüşümlerini kapsar.

Genel olarak, jelleşme sürecinin, sızma teorisine göre, birbirlerine çarpmaya başlayınca kadar büyüyen fraktal kümelenmelerin oluşmasıyla başladığı, ardından da bu kümelerin birbirlerine bağlandıkları görülmüştür. Yani, jel noktasının yakınında, bağlar hemen hemen hareketsiz olan kümelenmelerin (polimer veya partikül toplulukları) bir ağ içerisinde bağlanmasıyla rastgele bir şekilde oluşurlar. Jel noktası, kolloid çözeltisinin her yerine yayılan bir tek küme belirlediği zaman, sızma eşiğine denk düşer. Jelleşme kolloid çözeltisinin bir kalıba dökülmesinden sonra meydana gelebilir, böylelikle istenilen biçimde objeler elde edilebilir. Eğer jelin en küçük boyutu birkaç milimetreden büyükse, malzeme monolit olarak adlandırılır. Bunun yanında, jelleşme film ve fiberlerin yapımında olduğu gibi çözeltinin hızla buharlaştırılmasıyla da gerçekleştirilebilir (Brinker *et al.*, 1990).

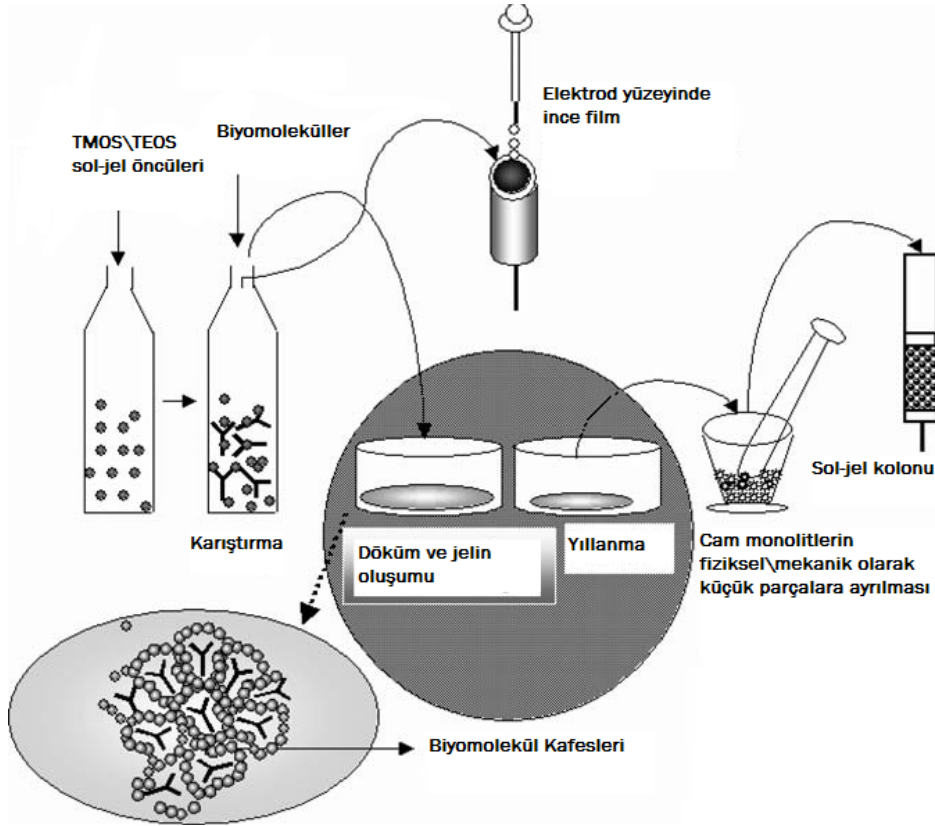
1.9.1 Sol-Jel ve Optik Biyosensörler

Katı fazdaki optik biyosensörler, aynı anda sahip olunması gereken pek çok özelliği bünyelerinde barındırmalıdır. Birinci ve en önemli özellik malzemenin, UV'den kızılötesine dek farklı dalga boylarında optik geçirgenliğe sahip olmasıdır. İkinci özellik ise malzemenin kimyasal olarak kararlı, reaksiyona girmeyen yapıda ve hem gaz hem de sıvılarda işlevsel olmasıdır. Malzeme biyomolekülle etkileşime girmemeli, analitlerin girişine izin vermelidir. Optik biyosensörlerde biyomolekülün katı destek üzerine immobilizasyonu, fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağ ve fiziksel tutundurulmayla sağlanır. Tüm bu bahsedilen özelliklere sahip malzemenin geliştirilmesi sırasında çok sayıda problemle karşılaşılır.

Son yıllarda, bu özellikleri karşılamak üzere Sol-jel silika malzemeler geliştirilmiştir (Zink *et al.*, 2002). Cam ve polimer arasında bir yapıda olan, sol-jel malzemelerin biyomoleküllerin immobilizasyonuna uygun olduğu anlaşılmış biyosensör uygulamalarında yeni imkanlar sağlamıştır (Gorton, 2005). Sol-jel

matriksler optik olarak geçirgen olduğundan tutuklanan biyolojik moleküllerin kimyasal etkileşimlerine ve bu etkileşimlerin gösterimine olanak sağlarlar. Biyomoleküllerin sol-jel içinde tutuklanması çalışmaları son yıllarda gittikçe gelişen yeni bir alandır (Mackenzie, 2003; Gill and Ballesteros, 2000; Sakka, 2003; Jin and Brennan, 2002). Sol-jel içinde moleküllerin kapsüllenme yöntemleri, geleneksel immobilizasyon yöntemlerine alternatif yeni ve umut verici stratejilerdir. Fiziksel kapsülleme yöntemi desorpsiyon sorunlarını yok eder ve biyomoleküllerin kovalent modifikasyonunu gerektirmez. Sol-jel yapıdaki katı matriks, UV ve görünür ışık spektrumunda geçirgen olduğundan spektroskopik analizlere olanak sağlar (Avnir *et al.*, 1994; Dave *et al.*, 1994). Silika mekanik, termal ve kimyasal bakımdan kararlı bir malzemedir (Zink *et al.*, 2002). Sol-jel sürecinde, jelleşme derecesinin polimerleşme derecesine oranı kontrol edilerek malzemelerde yoğunluk, kırılma indisi/sertlik, esneklik/sıkıştırılabilirlik derecesi/aşınmaya karşı direnç ve kopma eğilimi tasarlanan şekilde değişikliğe uğratılabilir.

Sol-jel malzemeler, gözenekli ve hidrofilik yapılarıyla su ile dolu gözeneklere ev sahipliği yapar. En önemli özelliği ise yapısındaki gözeneklerin nano boyutlarda olmasıdır. İnorganik ağ içinde büyük biyomoleküller immobilize edilebilirken küçük iyon ve moleküller bu ağ içine ve dışına difüze olabilirler (Şekil 1.13-1.14). Bu sayede immobilize edilen biyomolekölün, yakın çevresinde gelişen kimyasal değişimlere tepki vermesi mümkün olmaktadır (Zink *et al.*, 2002).



Şekil 1.14 Sol-jel Süreci

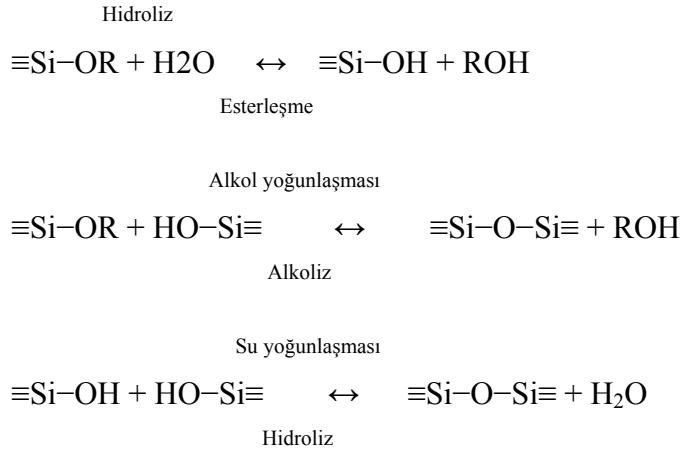
Sol-jel tekniğiyle başarıyla tutuklanan ilk biyomoleküller, enzimlerdir (Gill and Ballesteros, 2000). Bunun dışında sol-jel malzemelerle hücrelerin ve bakterilerin tutuklanması da çalışılmış ve çeşitli başarılar elde edilmiştir; bakteri (Branyik and Kuncova, 2000; Peralta-Perez et al., 2001; Coiffier et al., 2001; Nassif et al., 2002; Fennouh et al., 1999), hayvan hücreleri (Sglavo et al., 1999) ve bitki hücresi (Cartursn et al., 1998). Ayrıca, sol-jel matrikslerin oluşturulmasında DNA'nın kalıp olarak kullanıldığı bir uygulama da olmuştur (Numata et al., 2004) (Şekil 1.15).

1.9.2 Sol-Jel Kimyası

Biyosensör uygulamalarında temel gereksinim, iyi bir optik kalite ve kararlı yapıda sol-jel tabanlı camsı matrikstir (Gupta *et al.*, 2007). Sol-jel süreci, amorf inorganik katıların üretiminin yapıldığı kimyasal sentez tekniğidir (Zink *et al.*, 2002). Sol-jel süreci sıvı haldeki 'sol' bileşiminin, katı 'jel' fazına geçişini içeren bir oluşumdur. Genel olarak, sol-jel yöntemi, alkoksit öncülerinin asidik veya bazik koşullarda hidrolizini ve bunu takiben hidroksillenmiş birimlerin yoğunlaşmasını

(kondensasyon) veya çoklu yoğunlaşmasını içeren, gözenekli yapıda jel oluşumuyla sonuçlanan bir süreçtir.

Sol-jel süreci sırasında, düşük moleküler ağırlıklı alkoksit öncü molekülleri, örneğin; tetrametoksi silan (TMOS) veya tetra etoksisilan (TEOS), öncelikle su veya asit katalizöründe ya da her ikisinde de hidrolize olur (Gill *et al.*, 2000). Metal alkoksit öncü moleküllerinin (TMOS veya TEOS) hidrolize uğraması sonucunda, silanol grupları (Si-OH) oluşur. Kondensasyon reaksiyonu ile bu silanol grupları etkileşir ve siloksanları (-Si-O-Si-) oluştururlar. Son olarak da silanol veya siloksan gruplarının çoklu kondensasyonu ile, yılanma süreci veya kurutma süreci sonrasında SiO₂ matriksleri meydana gelir. Oluşan matriksin yapısal özelliği, örneğin gözenek büyüklüğünün dağılımı, hidroliz ve yoğunlaşma reaksiyonlarının birbirine oranlarına bağlı olarak değişir.



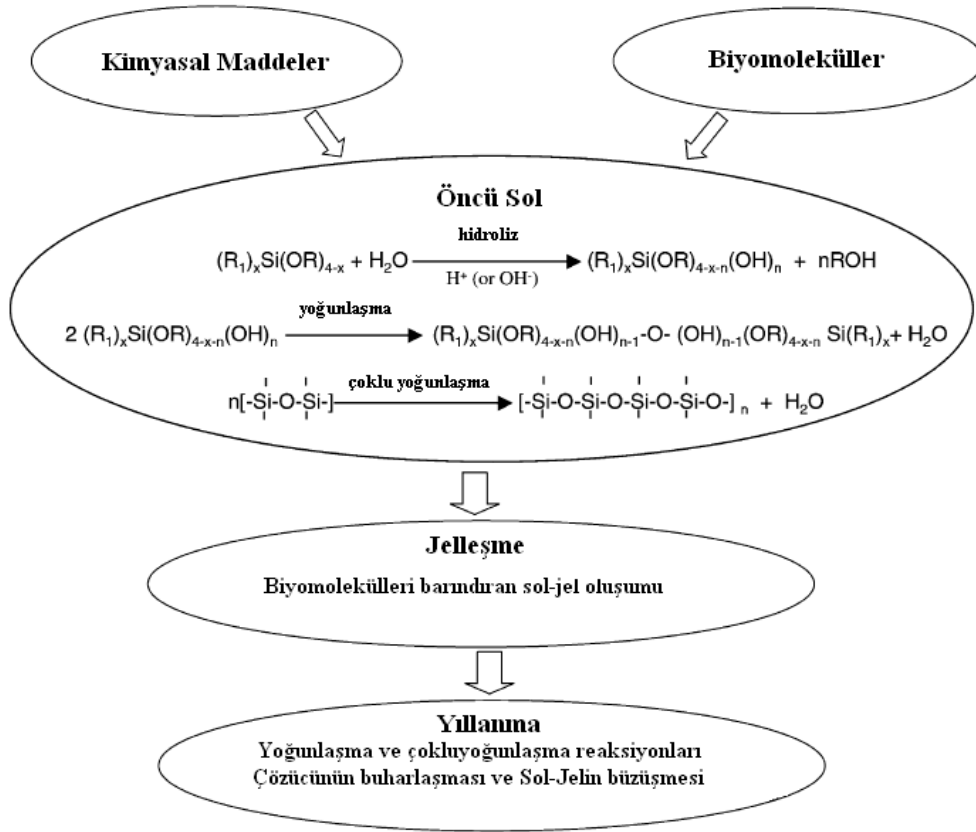
Jelleşme noktası, silika matriksin içinde bulunduğu kabın içinde sürekli yapıda olduğu andır. İki ayrı fazdan oluşur: amorf silika partikülleri (5-10 nm çapında) ve bunların arasındaki sıvı faz.

Jelleşme zamanı, sentezlenme koşullarına göre birkaç saniyeden birkaç güne değişebilmektedir. Jelleşme sonrası, sol-jel materyali dinamik bir yapı olarak kalır; yoğunlaşma reaksiyonları, geriye kalan hidroksil ve alkoksi grupları birbirlerine etki edecek kadar yakın oldukları müddetçe devam eder. Jelleşmeden sonra jel, kserojel oluşturmak üzere kurutulabilir. Kuruma sırasında sıvı kısım ortamdan çekildikçe silika matriks içine doğru küçülür. Sonuç olarak kserojel ilk hacminin ~10-15%'ine

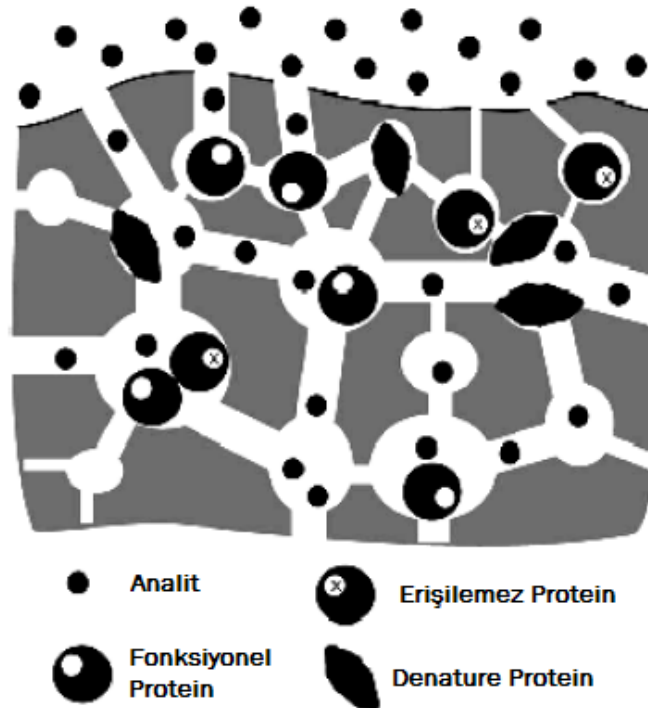
küçülerek, 100 Å'dan daha küçük gözenek büyüklüğüne sahip olabilmektedir. Bunun yanında jel su veya tampon çözeltiyle hidrat formda tutulabilir, bu tür jellere yıllanmış jel denir (Zink *et al.*, 2002).

Oluşan sol-jel, birbirine bağlı, sert yapıda ve mikrometreden daha küçük boyutlarda gözeneklere ve ortalama büyüklüğü mikrometreden büyük olan polimerik zincirlere sahiptir. Hidroliz için en çok HCl ve amonyak kullanılır ama bunun dışında asetik asit, KOH, aminler, KF, HF, de kullanılabilir (Brinker *et al.*, 1990). Hidrolizin hızı ve uzunluğu, büyük ölçüde kullanılan asit veya baz katalizörün gücünden ve konsantrasyonundan etkilenir (Aelion *et al.*, 1950). Genellikle zayıf asitler, bir reaksiyon için güçlü asitlere göre çok daha fazla zaman gerektirir. Aynı konsantrasyonlarda, bazla katalizlenen silikon alkoksit hidrolizi, asitle katalizlenen reaksiyonlardan çok daha yavaş gerçekleşir (Xi *et al.*, 1995).

Silika sol-jeller şeffaftır, kimyasal olarak tepkimeye girmez ve mekanik olarak kararlı yapıdadır. Her ne kadar kırılgan bir yapıda olsalar da, biyokapsüllenme için elverişlidirler (Kandimalla *et al.*, 2006).



Şekil 1.15 Sol-jel tabanlı inorganik, organik nanobileşiklere biyomoleküllerin tutundurulma yöntemleri



Şekil 1.16 Sol-jel matris içinde tutuklanmış proteinin olası mikroçevresi (Jin *et al.*, 2002).

1.9.3 Sol-Jel ve Kaplama

Sol-jel tabanlı ince filmler, biyosensör tasarımında, analitin biyomoleküle ulaşması için difüze olması gereken yolun kısa olması ve bu sayede analitin hızla belirlenebilmesine olanak sağladığı için sıklıkla tercih edilir (MacCraith *et al.*, 1995; Lev *et al.*, 1995; Malins *et al.*, 2000).

1.9.4 DNA ve Sol-Jel

DNA gibi biyomolekül türlerinin kullanımı uygun bir yüzey üzerine başarılı bir şekilde immobilizasyonlarına bağlıdır. Organik, inorganik veya polimerik yüzeyler üzerine biyomolekül immobilizasyonu yüzeye kovalent bağlanma, mikrokapsüllenme veya tutuklanma ile sağlanır (Colello D. *et al.*, 2003).

Silika sol-jeller DNA hibridizasyon çalışmaları için çok sayıda özelliğe sahiptir. Bu özellikler arasında, yüksek iç yüzey alanı ve gözeneklere sahip olmaları, yüksek sıcaklıklar gerektirmeyen üretim teknikleriyle oluşturulmaları ve biyomoleküllerle uyumlu olmaları sıralanabilir (Conroy *et al.*, 2000).

Biyomoleküllerle uyumlu silika jellerin iç yapısı geleneksel tekniklerle üretilen ve yapısında etanol bulunan sol-jellerin aksine, tamamiyle sulu bir ortama sahiptir (Brinker *et al.*, 1990), (Conroy *et al.*, 2004).

1.9.5 Silan Kaplı Yüzeye DNA İmmobilizasyonu

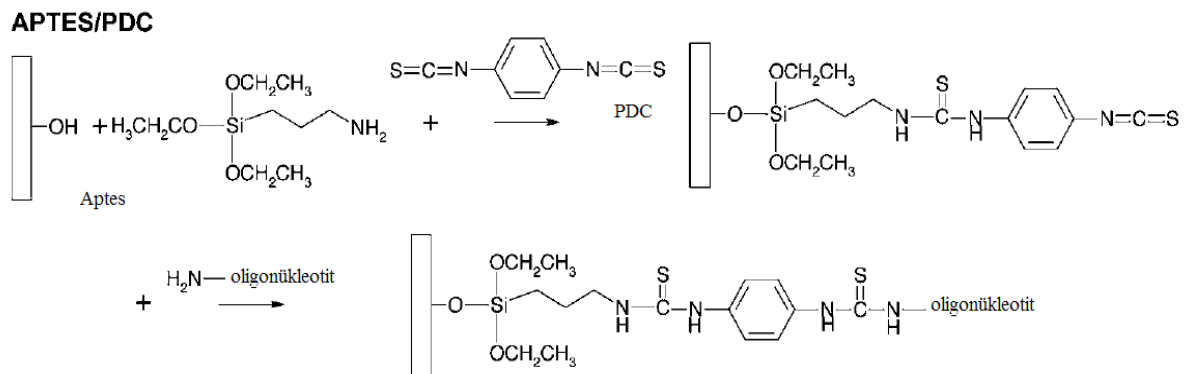
Sol-jel yapılı silan filmlerin DNA “microarray” çalışmaları için uygun yüzeyler oluşturduğu bilinmektedir. Silan yapıda filmlerin kullanılmasıyla, DNA problemlerinin yüzeye kovalent olarak bağlanması, probun yönlendirilmesi bakımından büyük ölçüde kontrol sağlar.

Silan kimyası, özellikle amin modifiye DNA problemlerinin immobilizasyonunda kullanılmaktadır. Reaktif fonksiyonel gruplar DNA’nın kovalent bağlanması için uygundur: amino, merkapt ve epoksi grupları. Sıklıkla kullanılan silanize edici

kimyasallar şunlardır: 3-aminopropiltrimetoksilan (APS), 3-merkaptopropiltrimetoksilan (MPS), 3-glisidoksi propiltrimetoksilan (GPS) (Lingerfelt *et al.*, 2005). Bu bifonksiyonel gruplar, sırasıyla, amino, merkapt ve epoksi fonksiyonelliğine sahip yüzeyler oluştururlar. Bu grupların kimyasal olarak kararlı ve sterik engellere bağlı karışıklıkları elimine edecek kadar edecek uzun olduğu belirlenmiştir (Southern *et al.*, 1992).

Uygun yapıda hidrokarbon (C5, C6, C7) ara gruplara sahip amin modifiye oligonükleotidler epoksi ve aminden türemiş yüzeylere bağlanabilirler. Amin modifiye problemler, amin yapısındaki yüzeylere bağlanırken 1,4-fenilendiisotiosiyanat (PDITC) ve 4-fenilendiisotiosiyanat (PDC) gibi çift fonksiyonlu çapraz bağlayıcı kullanılır (Lingerfelt *et al.*, 2005).

Amin modifiye DNA'nın kovalent bağlanabilmesi için fonksiyonel gruplar sağlayan 3-aminopropiltrioksilan (APTES), 1,4-fenilendiisotiosiyanat (PDC) gibi bir çapraz bağlayıcı ihtiyaç duyar. PDC'nin yokluğu amin-modifiye DNA'nın APTES yüzeyine kovalent bağlanmasını engeller, çünkü tek başına 2 amino grubu birbirleriyle bağ yapamazlar (Fritzsche *et al.*, 2005).



Şekil 1.17 DNA bağlanması için yüzeyin silan modifikasyonu: 3-aminopropiltrioksilan (APTES)' in amin bağlanma kimyası. Amin-modifiye DNA'lar çift taraflı bağlayıcı 1,4-fenilendiisotiosiyanat (PDC) üzerinden APTES'e bağlanırlar (Fritzsche *et al.*, 2005).

1.10 İnce Filmler

Sol-jel teknolojisinin en önemli yanlarından birisi, jelleşme öncesinde, akışkan veya kolloid çözeltinin daldırma, döndürme ve püskürtme yöntemlerini kullanarak ince film oluşturulması için ideal olmasıdır. Kalınlığı 1 μm 'den küçük olan filmlere ince film denir. Sol-gel filmlerinin ilk uygulamaları optik kaplamalardır. Sol-jel yöntemiyle, üç tip film elde etme yöntemi mevcuttur. Bunlar; daldırma (dip coating), döndürme (spin coating) ve püskürtme teknikleridir. Daldırma yönteminde, filmin her tarafında aynı, düzenli bir kalınlık elde edilebilir. Döndürmeli kaplama yönteminde, daldırma yöntemine göre çok daha fazla çözücü buharlaşması meydana gelir bu da sol-jelin fiziksel özelliklerinde hızlı değişimlere yol açar (Brinker *et al.*, 1990).

Geleneksel ince film oluşturma yöntemleriyle karşılaştırıldığında, sol-gel yöntemiyle film yapımı daha az donanım gerektirir ve daha az masraflıdır. Sol-gel yönteminin en önemli avantajı, kaplanan filmin mikro yapısının (gözenek büyüklüğü, gözenek hacmi ve yüzey alanı) kontrol edilebilmesidir.

Daldırma ve döndürme ile kaplamada filmin mikro yapısı, kaplama süresince yoğunlaşma ve buharlaşmanın oranına ve kaplama öncesi çözeltinin dallanmasına (ve topaklanmasına) ve boyutlarına bağlıdır. Bu faktörlerin kontrolü, istenilen film gözenek yapısının kontrol altına alınmasını sağlar. Örneğin; gözenek hacmi %0'dan %65'e, gözenek boyutu <0,4 nm'den >5 nm'ye ve yüzey alanı <1 m²/g'dan >250m²/g'a değiştirilebilir.

İnce filmlerin oluşumunda en önemli faktörler, filmin kalınlığı, düzenliliği, homojenliği, substrat adezyonu, çatlamalara karşı direnci, sabit iç ortamının olması, tutuklanmış moleküllerin sızma potansiyellerinin en aza indirgenmesidir.

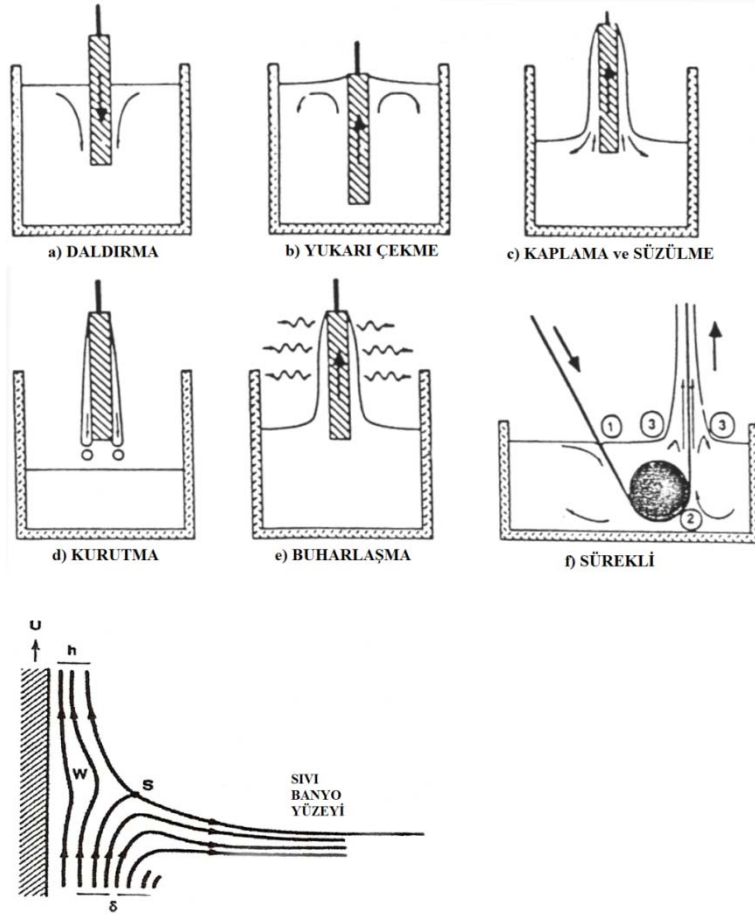
Sol-jel yapıdaki filmlerin kalınlıkları, büyük ölçüde döküm çözeltisinin viskozitesine bağlı olarak gelişen sol'un jelleşme biçimine bağlıdır. Tampon çözeltiyle karıştırılan hidrolize silanın jelleşme oranını etkileyen ana faktörler şöyle sıralanabilir: a) organosilan türü ve oranı, b) eklenen polimerlerin moleküler ağırlığı

ve konsantrasyonu, c) tamponun türü, pH'ı ve konsantrasyonu. Jelleşme süresi, organosilan, polimer miktarındaki veya tampon pH'ındaki artışla ve tampon çözelti konsantrasyonundaki azalmayla artar (Gupta *et al.*, 2007).

1.10.1 Daldırarak Kaplama

Daldırarak kaplama işlemi beş bölüme ayrılır: daldırma, başlama, kaplama, kurutma ve buharlaşmadır. Alkol gibi uçucu çözücüler kullanıldığında buharlaşma, kaplama ve kurutma basamakları sırasında meydana gelir. Şekil 1.18.f'de gösterildiği gibi sürekli daldırarak kaplama, işlemi kolaylaştırır. Çünkü başlama ve kurutma zamanını elimine eder.

Kaplama yapılan altlık yukarı doğru çekilirken, yüzeyde oluşan sıvı tabaka ikiye ayrılır. Altlığa yakın tabaka altlıkla birlikte yukarı çıkar. Dıştaki tabaka aşağı doğru süzülerek banyoya geri döner. Dış tabaka banyoya geri döndüğünde, içteki tabaka, altlıkla beraber yukarı doğru hareket eder. Kaplanan filmin kalınlığı, aşağıya ve yukarıya doğru hareket eden tabakaların aerodinamik bölünmesiyle bağlantılıdır. Film kaplanan bölgedeki altı kuvvetin aralarındaki rekabetle, film kalınlığını ve akım çizgisinin pozisyonunu geliştirir. Bu altı kuvvet; (1) Hareketli alt tabakayla sıvı üzerinde yukarı doğru viskoz sürüklenme, (2) Yerçekimi kuvveti, (3) Konkav sıvı sütununda yüzey genişlemesinin etkin kuvveti, (4) Kaplanan bölge sınırındaki sıvının eylemsizlik kuvveti, (5) Yüzey gerilim gradyanı, (6) Ayrışma ve birleştirme basıncı (1 μm kalınlıktan daha az olan filmler için önemlidir) olarak tanımlanır (Brinker *et al.*, 1990).



Şekil 1.18 Daldırarak Kaplama İşleminin Basamakları: (a-e)banyo; (f) sürekli.

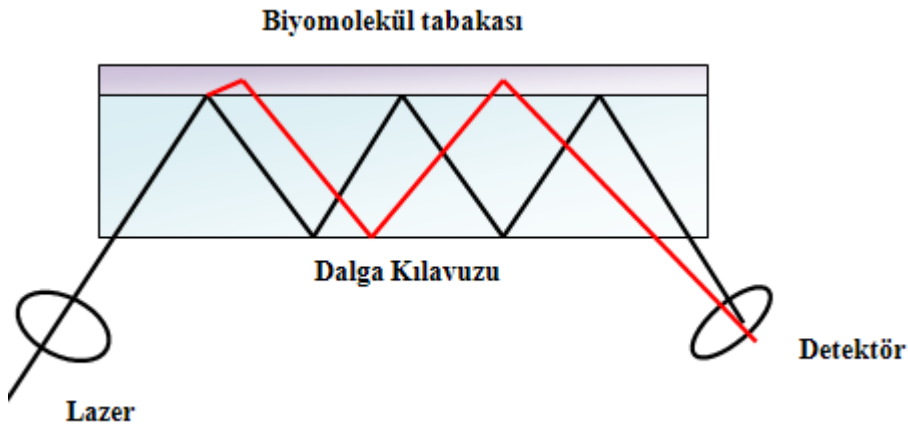
Sürekli işleminin 3 ile gösterilen alandaki sıvı akış noktalarının detayı: U-çekme hızı, S-durgunluk noktası, δ -bağlı tabaka ve h- akışkan filmin kalınlığı (Brinker *et al.*, 1990).

1.10.2 Döndürerek Kaplama

Bu yöntem, taşıyıcının yatay olarak bir eksen etrafında döndürülürken üzerine sol damlatılması ve solün merkezkaç kuvvetinin etkisiyle taşıyıcı yüzeyine yayılması esasına dayanmaktadır. Döndürerek kaplam yöntemi 5 kısımdan oluşmaktadır. Damlatma aşamasında, dönecek yüzeye sabitlenmiş olan taşıyıcı üzerine sol damlatılır. Başlangıçta durmakta olan taşıyıcı döndürülür. Taşıyıcı, mümkün olan en kısa sürede istenilen dönme hızına ulaşmalıdır. Çünkü dönme hızının sabit olması, film kalınlığının düzgün olmasını etkileyecektir. Dönme sırasında, taşıyıcı üzerine damlatılmış sol, merkezkaç kuvvetinin etkisi ile taşıyıcının tüm yüzeyine yayılır. Eğer sol fazla miktarda damlatılmışsa, fazlalık sol taşıyıcı üzerinden savrulur. Dönme esnasında, filmin kalınlığı azalır. Dönme sonunda, filmin kalınlığı taşıyıcının her yüzeyinde aynı olur. Ardından buharlaşma aşaması gelir. Taşıyıcı bu işlemten sonra fırınlanabilir.

1.11 Optik Dalga kılavuzu

Optik dalgakılavuzlarının çalışma prensibi, optik fiberlere benzer. Cam yüzey, daha düşük kırınım indisine sahip 0.1-10 μ m kalınlığında dielektrik filmle kaplanır. Biyomolekül içeren substrat bu yüzeyin üzerine gelecek şekilde oluşturulur. Cihaza gönderilen ışığın büyük bir kısmı, ortam boyunca ilerleyerek pek çok kez yansıma yapar. Bununla birlikte, bir miktar ışık da biyomolekül tabakasının içine doğru sızar. Bu ışık, iletilen ışık miktarında farklılığa yol açan faz değişimiyle birlikte, dalga kılavuzuna geri yansır. Böylelikle, biyoaktif substrat tabakasındaki değişimler, yansıyan ışık miktarındaki değişikliklerle belirlenebilir hale gelir (Donald, 1993).

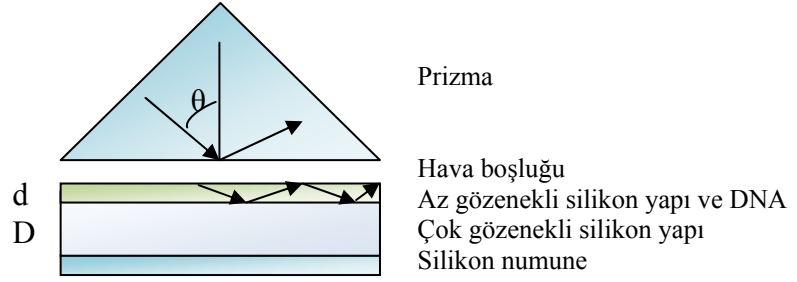


Şekil 1.19 Optik Dalga kılavuzu Ölçüm Prensibi.

1.11.1 Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü

DNA hibridizasyonu ve biyomoleküllerin affinite çalışmalarında ve biyomoleküllerin işaretlenmesine gerek olmayan optik biyosensörlerde örnek hazırlama süreci oldukça kolaylaşmaktadır. Bu tür sensörlerde, örneğin DNA hibridizasyonunu belirleme, kırınım indisi değişimiyle mümkün olmaktadır. Gözenekli silikon (Psi) yapıdaki dalga kılavuzu temelli biyosensörlerin çalışma mekanizması, biyomoleküller arasındaki etkileşimler sonucunda, dalga kılavuzunda efektif refraktif indis değişimine bağlı açı kaymalarına dayanır (Weiss et al., 2006). Yapılan hesaplamalar sonucunda, teorik olarak optimize edilmiş dalga kılavuzu

temelli sensörlerin geleneksel SPR sensörlerine göre ~100 kat daha hassas olduğu belirtilmektedir (Sipe et al., 2005).



Şekil 1.20 Gözenekli silikon yapıdaki dalga kılavuzu temelli biyosensör

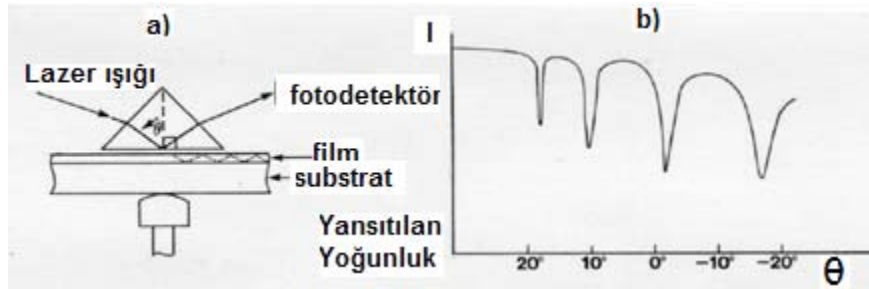
Şekil 1.19’da görüldüğü gibi, oluşturulan yüksek alan / hacim oranına sahip gözenekli silikon yapıdaki sensör yüzeyinin üst tabakası (d) az sayıda gözeneğe bu nedenle yüksek kırınım indisine sahipken, altındaki daha çok gözeneğe sahip tabaka (D) daha düşük kırınım indisine sahiptir. Bu nedenle, prizma tabanından çıkan θ açısıyla gelen ışınla, az gözenekli üst silikon tabakanın arayüzünde toplam iç yansıma meydana gelir. Oluşan toplam iç yansımayla, uygun dalga vektörüne sahip sönen dalga, gelen ışığın uygun bir açıda olması durumunda, dalga kılavuzu moduna geçer. Biyomolekülün bulunduğu tabakada optik enerjinin sınırlanmasıyla, efektif refraktif indis biyomoleküldeki değişimlere son derece hassas hale gelir (Weiss *et al.*, 2006). Az gözenekli silikon tabakasına tutundurulan DNA prob’larına hibridize olmak üzere ortama verilen hedef DNA’ların yüzeye geçişiyle, hibridizasyonla birlikte az gözenekli silikon tabakasının kırınım indisi değişir. Bunun nedeni silikonun gözenekli yapısından dolayı (~10nm) efektif bir ortam olarak davranmasıdır (Weiss *et al.*, 2006).

1.11.2 Prizma Çiftleyici Cihazının Ölçüm Teorisi

Çalışmamızda Metricon (2010 model) prizma çiftleyici cihazı kullanılmıştır. Prizma çiftleyici cihazında, ölçüm yapılacak örnek prizma tabanı ile temas edecek şekilde, film ve prizma arasında çok küçük bir hava boşluğu oluşturularak yerleştirilir. Prizmaya çarpan lazer ışını, prizma tabanından foto detektöre toplam iç yansıma yaparak ulaşır. Gelme açısının belirli değerlerinde “mod açısı (Θ)”, fotonlar toplam iç yansıma durumunu bozarak, hava boşluğundan filme geçerek

dalga kılavuzu moduna geçer, bu noktada detektöre ulaşan ışık yoğunluğunda keskin bir düşüş meydana gelir. Prizma tabanına gelme açısı, her bir mod için karakterize edildiğinden, n_1 indisine sahip prizmanın tabanına ulaşan herhangi bir θ_1 açılı ışığın β değeri şöyle belirlenir:

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



Şekil 1.21 a) Prizma çiftleyicinin şematik gösterimi, **b)** yansıtılan ışık yoğunluğu (I), gelme açısı (θ), (<http://www.metricon.com/>).

Daha genel bir tanımla, herhangi bir ışık ışını için β değeri; $n \cdot \sin(\theta)$ 'dur (n : ışığın yol aldığı ortamın indisi, θ : gelme açısı).

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

β değerleri, ışık ışını iki ortamın sınırında yansıtıldığında korunur. Ayrıca, fotonlar prizma tabanından filme dalga kılavuzu modunda girdiklerinde, prizma/film yüzeyinde yansıtılmış gibi davranarak Snell yasasına bağlı kalırlar, böylelikle prizma ve film arasındaki β değeri değişmeden kalır. Prizma çiftleyici cihazıyla, ince filmlerin kalınlığı ve kırılma indisi değerlerinin ölçümü yapılabilir (<http://www.metricon.com/>).

1.12 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada, hücre ve doku kültürlerinde kontaminasyona neden olarak deney sistemlerini farklı seviyelerde etkileyen belirli Mikoplazma türlerinin (*M. arginini*, *M. fermentas*, *M. hominis*, *M. hyorhina*, *M. orale*, *M. pirum*, *M. salivarium*) hızlı ve etkin bir biçimde belirlenmesine yönelik SPR ve dalga kılavuzu temelli sol-jel içeren optik biyosensörlerin tasarlanması hedef alınmıştır. Mikoplazma türlerine ait 16S rRNA dizileri türler arasında büyük ölçüde korunmuş bölgeler içerdiğinden, sensörlerde kullanılan proplar ve PCR primerleri, belirlenen türleri aynı anda teşhis etmeye yönelik olarak minimum sayıda seçilmiştir.

Sensör oluşturulması amacıyla ilk olarak, altın ve aptes yüzeyinde kimyasal olarak 5'ucundan çeşitli biçimlerde modifiye tek zincirli hedef DNA'ların immobilizasyonu gerçekleştirilmiş, PCR yöntemi kullanılarak sensör güvenilirliği test edilmiştir.

Mikoplazma tanısına yönelik optik biyosensörlerin tasarımıyla, ekonomik ve aynı zamanda çabuk ve etkin tanı olanağı yaratılarak hücre ve doku kültürü yapan araştırma gruplarının örneklerini sıklıkla ve güvenilir bir şekilde test edebilmelerine olanak sağlamak amaçlanmıştır.

2. MATERİYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Kimyasal Maddeler

Kimyasal Madde	Firma
1,4-Fenilendiisosiyanat	Aldrich
50 bp DNA Belirteci	Fermentas
Agaroz	Sigma
Amonyak çözeltisi (%25)	Merck
Aptes	Merck
Asetil aseton	Merck
Aseton	Merck
Dimetil sülfoksit	Sigma
Disodyumfosfat	AppliChem
DMEM	Sigma
DMEM-F12	Sigma
dNTP set	Fermentas
Etanol	Merck
Et-Br	Sigma
Fetal Bovin Serum	Gibco
Fetal Bovin Serum	Sigma
Hidrojen peroksit	Merck
MilliQsu	Merck
N-N Dimetil formamid	Merck
PBS	Gibco
Penisilin/Streptomisin	Gibco
Potasyum klorür	Sigma
Primerler	İontek

Problar	Thermo Fisher Scientific
QIAamp DNA Mini Kit	Qiagen
RPMI-1640	Gibco
RPMI-1640	Sigma
SDS	Sigma
Sodyum bikarbonat	Sigma
Sodyum klorür	Sigma
Taq DNA Polimeraz	Fermentas
TEOS	Merck
Triton X-100	Sigma
Trypsin-EDTA (10X)	Sigma

2.1.2. Cihazlar ve Diğer Malzemeler

Cihazlar ve Malzemeler	Firma
Laminar akımlı kabin	Heraeus
0,2µm filtre	Schleicher&Schuell
Agaroz jel yürütme ünitesi	Bio-Rad
Altın kaplı yüzey	Reichert
Cam pipet	Iso-Lab
CO ₂ inkübatörü	Thermo Forma
Cryo tüpler	Nunc
Enjektör (5-20cc)	Set
Eppendorf tüp	VWR
Etüv	Binder
Evaporasyon cihazı	Leybold Univex
Işık mikroskobu	Nicon Inverted Microscope
Manyetik karıştırıcı	Ikamag RH
Mikro pipetör (2-200µl)	Gilson, Eppendorf, Brand
MJ mini termal döngü cihazı	Bio-Rad
Otoklav	Hirayama, Hiclive, HVE-50
Prism Coupler cihazı	Meticon

Santrifüj	Beckman coulter microfuge 18, Biofuge 15 R Heraey
Santrifüj tüpleri (15ml ve 50ml),	TRP
Sıcak su banyosu	Memmert
Sıvı azot tankı	Union Carbide
Spektrometre	Bio-Rad Smart Spec
SPR Spektroskopisi	Reichert tek kanallı SPR
Steril tek kullanımlık polistren kaplar	Nunc (Kültür kapları (25cm ² , 75cm ²))
Taramalı elektron mikroskobu	Philips XL30 SFEG,
Ultrasonik banyo	Somibtec
Vorteks	IKA

2.1.3. Kullanılan Çözeltiler

1) Hücre Kültürü Çözeltileri

- **10X RPMI-1640:** 15,8 gr RPMI-1640, 90 ml steril distile su içinde çözülerek toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'ta saklanmıştır.
- **10X DMEM-F12:** 12 gr DMEM-F12, 90 ml steril distile su içinde çözülerek toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'ta saklanmıştır.
- **10X DMEM:** 10 gr DMEM, 90 ml steril distile su içinde çözülerek toplam hacim steril distile su ile 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'ta saklanmıştır.
- **10X NaHCO₃:** 2,43 gr NaHCO₃, 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 µm por çaplı filtre ile steril edilerek +4°C'ta saklanmıştır.

- **1X Trypsin-EDTA Solüsyonu:** 45 ml Puck's saline A solüsyonuna, 5 ml 10X Trypsin-EDTA solüsyonundan eklenerek % 9,2'lik NaHCO_3 veya 1N HCl ile pH 7,4'e ayarlanmıştır ve +4°C'ta saklanmıştır.
- **% 9,2 NaHCO_3 :** 9,2 gr NaHCO_3 90 ml steril distile suda çözülerek toplam hacim steril distile su eklenerek 100 ml'ye tamamlanmıştır. 0,22 μm por çaplı filter ile steril edilerek +4°C'ta saklanmıştır.
- **1 N HCl:** 91,72 ml steril distile suya, 8,28 ml % 37'lik HCl eklenerek 0,22 μm por çaplı filtre ile steril edilmiş ve +4°C'ta saklanmıştır.
- **1X PBS (Phosphate Buffered Saline):** 137mM NaCl, 1,47mM KH_2PO_4 , 8,26mM NaH_2PO_4 , 500 ml steril distile suda hazırlanmıştır. 0,1M'lık NaHCO_3 ile pH 7,3'e ayarlanarak, 0,22 μm por çaplı filtre ile steril edilerek küçük hacimlerde -20°C'ta saklanmıştır.
- **DMEM Besiyeri:** 50 ml FBS (Fetal Bovine Serum), 50 ml 10X DMEM, 50 ml 10X NaHCO_3 (Sodyum bikarbonat) ve 5 ml Penisilin-Streptomisin üzerine steril distile su eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7,2-7,4'e %9,2'lik NaHCO_3 veya 1N HCl ile ayarlanmıştır ve +4°C'ta saklanmıştır.
- **DMEM-F12 Besiyeri:** 50 ml FBS, 50 ml 10X DMEM-F12, 50 ml 10X NaHCO_3 ve 5 ml Penisilin-Streptomisin steril üzerine distile su eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7,2-7,4'e %9,2'lik NaHCO_3 veya 1N HCl ile ayarlanmıştır ve +4°C'ta saklanmıştır.
- **RPMI-1640 Besiyeri:** 50 ml FBS, 50 ml 10X RPMI-1640, 50 ml 10X NaHCO_3 , ve 5 ml Penisilin-Streptomisin üzerine steril distile su eklenerek hacim 500 ml'ye tamamlandıktan sonra pH 7,2-7,4'e %9,2'lik NaHCO_3 veya 1N HCl ile ayarlanmıştır ve +4°C'ta saklanmıştır.

- **1X Hücre Saklama Solüsyonu:** 5 ml DMSO, 45 ml FBS'ye eklenerek % 10'luk stok medyum yapılmış ve +4°C'ta saklanmıştır.

2) Kullanılan Kimyasallar

- **Triton X-100 (% 0,1'lik) Hazırlanması:** 50 µl Triton X-100, 49,95 ml PBS'e eklenerek +4°C'ta saklanmıştır.
- **Etanol (% 70'lik) Hazırlanması:** 70 ml etanole 30 ml steril distile su eklenmiş ve +4°C'ta saklanmıştır.
- **1M Tris:** 1M Tris- HCl steril distile su ile hazırlanarak 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.
- **0,5M EDTA:** 0,5M EDTA steril su ile hazırlanarak, 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.
- **1M EDTA:** 1M EDTA steril su ile hazırlanarak, 0,1M NaHCO₃ ile pH 8'e ayarlanmış ve oda sıcaklığında saklanmıştır.
- **% 10 SDS:** 20 g SDS son hacim 200 ml olacak şekilde distile suda çözünmüş ve oda sıcaklığında saklanmıştır.
- **1X TE:** 10mM Tris-HCl, pH 8 ve 1mM EDTA pH 8 steril distile su ile hazırlanarak oda sıcaklığında saklanmıştır.
- **50X TAE:** 121g Trisbase 300 ml steril distile suda çözülmüştür. 28,55 ml glacial asetik asit ve 50ml EDTA (0,5 M, pH3.8) eklenmiş ve toplam çözelti 500 ml olacak şekilde distile su ile tamamlanmış ve oda sıcaklığında bekletilmiştir.
- **Agaroz jel (%2'lik):** 2 gr Agar 1X TAE ile 100 ml'e tamamlanarak, mikrodalga fırında eritilmiş ve kalıba dökülmeden önce Et-Br (final konsantrasyon: 0.5 µg/ml) eklenmiştir.

- **Altın yüzeyleri yıkama çözeltisi:** Sırasıyla hacimsel olarak 1:1:5 oranlarında H_2O_2 (30%), NH_3 (30%) ve distile su karıştırılarak hazırlanmıştır.
- **İmmobilizasyon çözeltisi:** 0,5 M KH_2PO_4 ve 0,5 M K_2HPO_4 ayrı ayrı distile suda hazırlanarak, karıştırılmıştır. pH 3.8'ı olacak şekilde 1N HCl ile ayarlanmıştır. 22 μm por çaplı filtre ile steril edilmiştir.
- **6-merkapto-1-heksanol (MCH) bloklama çözeltisi:** 1 mM MCH çözeltisi hazırlamak amacıyla, 13.6 μl %99'luk MCH, 100 ml distile su ile tamamlanıp karıştırılarak hazırlanmıştır.
- **SPR için hibridizasyon çözeltisi:** 150mM NaCl, 20mM Na_2HPO_4 , 0.1 mM EDTA ve 0.005% Tween 20, 500 ml distile suda hazırlanıp, 1N HCl ile pH 7.4'e ayarlanmıştır. 22 μm por çaplı filtre ile steril edilmiştir.
- **0,37 M TEOS kaplama çözeltisi:** Sırasıyla 1:1:0,5:3 molar oranlarında sırasıyla, TEOS: etanol: asetil aseton: distile su ilave edilerek hazırlanmıştır.
- **%0.2 PDC çözeltisi:** 0.2 g PDC, 100 ml DMSO içinde 60°C'ta çözünene dek karıştırılarak hazırlanmıştır.
- **%2'lik APTES çözeltisi:** 1:1 oranında dH_2O ve metanol içinde %2'lük APTES çözeltisi manyetik karıştırıcıda hazırlanmıştır.
- **Sol-Jel yapıdaki DNA biyosensörü için immobilizasyon ve hibridizasyon çözeltisi:** 20 mM Hepes için, 0,953 g Hepes 200 ml suda çözülerek hazırlanmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Çalışılan Hücre Kültürleri

Çeşitli hücre kültürü örneklerinde Mikoplazma kontaminasyonu varlığının belirlenmesi amacıyla hücre kültürü çalışan farklı araştırma gruplarından toplanan örnekler aşağıdaki tabloda listelenmiştir. Toplanan hücreler, mikoplazma içermediği PCR ile test edilen besiyerleri kullanılarak çoğaltılmış ve tekrar eden çalışmalar için -86 °C'ta muhafaza edilmiştir.

Hücre Tipi	Morfoloji	Büyüme karakteri	Besiyeri	Kaynak
C6	fare glioblastoma hücreleri	adherent	DMEM-F12	İstanbul Tıp Fakültesi- Histoloji ve Embriyoloji AD Prof. Dr. Ayhan Bilir
BM	sıçan primer kemik hücreleri	adherent	DMEM	Yeditepe Üniversitesi Genetik ve Biyomühendislik B. - Doç.Dr. Gamze Köse
K562	insan lenfosit hücreleri (KML)	süspansiyon	RPMI-1640	Sabancı Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri ve Biyomühendislik B. - Doç. Dr. Batu Erman İstanbul Üniversitesi DETAE - İmmünoloji AD – Dr. Esin Aktaş DETAE Genetik AD - Dr. Duran Üstek GYTE – Biyoloji B. - Araştırma Görevlisi - Mine Gül Şeker
K562(GF+)	insan lenfosit hücreleri (KML)	süspansiyon	RPMI-1640	İstanbul Üniversitesi - DETAE Genetik AD - Dr. Duran Üstek
SP2-0	fare miyolema hücreleri	süspansiyon	RPMI-1640	GYTE – Biyoloji B. - Araştırma Görevlisi - Mine Gül Şeker
Thp-1	insan monosit hücreleri	süspansiyon	RPMI-1640	İstanbul Üniversitesi - DETAE Genetik AD - Dr. Duran Üstek
MCF-7	insan meme adenokarsinoma hücreleri	adherent	DMEM-F12	GYTE - Moleküler Biyoloji AB -Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu
293-T	insan böbrek adenokarsinoma hücreleri	adherent	DMEM	İstanbul Üniversitesi - DETAE Genetik AD - Dr. Duran Üstek Sabancı Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri ve Biyomühendislik B - Doç. Dr. Batu Erman
ŞA	primer endometriyum kanser hücreleri	adherent	DMEM-F12	GYTE - Moleküler Biyoloji AD - Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu
SPC111	insan mezotelyoma hücreleri	adherent	RPMI-1640	GYTE - Moleküler Biyoloji AD- Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu

SPC212	insan mezotelyoma hücreleri	adherent	RPMI-1640	GYTE - Moleküler Biyoloji AD - Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu
EL4	fare lenfosit hücreleri	süspansiyon	RPMI-1640	Sabancı Üniversitesi, Biyoloji Bilimleri ve Biyomühendislik B - Doç. Dr. Batu Erman
Ishikawa	insan endometriyum kanser hücreleri	adherent	DMEM-F12	İstanbul Tıp Fakültesi - Histoloji ve Embriyoloji AD - Prof. Dr. Ayhan Bilir
T47-D	insan meme bezi duktal karsinoma hücreleri	adherent	DMEM-F12	GYTE - Moleküler Biyoloji AD - Yrd. Doç. Dr. Asuman D. Zergeroğlu

Çizelge 2.1 Çalışmada kullanılan hücre hatları

2.2.1.1. Hücrelerin Pasajlanması

Bir önceki kültürdeki flask yüzeyinin yaklaşık %80'ini kaplayan hücrelerin 1/3'ü (1×10^5 hücre/ml) 25 cm² veya 75 cm²'lik flaslara aktararak, bu flaslarda tercih ettikleri besiyerinde (1:1) (DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) F12, DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) veya RPMI-1640), ve %10 FBS (Fetal Bovin Serum), 1x NaHCO₃, %1 Penisilin/Streptomisin varlığında %5 CO₂ varlığında, 37°C'ta inkübe edilmiştir.

Üç günde bir tekrar eden pasajlamalarda; hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması için 1X Tripsin-EDTA kullanılmış, 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edildikten sonra taze besiyerine alınarak flaslara aktarılmış ve pasajları yapılmıştır.

2.2.1.2. Hücre Stoklama ve Dondurulmuş Hücrelerin Çözülmesi

%80'lik flask yüzeyi hücrelerle kaplandığında, tripsinle muamele edilmiş hücreler, 1X PBS ile yıkanmış, yüzeyden ayrılan hücreler 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiştir. Besiyeri uzaklaştırıldıktan sonra 10% DMSO (Dimetil sülfoksit) içeren serum ile süspanse edilerek 1,5 ml'lik kriyo tüplere alınan hücreler ve -86°C'ta bir gece bırakıldıktan sonra sıvı azot tankına aktarılmıştır.

Kültür başlatmak için sıvı azota alınan hücreler 37°C'ta hızlı şekilde çözöldükten sonra RPMI-1640 (DMEM-F12, DMEM) besiyeri ilave edilerek 1000

rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve sıvı kısım uzaklaştırılmıştır. Oluşan pelet ilgili besiyeri ile tekrar süspanse edilerek 25 cm²'lik flasklara alınmıştır.

2.2.2 DNA İzolasyonu

Hücre kültürü örneklerinden Mikoplazma ve hücre genomik DNA'sının saflaştırılması için QIAGEN'nin QIAamp 96 DNA saflaştırma kiti kullanılmıştır.

2.2.2.1 QIAGEN DNA Saflaştırma Kiti Protokolü

Belli bir yoğunluğa ulaşan adherent hücreler tripsin ile kaldırılarak 1000 rpm'de 5 dakika santrifüj edilmiş ve besiyeri vakumla çekilerek uzaklaştırıldıktan sonra 1'er ml soğuk PBS eklenen hücreler 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktararak 1000 rpm'de ve +4°C'ta 5 dakika santrifüj edilmiştir. Üst sıvı uzaklaştırıldıktan sonra, hücrelere toplam hacim 200µl olacak şekilde 1X PBS eklenerek karıştırılmıştır. Bunun üzerine 20µl Proteinaz K ve kit tarafından sağlanan 200 µl hücre liziz tamponu eklenip, örnek yeteri kadar karıştırılarak hücrelerin lizize uğraması sağlanmıştır. Örnekler 55°C'ta 10 dakika bekletilmiştir. Sonra, 200 µl 96% etanol eklenerek, örnekler vortekslenmiş ve DNA bağlayan kolonlara uygulanmıştır ve ardından 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında kolonlar 2 ml'lik toplama kaplarına aktararak, kolonlara kit tarafından sağlanan yıkama çözeltisinden 500 µl eklenmiş ve 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj yapılmıştır. Santrifüj sonrasında kolonlar tekrar yeni 2 ml'lik toplama kaplarına aktararak, kolonlara kit tarafından sağlanan bir diğer yıkama çözeltisinden 500 µl eklenerek, 14000 rpm'de 3 dakika santrifüj yapılmıştır.

Matrikse bağlı DNA'ları ayırtırmak amacıyla, kolonlar yeni 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarılmış, 200 µl nükleaz içermeyen su eklenerek örnekler oda sıcaklığında 5 dakika bekletildikten sonra 8000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda eppendorf tüpünde toplanan DNA örneğinin, bir bölümü hem %0.7'lik agaroz jelde yürütülerek Et-Br boyama ile analiz edilmiş, hem de her bir örnek için DNA miktarları spektrofotometrik olarak ayrıca saptanmıştır.

2.2.3 16S rRNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı

Hücre kültürü bulaşlarının % 95'inden sorumlu 6 Mikoplazma türüne ve 1 Acheloplasma türüne (*M. arginini*, *M. fermentas*, *M. hominis*, *M. hyorhins*, *M. orale*, *A. laidlawii*, *M salivarium*) ait NCBI gen veri bankasından indirilen 16S rRNA genlerine ait nükleotit dizilerinde, ClustalW2 dizi karşılaştırma programı kullanılarak, korunmuş bölgeler belirlenmiştir. Bu bölgelerden 2 farklı primer çifti tasarlanmıştır (McGarrity, 1982). Çizelge 2.2'de bu tez çalışması kapsamına alınan hücre kültürü örneklerinde Mikoplazma kontaminasyonlarını PCR ile belirlemek amacıyla kullanılan primer dizileri belirtilmiştir.

Primer Adı	Primer Dizisi	Açıklama	T _m	Ürün Boyutu
MYA	5' - GGCGAATGGGTGAGTAACACG -3'	ileri	56.2 °C	460 bp
MYB	5' - GGATAACGCTTGCGACCTATG -3'	geri	57.6 °C	
MYPR	5' - TCACGACACGAGCTGACGA -3'	ileri	57.9 °C	310-320 bp
MYPF	5' - TGGGGAGCAAACAGGATTAGA -3'	geri	57.5 °C	

Çizelge 2.2 Primer listesi

Bu çalışmada 'Bio-Rad MJ Mini' termal döngü cihazı kullanılmıştır. Optimizasyon için her bir primer çifti, 60 °C'tan 55 °C'e doğru farklı tutunma sıcaklıklarında (60°C/ 59.7°C/ 59°C/ 58.1°C/ 57 °C/ 56.1 °C/ 55.4 °C/ 55.0 °C) ve 1.5, 2.0, 3.0 ve 4.5 mM MgCl₂ konsantrasyonlarında denenmiştir.

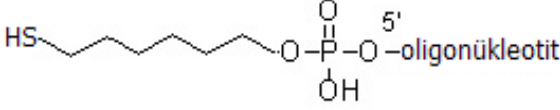
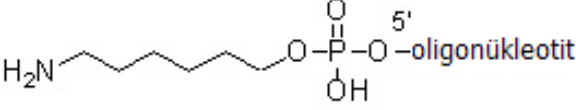
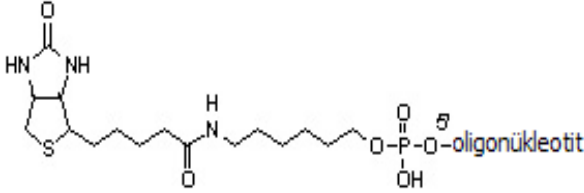
Agaroz jelde elde edilen sonuçlar ışığında, reaksiyonların MYA-MYB primer çifti için 3 mM MgCl₂'de, 57°C'ta ve MYPR-MYPF primer çifti için 2 mM MgCl₂'de 57°C'ta gerçekleştirilmesine karar verilmiştir.

20 µl final PCR hacmi 1x Taq DNA polimeraz tamponu, primer çiftine uygun olarak 2mM veya 3mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP karışımı, 0.5 µM gene özgün ileri primer, 0.5 µM gene özgün geri primer, 1.25U/tüp Taq DNA polimeraz ve uygun miktarda dH₂O içerecek şekilde hazırlanmıştır. PCR, 95°C'ta 4 dakika ilk denatürasyonu takiben 25 döngü olacak şekilde 95°C'ta 1 saniye denatürasyon,

primer çiftine uygun T_m 'de 1 dk bağlanma ve 72°C'ta 1 dakika uzatma ile 72°C'ta 7 dakika son uzatma adımını içerecek şekilde uygulanmıştır. PCR ürünleri (20 µl), %2.0'lik agaroz jel ve 1X TAE tamponu kullanılarak agaroz jel elektroforezi yöntemiyle incelenmiştir. PCR ürünlerinin uzunluğunu belirlemek için agaroz jelde 50 bp standart DNA belirteci kullanılmıştır. PCR ürünleri -20 °C'ta saklanmıştır.

2.2.4 Biyosensör için Prob Tasarımı

Hücre kültürlerinde görülen bulaşların % 95'inden sorumlu ve *Mollicutes* sınıfına ait 6 mikoplazma türüne ve 1 acheloplasma türüne (*M. arginini*, *M. fermentas*, *M. hominis*, *M. hyorhins*, *M. orale*, *A. laidlawii*, *M salivarium*) (Tezin bundan sonraki bölümlerinde tüm bu türler için mikoplazma ifadesi kullanılacaktır.) ait 16S rRNA genlerinin, MYA ve MYB primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılan 460 bp'lik parçası için tüm türler için korunan bir bölgeden prob tasarlanmıştır. Bu amaçla NCBI gen veri bankasından elde edilen ilgili Mikoplazma türlerine ait 16S rDNA dizilerinde, ClustalW2 (çoklu dizi karşılaştırma programı) kullanılarak, korunmuş bölgeler incelenmiştir. Prob oluşturulması için uygun görülen dizi, 5'ucundan tiyol ve amin modifiye olarak Thermo Fisher Scientific firmasına sentezletilmiştir. 5' probe uzantılarında, altın yüzeyine tutundurma için tiyol kimyası ve sol-jele yüzeyine tutundurma için ise amin kimyası kullanılmıştır. Çizelge 2.3'de biyosensör çalışması kapsamında kullanılan prob DNA dizileri ve kimyasal yapıları belirtilmiştir.

Modifikasyon	Kimyasal Formül ve Yapı	Prob DNA dizisi
19bp HS-ssDNA	5'-HS-(CH ₂) ₆ -ssDNA-3' 	5'-AACTATGTGCCAGCAGCCG-3'
19bp NH₂-ssDNA	5'-NH ₂ -ssDNA-3' 	5'-AACTATGTGCCAGCAGCCG-3'
		%100 Eşlenik Hedef DNA (Pozitif Kontrol)
19bp biotin-ssDNA	5'-biotin-ssDNA-3' 	5'-CGGCTGCTGGCACATAGTT-3' Açıklama: Pozitif kontrol olarak kullanılan DNA'nın, biotin modifiye edilmesindeki amaç; floresan işaretli anti-biotin kullanılarak floresan mikroskopunda immobilizasyonun gösterilmesidir.
İsim		Eşlenik olmayan Hedef DNA'lar (Negatif Kontroller)
19bp ssDNA	ssDNA	5'-TCACGACACGAGCTGACGA-3'
21bp ssDNA	ssDNA	5'-TGGGGAGCAAACAGGATTAGA-3'
19bp ssDNA	ssDNA	5'-TTAGCCTTACCGGGTGGTC-3'
17bp ssDNA	ssDNA	5'-TGGTGGATGCCTTGGGT-3'
Modifikasyon		DNA dizisi
19 bp FITC-ssDNA		5'-CGGCTGCTGGCACATAGTT-3'
20 bp FITC-ssDNA		5'-ATCGGCTATGCCGTCGTACA-3' Açıklama: Sol-jel yapılı biyosensör yüzeyinde hibridizasyonun tanımlanması için FITC işaretli ss-DNA problemleri kullanılmıştır.

Çizelge 2.3 Prob ve hedef DNA'ların dizileri ve yapıları

2.2.5 Kaplama Yapılacak Altlıkların Temizlenmesi

Sensör yüzeyini oluşturmak üzere kullanılacak ve bu amaçla kaplama yapılacak altlıkların seçimi ve temizlenmesi çok önemlidir. Altlığın mümkün olduğunca az sayıda yüzey kusuruna sahip olması gerekir. Aynı zamanda ısısal ve mekanik açıdan da dayanıklı olması gerekmektedir.

Altlık olarak yüzey kusuru çok az olan mikroskop camları kullanılmıştır. Mikroskop camları istenilen boyutlarda elmas uçlu kalem kullanılarak kesildikten sonra, öncelikle deterjanla yıkanmış, daha sonra ultrasonik su banyosunda önce HCl sonra su ile 30’ar dakika yıkanmıştır.

2.2.6 Cam yüzeylerin Altın ile Kaplanması

Uygun boyutlarda kesilen ve temizlenen camlar, altının yüzeye tutunabilmesi için öncelikle termal evaporatör cihazıyla, vakumlu ortamda yaklaşık 5nm kalınlıkta olacak şekilde krom ile kaplanmıştır. Bundan sonra krom kaplı yüzeyler, “sputter” cihazıyla, yaklaşık 50 nm kalınlıkta olacak şekilde altın ile kaplanmıştır (Mascini *et al.*, 2004).

2.2.7 HS-ssDNA Immobilizasyon Çalışmaları

İmmobilizasyon öncesi altın kaplanan yüzeyler 400 °C’ta sıcaklığa, 1 saat boyunca tabi tutulmuştur. Bu işlem sonunda yüzeyler ultrasonik su banyosunda, 1:1:5 oranlarında NH₃, H₂O₂, dH₂O karışımı içinde 5 dakika yıkanmış ve sonrasında pek çok kez dH₂O’da durulandıktan sonra etüvde kurumaya bırakılmıştır.

1M KH₂PO₄/K₂HPO₄ immobilizasyon çözeltisi içinde, toplam konsantrasyonu 1µM olacak şekilde HS-ssDNA çözülerek, altın yüzey üzerine mikropipet yardımıyla 50 µl spotlanarak 48 saat 4 °C’ta inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon bitiminde örnekler öncelikle immobilizasyon tampon çözeltisiyle ve sonra dH₂O ile yıkanarak etüvde kurutulmuştur. Hazırlanan örnekler 1 saat 1 mM 6-merkaptto-1-heksanol(MCH) ((HS-(CH₂)₆-OH)) çözeltisi içinde oda sıcaklığında ve

karanlıkta bloklanmıştır (Mascini *et al.*, 2005). Sonrasında 5-6 defa dH₂O ile yıkanan örnekler etüvde kurutulmuştur.

2.2.7.1 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

Hazırlanan örnekler yeteri kadar iletkenlik göstermediğinden, yüzeyler altınla tekrar 3 dakika kaplandıktan sonra mikroskop altında incelenebilmiştir. Çalışmalar sırasında Philips XL30 SFEG taramalı elektron mikroskobu kullanılmış ve immobilizasyonun başarılı olup olmadığı incelenmiştir.

2.2.8 Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi Çalışmaları

Bu çalışmada İstanbul Teknik Üniversitesi, Dr. Orhan Öcalgiray Moleküler Biyoloji-Biyoteknoloji ve Genetik Araştırmaları Merkezi'nde Karakterizasyon Laboratuvar'ındaki Reichert tek kanallı SR7000 SPR Spektroskopisi, Araştırma Görevlisi Urartu Şafak Şeker'in rehberliğinde kullanılmıştır.

2.2.8.1 Altın Yüzeyin Temizlenmesi

Ürettiğimiz altın kaplı yüzeylerde kullanılan camın kırılma indisi, kullanılan SPR cihazının spesifikasyonlarına uymadığından, sensör yüzeyi olarak, Reichert firmasından tedarik edilen altın kaplı yüzeyler (1.3x1.3 mm²) kullanılmıştır. Immobilizasyon öncesi, altın yüzeyler sırasıyla 1:1:5 oranlarında hazırlanan NH₃/H₂O₂/H₂O içinde ~80 °C'ta 5 dakika kaynatılmıştır. Bu işlemi takiben yüzeyler isopropanol, etanol ve dH₂O içinde ultrasonik su banyosunda 2'şer dakika yıkanmış, parmak izi, toz v.b. kirliliklerden arındırılmıştır. Sonra altın kaplı yüzeyler nitrojen gazı akımında kurutulularak, SPR cihazına yerleştirilmiştir.

2.2.8.2 Immobilizasyon

SPR çalışmalarında yıkama, bağlama ve rejenerasyon işlemleri, 25µl/dk akış hızında 25°C'ta gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon öncesi, sensör yüzeyinde immobilizasyon tampon çözeltisi ile kalibrasyon yapılmıştır.

İmmobilizasyon çözeltisi içinde konsantrasyonu 1 μ M olacak şekilde hazırlanan 2 ml HS-ssDNA çözeltisi, 25 μ l/dk akış hızında sisteme verilerek, yaklaşık 80 dakika boyunca immobilizasyon işlemine devam edilmiş ve SPR ölçümü yapılmıştır.

İmmobilizasyon sonrasında yüzey, immobilizasyon çözeltisiyle yıkanmış ve 1mM (1ml) tiyol blok solüsyonuyla (MCH) oda sıcaklığında 1 saat karanlıkta bekletilmiştir. Bloklama sonrası yüzey, sistem içinde en az 1 saat boyunca dH₂O ile yıkanmış, kurutulmuş ve hibridizasyon işlemi için hazır hale getirilmiştir.

2.2.8.3 Sentetik Oligonükleotitlerle Hibridizasyon

Hibridizasyon öncesi, sensör yüzeyinde hibridizasyon tampon çözeltisi ile kalibrasyon yapılmıştır. Hibridizasyon çalışmaları, hibridizasyon çözeltisi içindeki konsantrasyonu 10 μ M (200 μ l) olmak üzere prob'a %100 eşlenik olan 5'ucu biotinle modifiye sentetik tekzincirli oligonükleotitler ve prob'a eşlenik olmayan sentetik tek zincirli oligonükleotitler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. 25 μ l/dk akış hızında yaklaşık 5 dakika boyunca gerçekleştirilen hibridizasyon süreci sonrasında sistem 2 dakika boyunca hibridizasyon tampon çözeltisiyle yıkanmış ve tüm bu işlemler sırasında SPR ölçümü yapılarak, kalibrasyon grafikleri elde çizilmiştir. Hibridizasyon sonrasında, biyosensör 2.5 mM HCl rejenerasyon çözeltisi kullanılarak 1 dakika süreyle rejenere edilmiştir.

2.2.8.4 PCR Ürünleriyle Hibridizasyon

Hibridizasyon öncesi, sensör yüzeyi hibridizasyon tampon çözeltisi ile kalibre edilmiş ve anahat çizgisi elde edilmiştir.

Birinci yöntem olarak Mikoplazma varlığı araştırılan hücre kültürlerine ait PCR ürünleri ve kalıp DNA içermeyen PCR örnekleri hibridizasyon çalışması öncesinde termal denatürasyona uğratılmıştır. Bu amaçla ilgili 200 ng/ μ l konsantrasyondaki PCR örneği (40 μ l) ile hibridizasyon çözeltisi (60 μ l) karıştırılarak

hazırlanmış, 95 °C'ta 5 dakika denatüre edildikten sonra hemen buz içine alınarak istenmeyen renatürasyonun önüne geçilmesi hedeflenmiştir. Hemen ardından örnekler, 25µl/dk akış hızında 25 °C'ta sisteme verilerek SPR ölçümü yapılmıştır. Sistem 25 M HCl rejenerasyon çözeltisi kullanılarak 1 dakika süreyle rejenere edilmiştir. İkinci yöntem olarak hem termal hemde kimyasal denatürasyon uygulaması yapılmıştır. Bunun için 200 ng/µl'lik bir PCR örneği, hibridizasyon çözeltisi ve kimyasal denatürasyondan sorumlu formamid sırasıyla hacimsel olarak 4:5:1 oranlarında alınarak, elde edilen toplam 150µl'lik bu karışım 95 °C'ta 5 dakika inkübe edildikten sonra, 1 dakika buzda bekletilmiştir. (Visconti *et al.*, 2006). Hemen ardından örnekler, 25µl/dk akış hızında 25 °C'ta sisteme verilerek SPR ölçümü yapılmıştır. Sistem 25 mM HCl rejenerasyon çözeltisi kullanılarak 1 dakika süreyle rejenere edilmiştir. Her bir örnek için en az 3 ayrı ölçüm yapılmış, elde edilen sonuçların ortalaması ve standart sapmaları ayrı ayrı hesaplanmıştır.

2.2.9 Genomik DNA'nın Enzimatik Kesimi ve SPR'da İncelenmesi

Spektroskopik olarak miktarı belirlenmiş olan genomik DNA'nın halkasal yapısı itibari ile hızlı renatürasyonunu önlemek amacı ile DNA 4 farklı enzim (*PstI*, *BseGI*, *Eco130I*, *XapI*) ile aynı anda kesime uğratılmıştır. Reaksiyon 50 µl hacim içinde, 37 °C'ta, 2 saat süreyle gerçekleştirilmiştir(çizelge2.4).

	200ng/µl Ishikawa hücreleri genomik DNAsı	140 ng/µl Primer sıçan kemik hücreleri (BMK) genomik DNAsı
Genomik DNA	10 µl	14 µl
<i>PstI</i>	0.5 µl	0.5 µl
<i>PstI</i> Tamponu	5 µl	5 µl
<i>BseGI</i>	0.5 µl	0.5 µl
<i>BseGI</i> Tamponu	5 µl	5 µl
<i>Eco130I</i>	0.5 µl	0.5 µl
<i>Eco130I</i> Tamponu	5 µl	5 µl
<i>XapI</i>	0.5 µl	0.5 µl
<i>XapI</i> Tamponu	5 µl	5 µl
Su	18 µl	14 µl
Toplam	50 µl	50 µl

Çizelge 2.4 Genomik DNA'nın enzimatik kesim reaksiyonu koşulları

Bu işlem sonrasında, elde edilen genomik DNA fragmanları, hibridizasyon çözeltisi ve formamid varlığında (hacimsel olarak 2.5:5:1 oranlarında → genomik DNA fragmanı çözeltisi: hibridizasyon çözeltisi: formamid), termal ve kimyasal denatürasyona uğratıldıktan sonra, SPR sisteminde altın yüzeyine immobilize proba, hibridizasyon bakımından incelenmiştir.

2.2.10 Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü Tasarımı

Bu çalışmada yüzey olarak mikroskop camları kullanılmıştır. Mikroskop camları istenilen boyutlarda elmas uçlu kalem kullanılarak kesildikten sonra öncelikle deterjanla yıkanmış, sonrasında 1:1:1 HCl, H₂O₂ ve dH₂O'da yıkanıp etüvde kurutulmuştur. Aktive edilen cam yüzeyler 24 °C'ta pH'ı 3.99, viskozitesi 1.51 olan 0.37 M TEOS (tetraetilortosilikat) çözeltisiyle daldırarak kaplama yöntemiyle (geri çıkış hızı 10mm/sn) 10 kat kaplanmıştır. Her kat kaplamadan sonra yüzey, fırında 400 °C'ta 20 dakika kurutulmuştur. Numune soğuduktan sonra bir sonraki kaplamaya geçilmiştir. 10 kat kaplamadan sonra TEOS kaplı yüzeyin, Metricon Prizma Coupler cihazında kırılma indisi ölçümleri yapılmıştır.

TEOS kaplı yüzeyler %2'lik APTES (3-aminopropyltriethoxysilane) çözeltisi içinde 20 dakika bekletilmiştir. Silanizasyon sonrasında yüzeyler dH₂O ile durulandıktan sonra 100 °C sıcaklıkta fırında 10 dakika ısıtılma bırakılmıştır. Yüzeyler, 60 °C'ta DMSO içinde hazırlanan %0.2'lik PDC çözeltisiyle, oda sıcaklığında yaklaşık iki saat bekletilmiştir, sonra sırasıyla metanol ve aseton ile yıkanıp, nitrojen gazı ile kurutulmuşlardır (Hogan *et al.*, 1994, Smith *et al.*, 1994, Fritzsche *et al.*, 2005).

Kuru yüzey HEPES tampon çözeltisinde oda sıcaklığında 10 dk tutulup, tekrar HEPES çözeltisinde durulanıp, nitrojen gazıyla kurutulmuştur.

5' ucu aminle modifiye prob oligonükleotitler HEPES tampon çözeltisinde konsantrasyonu 100 µM olacak şekilde hazırlandıktan sonra, HEPES'te bekletilmiş yüzeyde 37 °C'ta 1 saat bekletilip, ardından tekrar HEPES çözeltisinde durularak ve nitrojen gazıyla kurutulduktan sonra kırılma indisi ölçümü yapılmıştır.

HEPES tampon çözeltisi içinde konsantrasyonu 80 μ M olacak şekilde prob'a %100 eşlenik olan 5'ucu biotinle modifiye sentetik tekzincirli oligonükleotit çözeltisi ve prob'a eşlenik olmayan 80 μ M sentetik tek zincirli oligonükleotit çözeltisi hazırlanmıştır. Kaplanan yüzeyler 37 °C'taki oligonükleotit çözeltilerinin içinde 2 saat bekletilip, ardından tekrar HEPES çözeltisinde durulandıktan ve nitrojen gazıyla kurutulduktan sonra kırılma indisi ölçümleri yapılmıştır.

2.2.10.1 Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörüne ait Yüzeylerin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi

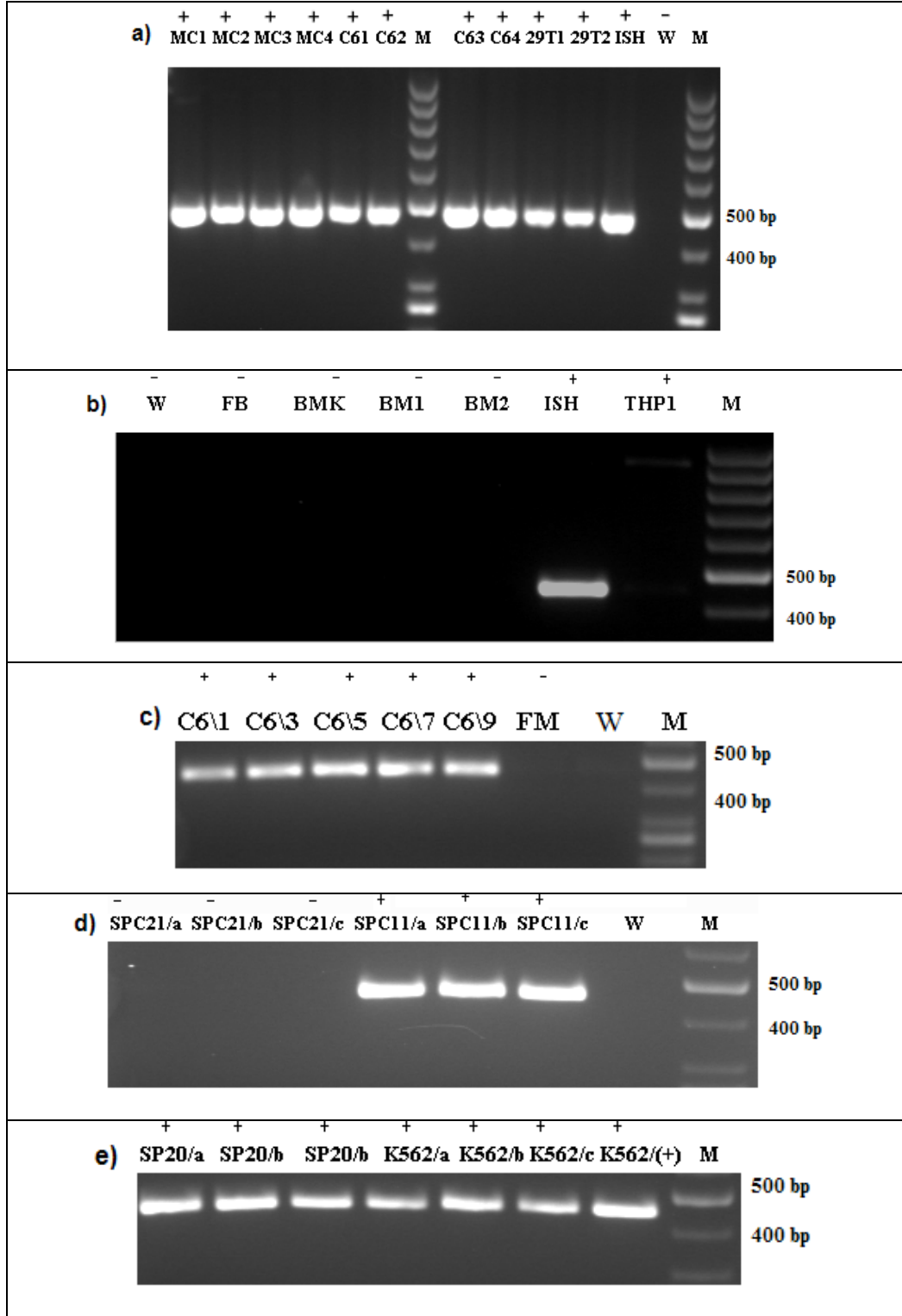
Dalga kılavuzuna dayalı DNA biyosensörü için, Bölüm 2.9.9'da anlatıldığı üzere sırasıyla TEOS-APTES-PDC ile kaplı yüzeyler; amin modifiye ss-DNA yapısında olan prob'un immobilizasyonunun ardından, FITC işaretli prob'a eşlenik olan ve olmayan HEPES tampon çözeltisinde hazırlanmış 100 μ M konsantrasyonda tek zincirli oligonükleotitler kullanılarak, yüzey 37°C'ta 2 saat süre ile hibridizasyona bırakıldı. Sonrasında yüzeyler HEPES tampon çözeltisiyle iyice yıkanıp nitrojen akımında kurutuldu ve floresan mikroskobunda incelemeye alındı. Bu amaçla İTÜ MOBGAM mikroskop laboratuvarındaki, Olympus BX60 model floresan mikroskobu, FITC uçlu oligolar için mavi filtre setiyle 488 nm eksitasyonda, 0,88 Gamma, 0,91 parlaklık koşullarında ve 200X büyütmede incelendi.

3. BULGULAR

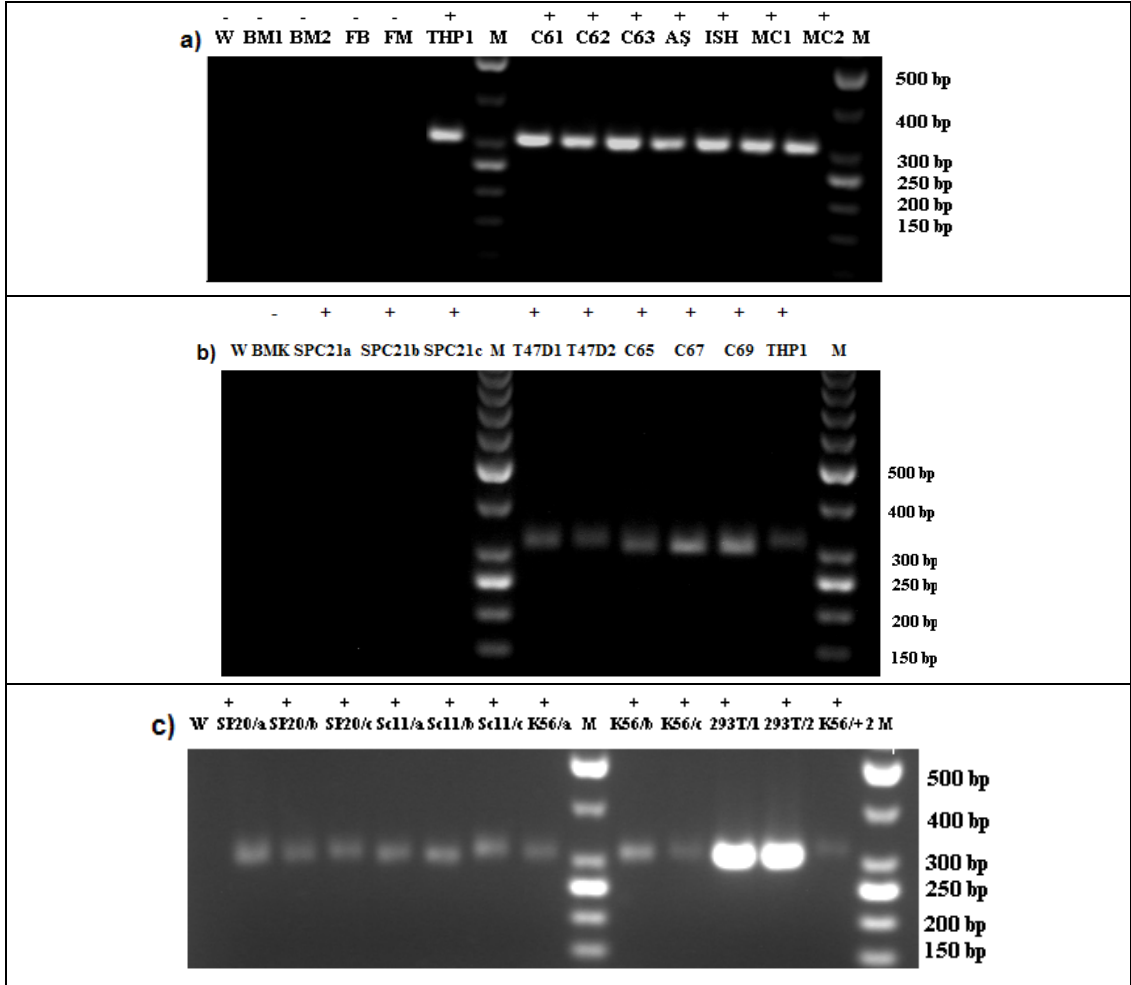
3.1 Mikoplazma Kontaminasyonunu Belirlemek Amacıyla 16S rRNA Genlerinin PCR ile Çoğaltımı

Mikoplazma 16S rDNA'sının korunmuş özgül bölgelerine yönelik primerlerin MgCl₂ ve T_m optimizasyonları yöntem kısmında verilen termal döngü programı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Agaroz jel analizleri sonucunda, reaksiyonların MYA-MYB primer çifti için 3 mM MgCl₂ derişiminde, 57°C'ta ve MYPR-MYPF primer çifti için 2 mM MgCl₂ derişiminde 57°C'ta gerçekleştirilmesine karar verilmiştir. Jel analizleri sonucunda, toplam 14 farklı hücre soyuna ait 36 farklı örneğin 28 tanesinde beklenen PCR ürünleri görülmüştür. Bu sonuç incelenen örneklerde %77 düzeyinde mikoplazma kontaminasyonuna işaret etmektedir. Buna karşın, 6 adet hücre kültürü örneğinde ve çalışılan 2 farklı şirkete ait (Gibco ve Sigma) serum örneklerinde herhangi bir PCR ürünü saptanmamıştır. Bu da bize mikoplazma kontaminasyonlarının serum kaynaklı olmadığını göstermiştir.

MYA-MYB primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonununa ait örnekler %2'lik agaroz jel elektroforezinde incelendiğinde, mikoplazma-özgün 460 bp uzunluğundaki bandın varlığı görülmüştür. Benzer şekilde, MYPR-MYPF primer çifti kullanılarak gerçekleştirilen PCR reaksiyonuna ait örnekler incelendiğinde ~310 bp büyüklüğünde mikoplazmaya özgün bandın varlığı gösterilmiştir.



Şekil 3.1 Çeşitli hücre kültürü örneklerinde mikoplazma kontaminasyonunu gösteren MYA-MYB primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ürünlerinin (460 bp) agaroz jel görüntüleri. (+): Mikoplazma Pozitif, (-): Mikoplazma Negatif. M: 50 bp belirteç (Fermentas). W: dH₂O kontrol, FM: Gibco Fetal bovine serum, FB: Sigma Fetal bovine serum, MC1,2,3,4: MCF-7 / İnsan meme adenokarsinoma hücreleri, C61,2,3,4,5,7,9: Fare glioblastoma hücreleri, 29T1,2: 293T / insan böbrek adenokarsinoma hücreleri, ISH: Ishikawa / insan endometriyum kanser hücreleri, BMK,1,2: sıçan primer kemik hücreleri, THP-1: insan monosit hücreleri, SPC21a,b,c: SPC212 / insan mezotelyoma hücreleri, SPC11a,b,c: SPC111 / insan mezotelyoma hücreleri, SP20a,b,c: SP2-0 / fare miyolema hücreleri, K562a,b,c (+): insan lenfosit hücreleri (KML).

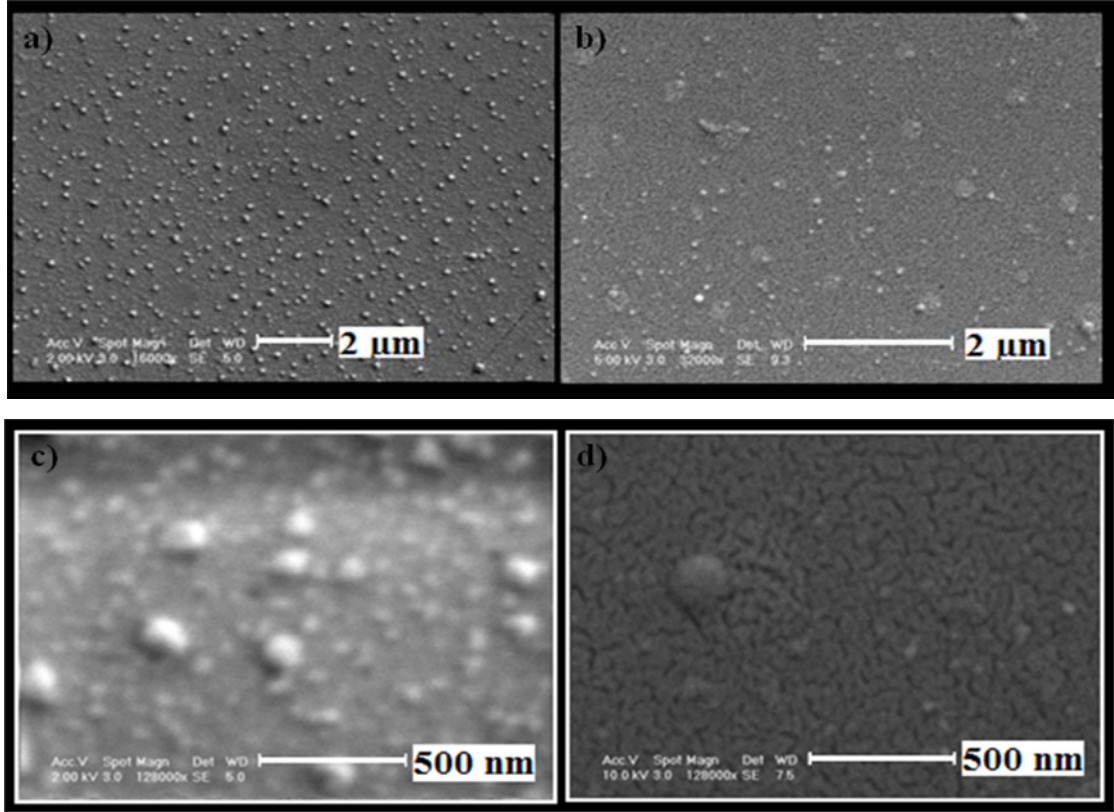


Şekil 3.2 Çeşitli hücre kültürü örneklerinde mikoplazma kontaminasyonunu gösteren MYPR-MYPF primer çifti ile gerçekleştirilen PCR reaksiyonu ürünlerinin (310 bp) agaroz jel görüntüleri. (+): Mikoplazma Pozitif, (-): Mikoplazma Negatif. M: 50 bp belirteç (Fermentas). W: dH₂O kontrol, FM: Gibco Foetal bovine serum, FB: Sigma Foetal bovine serum, MC1,2,3,4: MCF-7 / İnsan meme adenokarsinoma hücreleri, C61,2,3,4,5,7,9: Fare glioblastoma hücreleri, 293T1,2: 293T / insan böbrek adenokarsinoma hücreleri, ISH: Ishikawa / insan endometriyum kanser hücreleri, BMK,1,2: sıçan primer kemik hücreleri, THP-1: insan monosit hücreleri, SPC21a,b,c: SPC212 / insan mezotelyama hücreleri, SPC11a,b,c: SPC111 / insan mezotelyama hücreleri, SP20a,b,c: SP2-0 / fare miyolema hücreleri, K562a,b,c (+): insan lenfosit hücreleri (KML).

3.2 SEM Sonuçları

Altın yüzeyinde tiyol modifiye ss-DNA immobilizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini belirlemek amacıyla, immobilizasyon çalışması yapılan altın yüzeyler ve sadece immobilizasyon çözeltisiyle muamele edilen altın yüzeyler genel morfolojinin belirlenmesi için yüksek büyütmelede taramalı elektron mikroskopunda incelenmiştir. İncelemeler sonucunda, altın yüzeyler ve immobilizasyon çalışması yapılmış yüzeyler arasında önemli bir fark görülmemiştir. Bunun, yüzeye immobilize edilmek istenen 20 baz uzunluğundaki tek zincirli tiyol DNA'ların ortamala boyutuna ($68 \text{ Å} = 6.8 \text{ nm}$ (2 baz arası (3.4 Å)) yaklaşık olduğu düşünülmüştür. Bunun yanında DNA'nın altın yüzeyle nitrojen üzerinden etkileşime girerek yatay pozisyona gelebilme olasılığı bulunduğundan, bu tür bölgelerde yüzeyde oluşturacağı yüksekliğin birkaç nanometreye sınırlı olması nedeniyle SEM'in kısa oligonükleotit immobilizasyonu çalışmalarının görüntülenmesine uygun olmadığı düşünülmüştür. İncelemeler sonucunda yüzeyde görülen ve çeşitli büyüklükteki tuz çökeltileri olduğu düşünülen beyaz noktalar görülmektedir. Fakat her ne kadar yüzeyde ss-DNA'nın varlığı doğrudan görüntülenemese de, ss-DNA içeren ve içermeyen görüntülerde, altın yüzeyinde oluşan tuz çökeltilerinin yapısı birbirinden farklı görülmektedir. Bu farklılık altın yüzeyine immobilize olan DNA'dan kaynaklanmaktadır. Yapılan SPR çalışmaları sonucunda da tiyol modifiye DNA'nın altın yüzeyine immobilize olduğu açıkça gösterilmiştir. Bu durum SEM analizlerinden elde ettiğimiz sonuçları desteklemektedir.

Ayrıca, SEM ile yapılan çalışmalarda yüzeylerin incelemeden önce altınla tekrar kaplanmasına rağmen çok kısa sürede yandığı ve yüksek büyütmelede incelemenin çok zor olduğu görülmüştür.

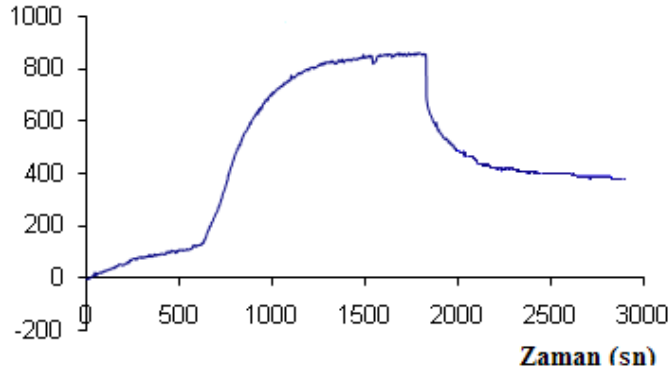


Şekil 3.3 Tiyol modifiye ss-DNA immobilizasyonu çalışması yapılan altın yüzeyin **a)** yüksek büyütmedeki (2 μ m) **b)** daha yüksek büyütmedeki (500nm) görüntüsü, **c)** immobilizasyon çözeltisiyle muamele edilmiş altın yüzeyin yüksek büyütmedeki (2 μ m) **d)** daha yüksek büyütmedeki görüntüsü (500nm).

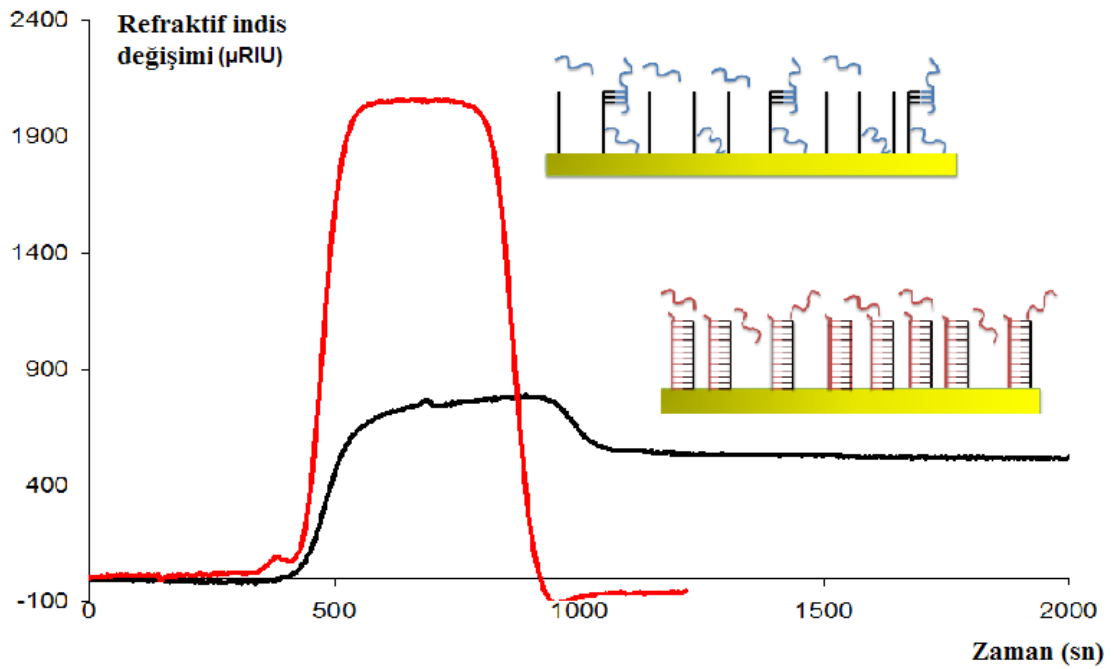
3.3 DNA Tabanlı SPR Biyosensörü

SPR çalışmalarında öncelikle 1 ml immobilizasyon tampon çözeltisi sistemden 25 μ l/dk akış hızında geçirilerek cihaz kalibre edilmiştir. Şekil 3.4'te görüldüğü gibi HS-ssDNA çözeltisinin sisteme verilmesinden yaklaşık 700 saniye sonra, HS-ssDNA'lar yüzeye bağlanmaya başlamış, ~1800 saniyeden sonra DNA çözeltisi sadece DNA içermeyen hibridizasyon çözeltisi ile değiştirildiğinde sistem dengeye ulaşmıştır, böylelikle immobilizasyonun başarıyla gerçekleştiği anlaşılmıştır.

**Refraktif
indis değişimi (μ RIU)**



şekil 3.4 SH-ssDNA'nın altın yüzeyine immobilizasyon grafiği

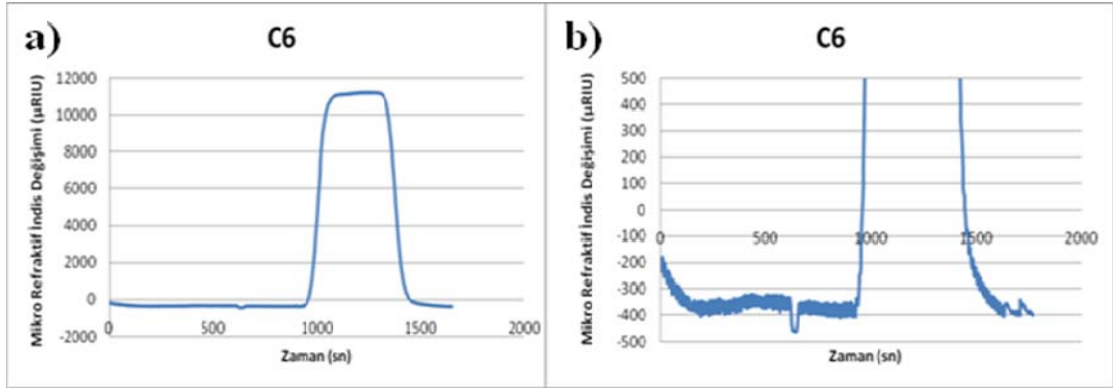


şekil 3.5 Sentetik oligonükleotidlere ait hibridizasyon grafiği (Kırmızı çizgi: proba eşlenik olmayan oligonükleotide ait grafik, Siyah çizgi: proba %100 eşlenik oligonükleotide ait grafik). Proba eşlenik olmayan oligonükleotide ait grafikte, ~700. sn'de görülen refraktif indisindeki küçük değişimler anlamlı değildir, bu nedenle dikkate alınmazlar.

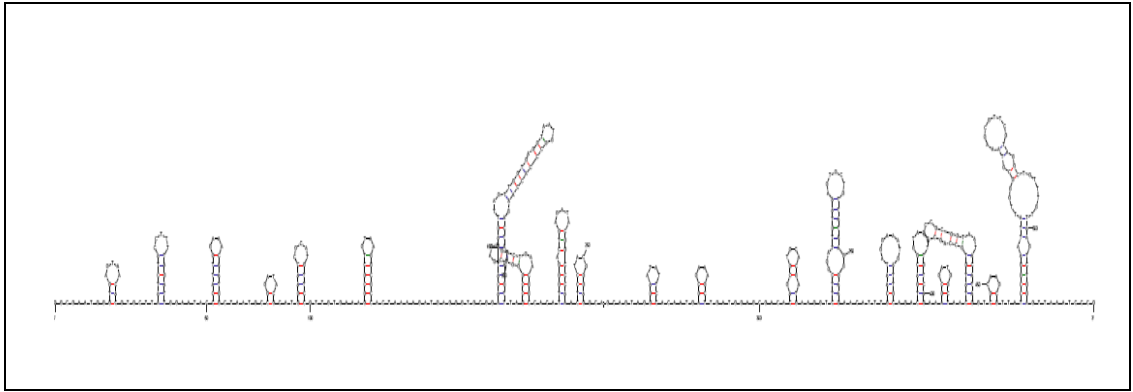
Prob'a eşlenik olmayan sentetik oligonükleotit ve %100 eşlenik olan biotinle modifiye 10 μ M ss-DNA ile yapılan SPR ölçümleri sonucunda elde edilen grafik şekil 3.5'de görölmektedir. Sistem öncelikle tampon çözeltisiyle kalibre edilmiştir. Hibridizasyon çözeltisi içinde hazırlanan eşlenik olmayan oligonükleotitler sisteme verildiğinde, büyük bir refraktif indis değişimi görölmüştür. Bir müddet sonra (~900sn) oligonükleotit çözeltisi hibridizasyon çözeltisiyle değiştirildiğinde refraktif indis sistemin ilk haline döndüğünden beklenildiği üzere prob'la hibridizasyon olmadığı anlaşılmıştır. Grafikte 500 sn'den ~900 sn'ye kadar refraktif indis

değişiminin görülmesi, yüzeyde prob ile oligonükleotitler arasında bir takım etkileşimler olduğunu düşündürmektedir.

SPR testinden önce mikoplazma pozitif ve negatif PCR örnekleri, tekzincirli DNA elde etmek amacıyla 95 °C'ta 5 dakika tutularak denatürasyona uğratılmış ve 1 dakika buzda bekletilerek renatürasyon önlenmiştir. C6 hücrelerine ait, mikoplazma pozitif PCR ürünlerine yapılan termal uygulamanın ardından örnek, SPR'ın mikrofluidik sistemine verilerek uygulama gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi PCR ürünlerinin sisteme verilmesinden önce ve sonrasında refraktif indis değişimi oluşmamıştır. Hem kimyasal hem de termal denatürasyona uğratılan PCR örneklerinde ise, hibridizasyon öncesi elde edilen anahat çizgisi ve hibridizasyon sonrası elde edilen anahat çizgisi arasında oluşan mikrorefraktif indis değişimleri, herbir hücreye ait 3 farklı PCR örneği için ayrı ayrı hesaplanmıştır. Mikoplazma pozitif olan 293T hücrelerine ve Mikoplazma negatif olan sıçan primer kemik hücrelerine ait 3 farklı PCR örneğinin SPR grafikleri Şekil 3.9 ve 3.10'da görülmektedir. Elde edilen mikro refraktif indis değişimleri Çizelge 3.1'de görülmektedir. Şekil 3.7'de tek zincirli 420 bazlık PCR ürünün oluşturabileceği muhtemel ikincil yapılardan birisi görülmektedir. Termal denatürasyonla birlikte formamid kullanımıyla bu tür ikincil yapıların ortadan kaldırılması sağlanmış, kendi içinde PCR ürünlerinin kendi içinde hibridizasyon reaksiyonları engellenmiştir.

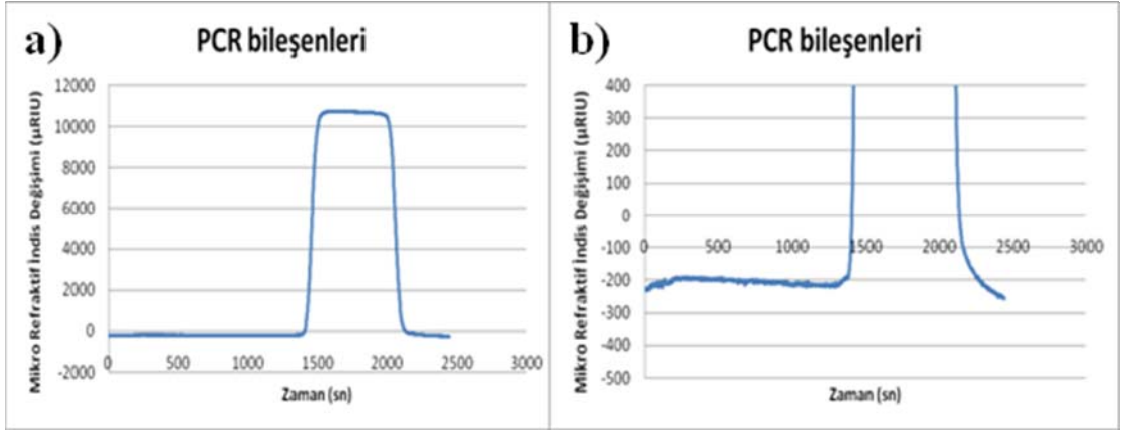


Şekil 3.6 a) C6: Mikoplazma pozitif C6 hücre soyuna ait PCR’la çoğaltılmış örneğin termal denatürasyon sonrası sisteme verilmesiyle elde edilen μ RIU değişiminin zamana göre grafiği, **b)** grafiğin (-500-1000 μ RIU) aralığında ve (0-2500 sn) aralığında yakınlştırılmış gösterimi

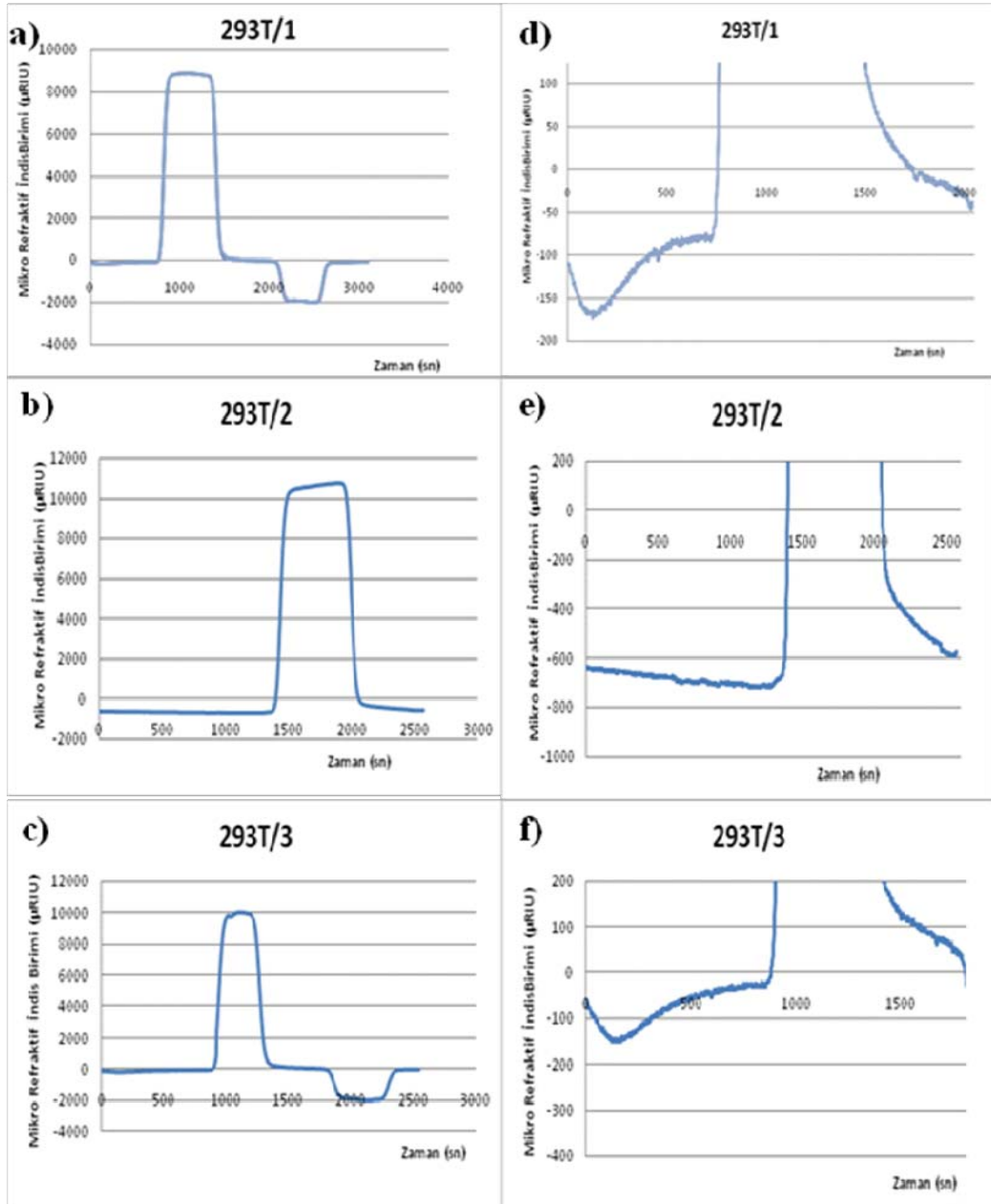


Şekil 3.7 $[Na^+] = 0.5$ M, $[Mg^{++}] = 0$ M, $25^\circ C$ ’de, 420 bazlık tek zincirli PCR ürünün oluşturacağı olası sekonder yapılardan biri (<http://frontend.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/quikfold.php>).

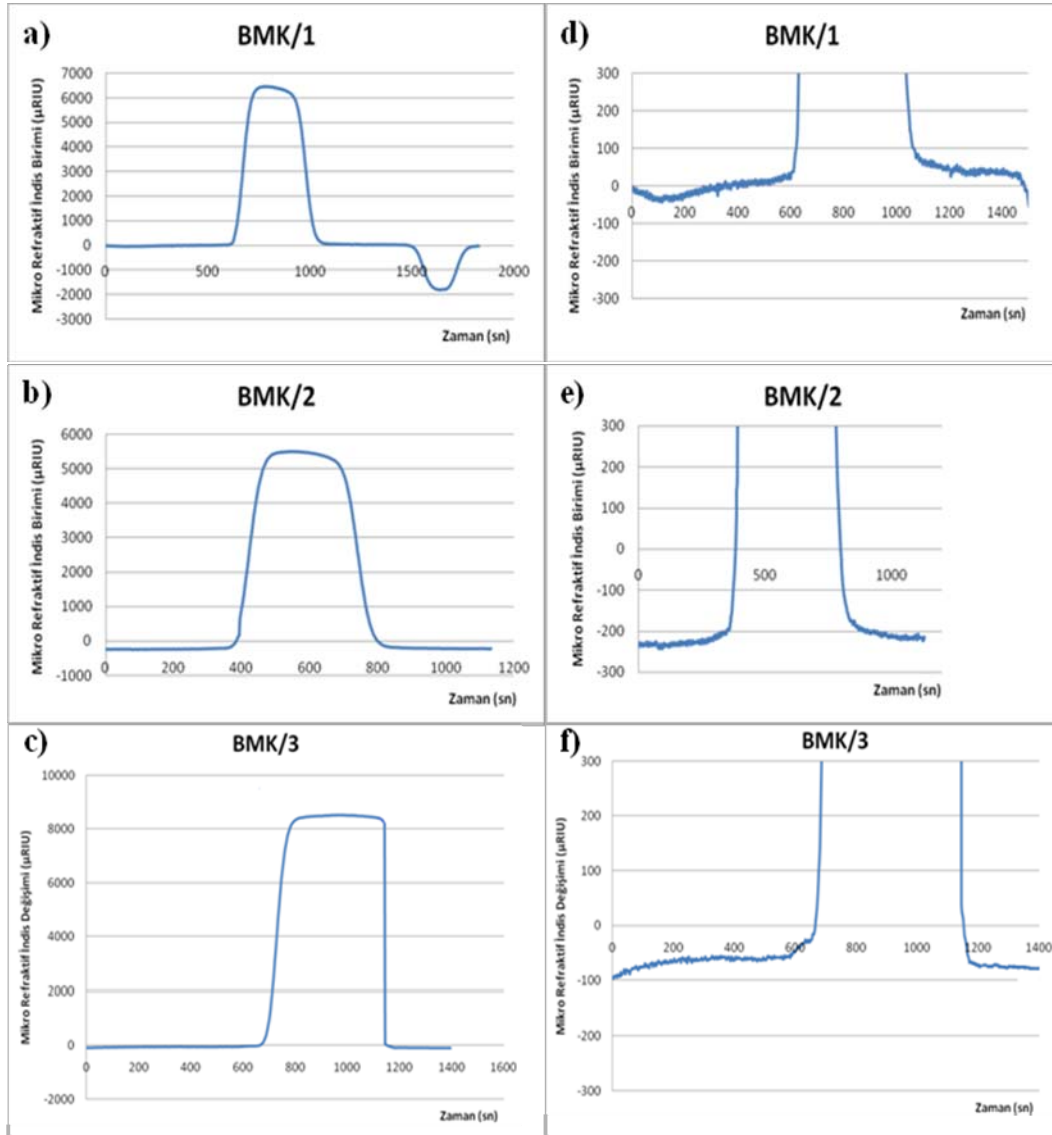
Sadece PCR bileşenlerini içeren, yani kalıp DNA içermeyen PCR çözeltisinin SPR analizi yapıldığında, çözelti yüzeyden geçerken Şekil 3.8’de görüldüğü üzere refraktif indis sinyalinde artış görülmüş, fakat çözelti hibridizasyon tamponuyla yer değiştirdiğinde sistem hızla eski haline dönmüştür. Bu da sistem dengeye eriştiğinde yüzeyde bir diğer molekülün (eşlenik DNA) olmadığını açıkça göstermektedir.



3.8 a) Kalıp DNA içermeyen PCR karışımının sisteme verilmesiyle elde edilen μRIU değişiminin zamana göre grafiği, **b)** grafiğin (-500-400 μRIU) aralığında ve (0-3000 sn) aralığında yakınlştırılmış gösterimi.



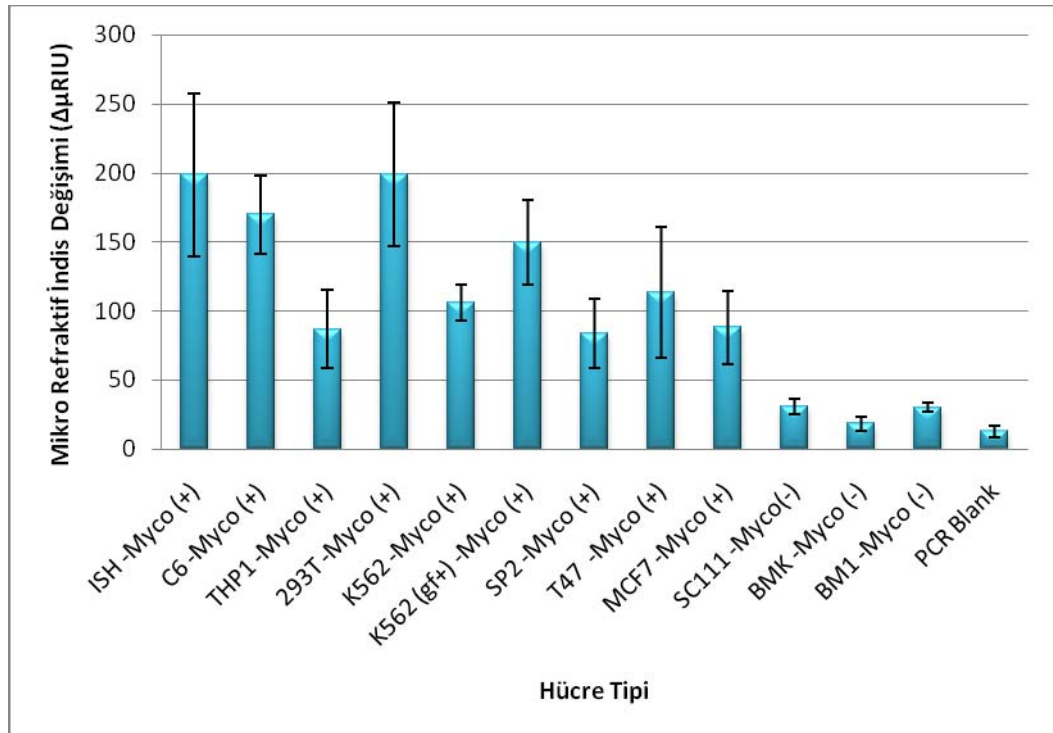
Şekil 3.9 Mikoplazma pozitif 293T hücre soyuna ait PCR’la çoğaltılmış **a)** birinci örneğin **b)** ikinci örneğin **c)** üçüncü örneğin sisteme verilmesiyle elde edilen μ RIU değişiminin zamana göre grafiği, **d)** 293T/1’e ait grafiğin (-200-100 μ RIU) aralığında ve (0-2000 sn) aralığında **e)** 293T/2’ye ait grafiğin (-1000-200 μ RIU) aralığında ve (0-2500 sn) aralığında **f)** 293T/3’e ait grafiğin (-400-200 μ RIU) aralığında ve (0-1800 sn) aralığında yakınlaştırmış gösterimi. yakınlaştırmış gösterimi. yakınlaştırmış gösterimi.



Şekil 3.10 Mikoplazma negatif sıçan primer kemik iliği hücrelerine ait PCR’la çoğaltılmış **a)** birinci örneğin **b)** ikinci örneğin **c)** üçüncü örneğin sisteme verilmesiyle elde edilen μ RIU değişiminin zamana göre grafiği, **d)** BMK/1’e ait grafiğin (-300-300 μ RIU) aralığında ve (0-1400 sn) aralığında **e)** BMK/2’ye ait grafiğin (-300-300 μ RIU) aralığında ve (0-1200 sn) aralığında **f)** BMK/3’e ait grafiğin (-300-300 μ RIU) aralığında ve (0-1400 sn) aralığında yakınlştırılmış gösterimi.

Hücre Türü	SPR sinyali Hibridizasyon sonrasında meydana gelen mikrorefraktif indis değişimi ($\Delta\mu\text{RIU}$)	Standart Sapma	SPR sinyali Hibridizasyon sonrasında meydana gelen rezonans birimi değişimi (ΔRU)	Elektroforez Analizi
293T	196.657	52.11	144.149	+
C6	169.66	28.65	124.36	+
ISHIKAWA	198.667	58.9	145.622	+
K562 (gf+)	149.667	30.44	109.705	+
T47	113.333	47.31	83.073	+
MCF7	88	26.54	64.504	+
K562	106	13.36	77.698	+
SP2	83.666	25.1	61.327	+
THP1	87	28.08	63.771	+
SC111	31	5.35	22.723	-
BMK	18.33	4.78	13.435	-
BM1	30	3.26	21.99	-
PCR bileşenleri	12.78	3.69	9.367	/

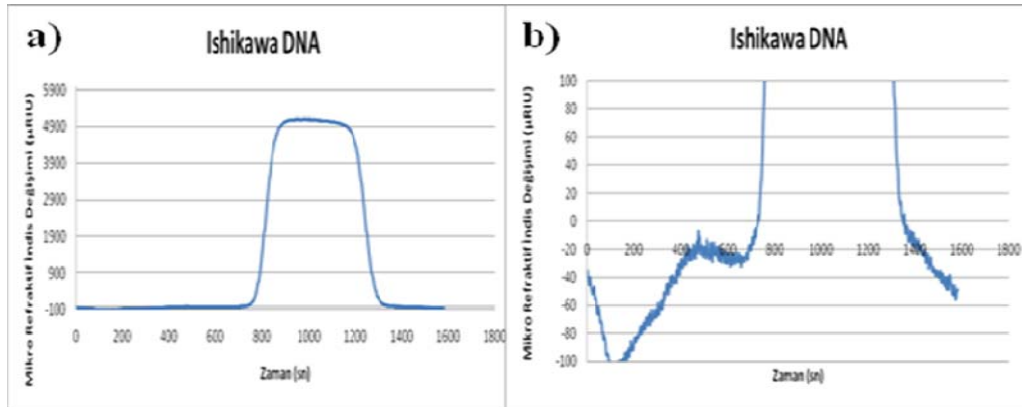
Çizelge 3.1 Hücre kültürü örneklerine ait PCR ürünlerinin (n=3) mikoplazma varlığı bakımından, jel-elektroforezi ve SPR sinyali sonuçlarının karşılaştırılması.



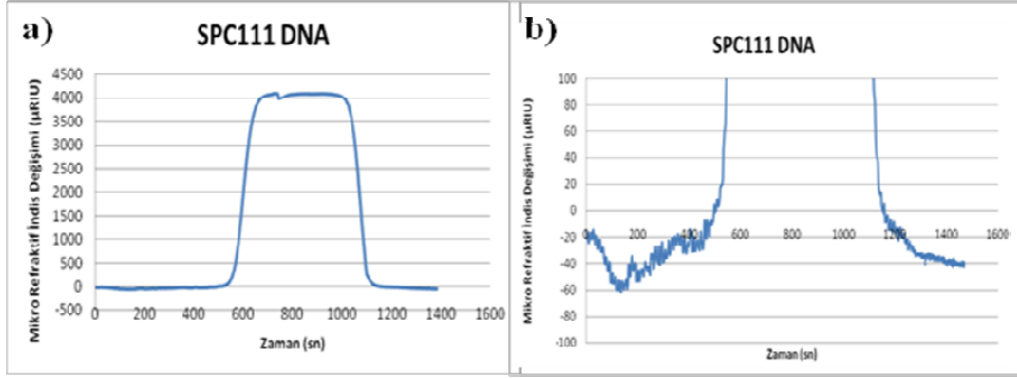
Çizelge 3.2 PCR çalışmasına alınan Mikoplazma negatif ve pozitif çeşitli hücre kültürü örneklerinin (n=3) incelenmesi sonucunda elde edilen SPR sinyali sonuçlarının mikrorefraktif indis değişimi ortalamaları bakımından karşılaştırılması.

Mikoplazma pozitif hücre kültürü PCR örnekleri için elde edilen $\Delta\mu\text{RIU}$ değerleri arasındaki farklılıklar, başlangıç mikoplazma miktarındaki farklılıklarla açıklanabilir (Çizelge 3.2). Mikoplazma negatif hücre kültürü PCR örnekleri için elde edilen $\Delta\mu\text{RIU}$ değerlerinin, pozitif örnekler için elde edilen $\Delta\mu\text{RIU}$ değerleri yanında oldukça düşük kalması elde edilen sonucun güvenilir olduğunu göstermektedir.

Restriksiyon enzimleriyle kesilen genomik DNA fragmanlarının SPR analizi sonucunda, Şekil 3.11 ve 3.12’de görüldüğü gibi hem mikoplazma pozitif hemde negatif örnekler için anlamlı bir refraktif indis değişimi görülmemiş ve bu nedenle sadece genomik DNA’nın kullanıldığı herhangi bir yüzeyde hibridizasyonun oluşmadığı anlaşılmıştır. Genomik DNA’nın SPR sinyali üretememesi iki şekilde açıklanabilir: genomik DNA, PCR ürününe oranla çok düşük miktarda kopya sayısı içerdiğinden, proba etkileşim olasılığının az olması ve buna bağlı olarak saptanabilir bir rezonans sinyali oluşturamamasıdır. Bunun yanında genomik DNA, PCR ürününe göre çok daha uzun bir molekül olduğundan renatürasyon sırasında kendi eşini bulma kinetiği yüzeye bağlı probu bulma hızından çok daha yüksek olacaktır. Bu nedenle daha sonraki çalışmalarda, genomik DNA’nın sonikasyonla optimal büyüklükteki parçalara ayrıldıktan sonra sisteme uygulanması düşünülmektedir.



3.11 a) Mikoplazma pozitif Ishikawa hücre soyuna ait genomik DNA’nın enzimle kesilmesiyle elde edilen örneğin (170 μl) SPR’da incelenmesiyle elde edilen μRIU değişiminin zamana göre grafiği. **b)** Ishikawa’ya ait grafiğin (-100-100 μRIU) aralığında ve (0-1800 sn) aralığında yakınlaştırılmış gösterimi.

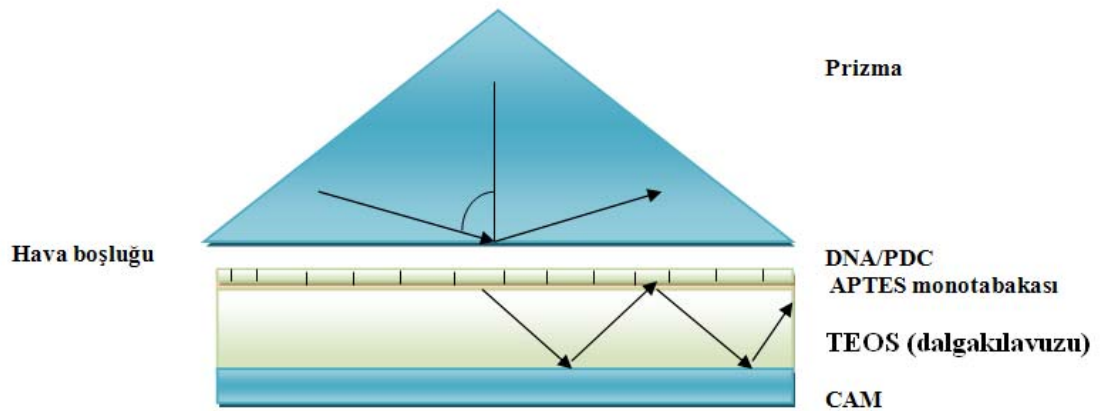


3.12 a) SC111: Mikoplazma negatif SC111 hücre soyuna ait genomik DNA'nın enzimle kesilmesiyle elde edilen örneğin (170 μ l) SPR'da incelenmesiyle elde edilen μ RIU değişiminin zamana göre grafiği, **b)** SC111'e ait yandaki grafiğin (-100-100 μ RIU) aralığında ve (0-1600 sn) aralığında yakınlştırılmış gösterimi.

3.4 Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörü Tasarımı

Sol- jel yapıda dalga kılavuzuna dayalı biyosensör tasarımında cam üzerinde TEOS tabakası oluşturulmuştur. Cama göre daha yüksek refraktif indisli TEOS tabakasıyla dalga kılavuzu meydana getirilmiştir. Prizma ile numune arasında ise uygun genişlikte hava boşluğu bırakılmıştır. Bu sayede prizma tabanından gelen ışınla, TEOS tabakasının arayüzünde toplam iç yansıma meydana gelmesi sağlanmıştır.

Biyomolekülün bulunduğu TEOS tabakasında optik enerjinin sınırlanmasıyla, kırılma indisi ölçümlerinin bu tabakadaki biyomoleküllere bağlı değişimlere son derece hassas hale gelmesi beklenmektedir (Weiss *et al.*, 2006).



Şekil 3.13 Sol-jel yapıda dalga kılavuzu optik biyosensör tasarımı

TEOS kaplı yüzeyin kırılma indisi ölçümleri ve APTES ve PDC ile işlem gördükten sonra prob DNA immobilizasyonu yapılan TEOS kaplı yüzeyin kırılma indisi ölçümlerinin ortalamaları ve standart sapmaları Çizelge 3.3’de verilmiştir. Bu ölçümlerden elde edilen verilere göre, DNA immobilizasyonu sonrası yüzeyin efektif refraktif indisi artmıştır. TEOS yüzeyindeki porlara infiltre olarak kovalent bağ ile bağlanması beklenen prob DNA molekülerinin dalga kılavuzuna giren ışığın açısını değiştirerek efektif indisi arttırması beklendiğinden elde ettiğimiz sonuçlardan, DNA’nın bağlandığı sonucunu elde edebiliriz.

Prob DNA’nın immobilizasyonu sonrası proba %100 eşlenik olan ve eşlenik olmayan sentetik hedef DNA’larla hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Fakat bu işlem sonrasında prizma çiftleyici cihazında yüzeyle temas kurulamadığından kırılma indisi ölçümü gerçekleştirilememiştir.

Kırılma İndisi Ölçüm Değerleri	TEOS	TEOS + APTES + PDC + HEPES + PROB DNA
Ortalama	1.684837	1.687275
Standart Sapma	0.000355	0.000319

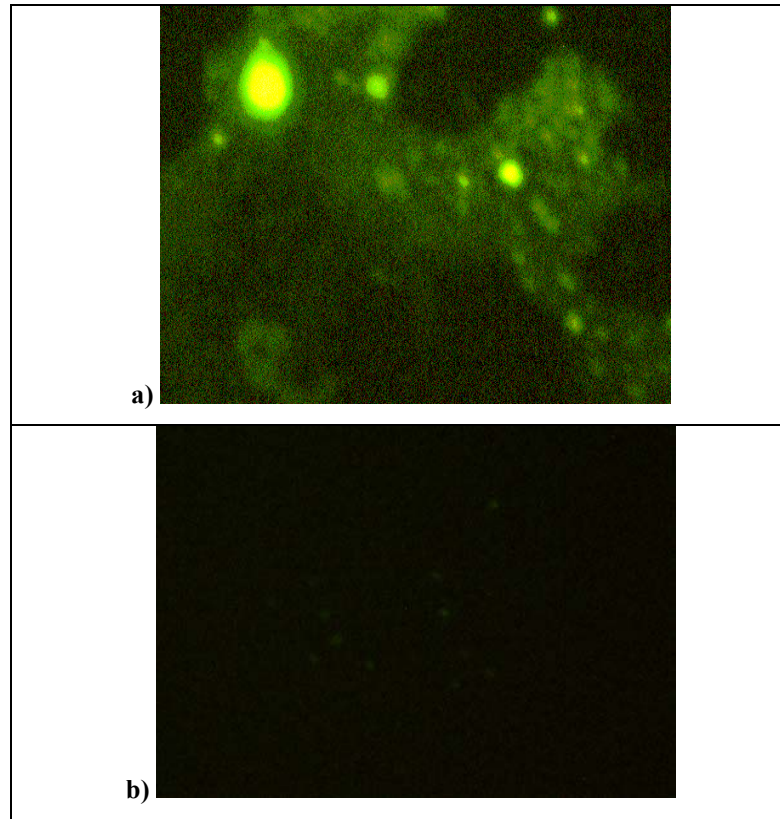
Çizelge 3.3 TEOS kaplı yüzeyin kırılma indisi ölçüm değerleri. APTES ve PDC ve HEPES tampon çözeltisiyle işlem gördükten sonra prob DNA immobilizasyonu yapılan TEOS kaplı yüzeyin 3 farklı (herbir nokta için 4 ölçüm yapılmıştır) noktadan kırılma indisi ölçüm ortalamaları ve standart sapmaları.

3.6 Dalga Kılavuzuna Dayalı DNA Biyosensörüne ait Yüzeylerin Floresan Mikroskobunda İncelenmesi

Dalga kılavuzu DNA biyosensörü için oluşturulan sensör yüzeyinde prob DNA immobilizasyonu sonrası, FITC işaretli prob’a eşlenik ve eşlenik olmayan oligolarla hibridizasyon reaksiyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için

floresan mikroskobunda inceleme yapılmıştır. Floresan mikroskobunda yapılacak bu incelemeyle aynı zamanda prizma çifleyicisiyle elde ettiğimiz verilere ek olarak, DNA immobilizasyonun başarılı olduğuna destekleyici kanıt elde edilmesi planlanmıştır.

Buna göre Şekil 3.14’de görüldüğü gibi proba eşlenik oligoyla hibridizasyon yapılan bölgede yer yer çok floresan ışımaya görülürken, proba eşlenik olmayan oligoyla hibridizasyon yapılan bölgede hemen hemen hiçbir ışımaya görülmemesi immobilizasyon ve bunu takiben yapılan hibridizasyon işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.14 Dalga kılavuzu sensör yüzeyinde prob DNA immobilizasyonu sonrası, a) FITC işaretli prob’a eşlenik b) eşlenik olmayan oligolarla hibridizasyon sonrası floresan görüntüleri (200X büyütme).

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Tez çalışması kapsamında, altın içeren sensör yüzeyi, 5'tiyol modifiye prob ile kaplanmıştır (Wang et al., 2004). İmmobilizasyonun başarısı, özellikle DNA çözeltisinin iyonik kuvvetine bağlıdır. Düşük iyonik kuvvetli çözeltilerde, prob zincirleri arasında büyük ölçüde elektrostatik itmeler görülmektedir. Yüksek iyonik kuvvetli çözeltilerde ise prob moleküller arasındaki elektrostatik itmeler büyük ölçüde azalarak, daha yüksek oranda yüzeyin proba kaplanması sağlanabilmektedir. Herne ve Tarlov tarafından proba maksimum ölçüde kaplanma düzeyine KH_2PO_4 konsantrasyonu 0.4 M'dan yüksek olduğunda ulaşılmıştır (Tarlov et al., 1997). Çalışmamızda bu nedenden ötürü 0.5 M K_2HPO_4 kullanılmıştır. Şekil 3,7'de görüldüğü gibi tiyol grubu taşıyan problemler, altın yüzeye başarıyla immobilize edilmiştir (Şekil 3.7).

Fakat tiyol içeren problemler tek başlarına, oligonükleotitin bazları ve altın yüzey arasında oluşabilecek olası etkileşimlerden dolayı, yapı olarak düzenli ve yoğun bir yüzey oluşturamaz. Bu nedenle düzensiz şekilde adsorbe olmuş problemlerin yerini alması ve kaplanmamış yerleri doldurması amacıyla bloke edici tiyol olan MCH kullanılarak immobilizasyon ve dolayısıyla hibridizasyon verimliliğinin artırılması amaçlanmıştır.

Yüzeye immobilize problemlere %100 eşlenik olan 19 nükleotitlik 5'biotin modifiye sentetik oligo ve eşlenik olmayan 19 nükleotitlik sentetik oligo kullanılarak, biyosensör karakterize edilmiştir. Bunun sonucunda tamamen eşlenik oligo için elde edilen refraktif indis değişimi $514 \mu\text{RIU}=376.762 \text{ RU}$ olarak görülürken, eşlenik olmayan oligo için elde edilen değerler $80 \mu\text{RIU}=58.64 \text{ RU}$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.5). Rastgele diziye sahip eşlenik olmayan oligo için elde edilen değer, eşlenik oligo için elde edilen değere göre çok küçük olması ve hibridizasyon sonrasında hibridizasyon tampon çözeltisi ile muamele sonucunda bu değer, hibridizasyon öncesi orjinal düzeyine dönmesi DNA eşleşmesinin özgül olduğunu göstermektedir.

Hibridizasyon optimizasyonunu takiben ilk olarak PCR ile çoğaltılan hedef, DNA parçaları ile SPR temelli biyosensör tasarımının etkinliği analiz edilmiştir. Bu amaçla, hücre kültürü örneklerine ait mikoplazma pozitif ve negatif PCR örnekleri, tekzincirli DNA elde etmek amacıyla SPR testinden önce 95°C'ta 5 dakika süresince denatürasyona uğratılmıştır ve daha sonra renatürasyonu önlemek amacıyla 1 dakika buzda bekletilmiştir. Bunu takiben örneğin sisteme uygulanmasıyla Şekil 3.6'da görüldüğü gibi ürünlerin sisteme verilmesinden önce veya sonra refraktif indis değişimi oluşmamıştır. Refraktif indis değişiminin görülmemesi, Mariotti ve arkadaşlarının elde ettiği sonuçlarla uyumludur (Mariotti et al., 2002). Bunun nedeni, termal denatürasyon sonucu tek zincirli olduğu düşünülen PCR ürünlerinin yüzeye bağlı problemlara bağlanma hızının kendi eşleniğine bağlanma hızından daha düşük olmasıdır. Ayrıca, kütle transferi sonucu yüzeye yaklaşan tek zincirli PCR parçalarının hareket halindeki çözelti içindeki miktara kıyasla az olması da nedenlerden biri olarak gösterilebilir. Bu nedenle, SPR testinden önce PCR örneklerinde, hem kimyasal hemde termal denatürasyon aynı anda uygulanmıştır (Buiatti et al., 2003).

Termal ve kimyasal denatürasyon sonrası incelediğimiz 460 baz çiftlik mikoplazma pozitif PCR ürünlerinin her birisi için en az üç kez yapılan ölçümlerde, RU değişimi 63-143 aralığında iken, mikoplazma negatif hücreler için RU değişimi 13.1-22.6 olarak bulunmuştur. Mikoplazma negatif örnekler için bulunan refraktif indis değişimlerinin pozitif olanlara göre belirgin bir şekilde daha düşük olduğu görülmüştür. PCR ürünleri, probun yaklaşık 21 katı uzunluğundadır. Bu nedenle yüzeyin sürekli tampon çözeltisi akımı altında olduğu düşünülürse, proba hibridize olmuş tek zincirli PCR ürünlerinin böyle bir ortamda, bir müddet sonra 20 nükleotit üzerinden bağlı oldukları probdan ayrılması ve kendi içinde sekonder yapılar oluşturması olasıdır. Bu durum, kendi kendine eşleşme ile birlikte yüzeydeki proba eşleşmeyi olumsuz yönde etki etmektedir. Sistemin hibridizasyondan bir süre sonra referans çizgisine dönmesi bu şekilde açıklanabilir.

Literatürde, DNA hibridizasyonuna dayalı çok sayıda SPR çalışması mevcuttur. Bunlar çok çeşitli yüzeyler oluşturularak gerçekleştirilmiştir. 2004 yılında Mascini ve arkadaşları Biacore SPR cihazını kullanarak, genetik olarak modifiye mısır tayini için, altın yüzey üzerinde tiyol modifiye prob tabakası oluşturmuş ve

ilgili PCR ürünlerinin proba hibridizasyonunu incelemiştir. Bunun sonucunda kimyasal ve termal denatürasyona uğramış 243 bazçiftlik pozitif PCR örnekleri için ΔRU , 85-94 olarak elde edilirken, negatif örnekler için ΔRU 53-55 olarak bulunmuştur. Çalışmamızda, bu çalışmada olduğu gibi altın yüzeyinde tiyollü prob tabakası oluşturulmuş ve PCR ürünlerinin hibridizasyonu incelenmiştir. Bulduğumuz sonuçlar Mascini ve arkadaşlarının (2004) elde ettiği sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

SPR biyosensörlerinde hedef olarak kullanılan tekzincirli DNA'lar hibridizasyon sonucunda, sensör yüzeyinde çok az bir kalınlık (kütle) değişimi meydana getirmektedir. Bu nedenle hibridizasyon belirleme sınırının arttırılması, elde edilen sinyalin arttırılması önem taşımaktadır. Bu amaçla hibridizasyonu takip eden ve büyük moleküler ağırlıklı bir molekülün kullanıldığı ikinci bir affinite reaksiyonuyla yüzeyde oluşan refraktif indis değişimi arttırılabilir. Bu amaçla çeşitli stratejiler geliştirilerek elde edilen sinyal arttıralarak sistemin hassasiyeti arttırılabilir. Örneğin, biotin taşıyan tek zincirli hedef DNA'ların hibridizasyonundan sonra ortama streptavidin eklenerek sinyal artışı sağlanabilir (Gorton, 2005). Zezza ve arkadaşlarının (2006), buğdayda *Fusarium culmorum* varlığını belirleyebilmek için geliştirdikleri SPR temelli DNA biyosensöründe, streptavidin kaplı sensör yüzeyine biotin üzerinden bağlanan biotin işaretli DNA probları ve 570 baza sahip denatüre PCR ürünleri arasında gerçekleştirilen reaksiyonlarda, pozitif örnekler için SPR sinyalinin 258 ile 298 ΔRU arasında değiştiği görülmüştür. Bu sonuçlar elde ettiğimiz verilerle karşılaştırıldığında, sensör yüzeyinde yapılan kütle artışıyla refraktif indis değişiminde daha büyük bir fark oluşacağı ve sistemin hassasiyetinin daha çok artacağı düşünülmektedir. Kuşkusuz bu ek bir maliyeti de beraberinde getirmektedir.

Sol-jel tabanlı sensör yüzeyi, sulu mikrogözenekli yapısından dolayı ve SPR temelli biyosensörlere göre, sahip olduğu daha fazla yüzey alanıyla biyomoleküllerin etkileşimleri için uygun bir ortam sağlar. TEOS yapısındaki sol-jel yüzeyinde prizma çiftleyici cihazı ile yapılan amin kimyasıyla gerçekleştirilen DNA immobilizasyonu öncesi ve sonrası ölçümler sonucunda, efektif refraktif indisin beklendiği gibi DNA immobilizasyonu sonrası arttığı görülmüştür. Bu artış, immobilizasyon sonrası yüzey yapısındaki mikrogözeneklerin DNA ile kaplanmasından kaynaklanmaktadır. Şekil

3.14'te gösterilen yüzeye immobilize prob ve eşlenik olmayan floresan işaretli oligonükleotitlerle hibridizasyonun sonrasında, eşlenik floresan oligonükleotitle yapılan hibridizasyona göre çok çok az miktarda sayılabilecek bir ışımanın görülmesinin nedeninin floresan işaretli oligonükleotitlerin iyi yıkanamaması ve yüzeyin gözenekli yapısından dolayı mikrogözenekler içine tutuklu kalmasıyla açıklanabilir. Sonuç olarak kontrol örnekleriyle karşılaştırıldığında elde edilen floresan yoğunluklarından hibridizasyonun ve buna bağlı olarak DNA immobilizasyonun başarıyla gerçekleştiği görülmektedir. Festag ve arkadaşları (2005), APTES yüzeyi üzerinde amin kimyasıyla DNA immobilizasyonu sonrası, floresan oligonükleotitlerle hibridizasyon gerçekleştirmiş, bunu takiben yaptıkları floresan ölçümleri sonucu yüzeydeki DNA dağılımının homojen olduğu göstermişlerdir. Çalışmamızda, proba eşlenik floresan oligonükleotitlerle hibridizasyon sonrası yüzeyde homojen olmayan floresan ışımanın, yüzeyin gözenekli yapısı nedeniyle, bu gözenekler içinde birikim yapan floresan işaretli oligolardan kaynaklandığı düşünülmektedir.

Tiyol modifiye problemlerin doğrudan altın yüzeyine immobilize edilmesinin hedeflendiği bu çalışmada, sistemin kurulumunun diğer yöntemlere göre kolaylığı ve kimyasal ve termal denatürasyona uğramış PCR'la çoğaltılmış gerçek örneklerin analizine izin vermesi ve sistemin tekrar tekrar kullanılabilir olması, SPR'ın DNA analizinde alternatif bir yöntem oluşturduğunu göstermektedir.

SPR doğal olarak yüzeye bağlı prob sayısının arttırılabilmesi ve "array" tarzı matris oluşturularak daha fazla sayıda farklılığı belirleme potansiyeli bakımından avantajlı bir biyosensör türü olarak ortaya çıkmaktadır. Geldiğimiz noktada, analit konsantrasyonunu binlerce kat arttıran PCR basamağının ortadan kaldırılması için, refraktif indis değişimini doğrudan etkileyecek bulk grupların (floresans veya kütle türünde) analite eklenmesi gerekli görülmektedir. Bu nedenle, sol-jel tabanlı dalga kılavuzu biyosensörü kullanılan tasarım açısından bir avantaj sunmaktadır. 2 boyutlu SPR'dan 3 boyutlu dalga kılavuzu temelli sensöre geçişle hem hassasiyetin ~100 kat artması hem de biyomoleküllerin kararlılığını koruması sağlandığı için daha avantajlı bir sistem ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, lazerin SPR'daki sönen dalga yerine dalga kılavuzunda yer alan etkileşimleri doğrudan algılamasıyla, farklılıkların daha yüksek hassasiyetle belirlenmesi olasıdır. Sol-jel matriksinde aslında çoklu tanıya olanak

verebilecek tasarımların yapılabilmesi mümkündür ve bu açıdan da SPR'a iyi bir alternatif oluşturacağı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abraham, U. 1996. Formation and structure of self-assembled monolayers. *Chem. Rev.* 96: 1533-1554.
- Aelion, R., Loebel, A. and Eirich, F. 1950. Hydrolysis of ethylsilicate. *Journal of the American Chemical Society.* 72:5705-5712.
- Albert, B., Johnson, A., Alexander, L., Julian, R. and Martin, R. 2002. *Molecular Biology of The Cell.* New York and London: Garland Science.
- Avnir, D., Braun, S., Lev, O. and Ottolenghi, M. 1994. Enzymes and other proteins entrapped in sol-gel materials. *Chem. Mater.* 6, 1605.
- Aykut, U. ve Temiz, H. 2006. Biyosensörler ve gıdalarda kullanımı. *Gıda Teknolojileri Elektronik Dergisi.* 3: 51-59.
- Bernard, B. and Lengeler, B. 1978. *Electronic structure of noble metals and polariton-mediated light scattering.* Springer, Berlin Heidelberg New York.
- Brinker, C. J. and Scherer, G. W. 1990. *Film formation, Sol-gel science- The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing,* New York, Academic Press.
- Brinker, C.J., Hurd, A.J., Schunk, P.R., Frye, G.C. and Ashley, C.S. 1992. Review of sol-gel thin film formation. *J. Non-Cryst. Solids.* 147 & 148: 424-436.
- Carturan, G., Dal Monte R., Pressi G., Secondin S. and Verza P. 1998. Production of valuable drugs from plant cells immobilized by hybrid sol-gel SiO₂. *Journal of Sol-Gel Science and Technology.* 13: 273-276.
- Coiffier, A., Coradin, T., Roux, C., Bouvet, O.M.M. and Livage J. 2001. Sol-gel encapsulation of bacteria: A comparison between alkoxide and aqueous routes. *Journal of Materials Chemistry.* 11: 2039-2044.
- Colello, D., Barnes, A. and Durucan, C. 2003. Patterned hybrid sol-gels for DNA transport and immobilization'. *Penn State Nanofabrication Facility.* 42-43.
- Conroy, J.F.T., Power, M.E., Martin, J., Earp, B., Hosticka, B., Daitch, C. and Norris, P.M. 2000. Cells in Sol-Gels I: A cytocompatible route for the production of macroporous silica gels. *J. Sol-Gel. Sci. Technol.* 18:269-283.
- Cooper, J. M. and Cass. A. E. G. 2004. *Biosensors: a practical approach.* Oxford : Oxford University Press, 2nd Edition.

Cooper, M. A. 2003. Label-free screening of bio-molecular interactions. *Anal Bioanal Chemistry*. 377 : 834–842.

Dave, B.C., Dunn, B., Valentine J.S. and Zink J. I. 1994. Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors. *Anal. Chem.* 66, 1120A.

Drexler, H. G. and Uphoff, C.C. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 39: 75–90.

Fennouh, S., Guyon, S., Jourdat, C., Livage, J. and Roux, C. 1999. Encapsulation of bacteria in silica gels. *Comptes rendus de l'Academie des sciences Paris IIc*. 625-630.

Festag, G., Steinbrück, A., Wolff, A., Csaki, A., Möller, R. and Fritzche, W. 2005. Optimization of gold nanoparticle-based DNA detection for microarrays. *Journal of Fluorescence*. 15: 161-170.

Giakoumaki, E., Minunni, M., Tombelli, S., Tothill, I., Mascini, M., Bogani, P. and Buiatti, M. 2003. Combination of amplification and post-amplification strategies to improve optical DNA sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 19,4: 337-344

Gill, I. and Ballesteros, A. 2000. Bioencapsulation within synthetic polymers (part-1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends in Biotechnology*. 18:282–296.

Gorton, L. 2005, *Sol-Gel Materials*. Elsevier, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Vol XLIV. Wilson & Wilson's.

Guisseppi-Elie, A. and Lingerfelt, L. 2005. Impedimetric detection of DNA hybridization: Towards near-patient DNA diagnostics. *Top Curr. Chem.* 260:161-186.

Gupta R., Chaudhury N.K., 2007. Entrapment of Biomolecules in sol-gel matrix for applications in biosensors: Problems and future prospects. *Biosensors and Bioelectronics*. 22: 2387–2399.

Herne, T. M. and Tarlov M.J. 1997. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc.* 119: 8916-8920.

Homola, J., Yee, S. S. and Gauglitz, G., 1999. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sensors and Actuators B*. 54: 3–15.

<http://www.biacore.com>. Biacore, Surface plasmon resonance, Technology note 1, 2007.

<http://www.metricon.com>, 2008.

http://www-cmls.llnl.gov/?url=science_and_technology-chemistry-solgel_chemistry, 2007.

Irudayaraj, J., Ryan, T. and Subramanian, A. 2006. Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B*. 114: 192–198.

Jiang, T., Minunni, M., Wilson, P., Zhang, J., Turner, A. P. F. and Mascini, M. 2005. Detection of TP53 Mutation using a portable surface plasmon resonance DNA-based biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*. 20: 1939–1945.

Jin, W. and Brennan, J. D. 2002. Properties and applications of proteins encapsulated within sol–gel derived materials'. *Anal. Chim. Acta*. 461: 1–36.

Kandimalla, V. B., Tripathi, V. S. and Huangxian, J. 2006. 'Immobilization of biomolecules in sol–gels: Biological and analytical applications'. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. 36:73–106.

Kuncova, G., Podrazky, O., Ripp, S., Trögl, J., Sayler, G.S., Demnerova, K. and Vankova, R. 2004. Monitoring of the viability of cells immobilized by sol-gel process. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 31, (1-3): 335-342.

Lahiri J., Whitesides, M., Isaacs, L. and Tien, J. 1999. A strategy for the generation of surfaces presenting ligands for studies of binding based on active ester as a common reactive intermediate: a surface plasmon resonance study. *Anal. Chem*. 71: 777–790.

Lev, O., Tsionsky, L., Rabinovich, L., Glezer, V., Sampath, S., Pankratov, I. and Gun, J. 1995. Sol–gel-derived nanocrystalline gold–silicate composite biosensor. *Anal. Chem*. 67 (1): 22A–30A.

Lin, J. and Brown, C.W. 1997. Sol-gel glass as a matrix for chemical and biochemical sensing. *Trends Anal. Chem*. 16 (4): 200–211.

Luderer, F. and Walschus, U. 2005. Immobilization of oligonucleotides for biochemical sensing by self-assembled monolayers: Thiol-organic bonding on gold and silanization on silica surfaces. *Top. Curr. Chem*. 260: 37–56.

MacCraith, B.D., McDonagh, C.M., O'Keeffe, G., McEvoy, A.K., Butler, T. And Sheridan, F.R. 1995. Sol-gel coatings for optical chemical sensors and biosensors. *Sens. Actuators B*. 29 (1–3): 51–57.

Malins, C., Glever, H.G., Keyes, T.E., Vos, J.G., Dressick, W.J., MacCraith, Mannelli I., Minunni, M., Tombelli, S., Wang, R., Spiriti, M. and Mascini, M. 2005.

Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors. *Bioelectrochemistry*. 66: 129– 138.

Mariotti, E., Minunni, M. and Mascini, M., 2002. Surface Plasmon resonance (SPR) biosensor for genetically modified organism (GMOs) detection. *Anal. Chim. Acta*. 453:165-172.

Maskos U. And Southern E.M. 1992. Oligonucleotide hybridizations on glass supports: a novel linker for oligonucleotide synthesis and hybridization properties of oligonucleotides synthesised in situ. *Nucleic Acid Research*. 20:1679-1684.

McGarrity, G. J. 1982. Detection of Mycoplasmal infection of cell cultures. *Advances in cell culture*, Academic Press, New York. Vol. 2, p. 99-131.

Mirabella, F. M. and Harrick, N.J., 1985. Internal reflection spectroscopy: Review and supplement. Harrick Scientific Corporation, 3.

Nassif, N., Bouvet, O., Rager, M.N., Roux, C., Coradin, T. and Livage, J. 2002. Living Bacteria in Silica Gels. *Nature Materials*. 1: 42-44.

Numata, M., Sugiyasu, K., Hasegawa, T. and Shinkai, S. 2004. Sol-Gel Reaction Using DNA as a Template: An Attempt Toward Transcription of DNA into Inorganic Materials. *Angewandte Chemie International Edition*. 43: 3279-3283.

Peralta-Perez, M.R., Saucedo-Castaneda, G. and Gutierrez-Rojas, M. 2001. SiO₂Xerogels: A Suitable Inert Support for Microbial Growth. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. 20:105-110.

Peterson, W. A., Heaton, R. J. and Georgiadis, R. M. 2001. The effect of probe density on DNA hybridization. *Nucleic Acid Research*. 29:24, 5163-5168.

Phinney, J.R., Conroy, J.F., Hosticka, B., Power, M.E., Ferrance, J.P., Landers, J.P. and Norris P.M. 2004. The design and testing of a silica sol–gel-based hybridization array. *Journal of Non-Crystalline Solids*. 350:39-45

Rickus, J. L., Dunn, B. and Zink, J. I. 2002. ‘Optically based sol-gel biosensor materials’. *Optical Biosensors: Present and Future*. 14: 427-456.

Rong, G., Najmaie, A., Sipe, J. E. and Weiss, S. M. 2006. Porous silicon waveguides for DNA detection. *IEEE*. 13-15.

Rong, G., Saarinen, J. J., Sipe, J. E. and Weiss, SM. 2006. High sensitivity sensor based on porous silicon waveguide. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc*. 934.

Roos, H., Karlsson, R., Nilshans, H. and Persson, A. 1998. Biosensors and the search for structure-activity correlations. *J Mol Recognit*. 11:204–210.

Saarinen, J. J., Fauchet, P.M., Weiss, S. M. and Sipe, J. E. 2005. Optical sensor based on resonant porous silicon structures. *Optics Express*. 13, 10: 3754-3764.

Schepinov, M.S., Case-Green, S.C. and Southern, E. M. 1997. Steric factors influencing hybridisation of nucleic acids to oligonucleotide arrays. *Nucleic Acid Research*. 25: 1155-1161.

Seliger, H., Hinz, M. and Happ, E. 2003. Arrays of immobilized oligonucleotides – Contributions to nucleic acids technology. *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 4: 379-395.

Serge, L. B. 2001. Strategies in the preparation of DNA oligonucleotide arrays for diagnostic applications. *Current Medicinal Chemistry*. 8: 1213-1244.

Serway, R. A., Beichner, R. J. and Jevett, J. W. 2002. Fen ve mühendislik için fizik, 5th edition. Ankara, Palme Yayıncılık.

Sglavo, V.M., Carturan, G., Dal Monte, R. and Muraca, M., 1999. SiO₂ Entrapment of animal cells. *Journal of Material Science*. 34: 3587-3590.

Subramanian, A., Irudayaraj, J. and Ryan T. 2006. Mono and dithiol surfaces on surface plasmon resonance biosensors for detection of *Staphylococcus aureus*. *Sensors and Actuators B*. 114: 192–198.

Sung, H., Kang, H., Bae, Y.J., Hong, J. T., Chung, Y. B., Lee, C. and Song, S., 2006. PCR-based detection of mycoplasma species. *The Journal of Microbiology*. Vol. 44, No. 1, p.42-49.

Tanga, J., Hub, M., Leec, S. and Roblind, R. 2000. Polymerase chain reaction based method for detecting Mycoplasma/Acholeplasma contaminants in cell culture. *Journal of Microbiological Methods*. 39: 121–126.

Telefoncu, A. Biyosensorler, 1999. Tübitak.

Tonya, M. HernE, T. M. and Tarlov, M. J. 1997. Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces. *J. Am. Chem. Soc*. 119, 8916-8920.

Uphoff, C. and Drexler, H.G. 2002. Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*. 39: 75–90.

Uphoff, C. and Drexler, H.G. 2003. Detection of mycoplasma contaminations. *Basic Cell Culture Protocols*, 3rd Edition, Humana Press. 290,13-24.

Wang, R., Tombelli, S., Minunni, M., Spiriti, M. M. and Mascini, M. 2004. Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing. *Biosensors and Bioelectronics*. 20: 967–974.

Widrich, CA., Chung, C. and Porter, M. D. 1991. The electrochemical desorption of n-alkanethiol monolayers from polycrystalline Au and Ag electrodes *J. Electroanal. Chem.* 310:335-359.

Zeder-Lutz G, Zuber E, Witz J, Van Regenmortel MH., 1997. Thermodynamic analysis of antigen-antibody binding using biosensor measurements at different temperatures. *Anal Biochem.* 246:123–132.

Zeza, F., Pascale, M., Giuseppina, M. and Visconti, A. 2006. Detection of *Fusarium culmorum* in wheat by a surface plasmon resonance- based DNA sensor. *Journal of Microbiological Methods*. 66: 529-537.

ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İzmir’de doğdu. 1999 yılında Kabataş Erkek Lisesi’nden, 2004 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü Lisans Programı’ndan mezun oldu. 2006 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Biyoloji Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı. Halen yüksek lisans eğitimine devam etmektedir.