

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

**ÇEVRE KİRLİLİĞİNİN İZLENMESİ  
İÇİN FİBER-OPTİK DNA  
BİYOSENSÖRLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİMİ**

ZEHRA BANU BAHŞI

DOKTORA TEZİ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

GEBZE

2010

T.C.

GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ  
ENSTİTÜSÜ

**ÇEVRE KİRLİLİĞİNİN İZLENMESİ  
İÇİN FİBER-OPTİK DNA  
BİYOSENSÖRLERİNİN  
GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİMİ**

ZEHRA BANU BAHŞI

DOKTORA TEZİ

ÇEVRE MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Mehmet Karpuzcu

GEBZE


2010





### DOKTORA TEZİ JÜRİ ONAY SAYFASI

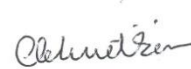
G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun .15.01.2020... tarih ve 2020/03 sayılı kararıyla oluşturulan jüri tarafından .05/02/2020... tarihinde tez savunma sınavı yapılan ....Zehra...Baru...Babşi.....'ın tez çalışması ....Genre...Mühendisliği.....Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.


### JÜRİ

ÜYE  
(TEZ DANIŞMANI) : Prof. Dr. Mehmet KARPUZCU 

ÜYE : Prof. Dr. Bülent KEŞKİNLER 

ÜYE : Doç. Dr. Gülelde ENGİN 

ÜYE : Doç. Dr. Mehmet ÖZER 

ÜYE : Doç. Dr. M. Hasan ASLAN 

### ONAY

G.Y.T.E. Mühendislik ve Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun ...../...../20... tarih ve ...../..... sayılı kararı.

### İMZA/MÜHÜR

## ÖZET

### TEZİN BAŞLIĞI: ÇEVRE KİRLİLİĞİNİN İZLENMESİ İÇİN FİBER-OPTİK DNA BİYOSENSÖRLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE ÜRETİMİ

YAZAR ADI: ZEHRA BANU BAHŞI

Bu çalışmada, çevre kirliliği izlemesi için optik tabanlı DNA biyosensörünün üretimi ve geliştirilmesi amaçlanmıştır. Hem DNA tutuklanması için uygun yüzeylerin sağlanması hem de optik özelliklere uygun, dalga kılavuzu özelliğine sahip katı altlıkların oluşturulması için  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmler cam altlıklar üzerine sol-jel tekniği ile daldırarak kaplama cihazında kaplanmıştır.  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmlerin nanoboyutta homojen dağılmış porlara ve kovalent olarak DNA tutuklanması için gerekli olan  $\text{-OH}$  bağlarına sahip olduğu sırasıyla Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Fourier Dönüşümlü Kızılötesi (FTIR) Spektroskopisi karakterizasyonlarıyla gösterilmiştir. Film yüzeyi 3-(trietoksisil)propilamin (APTES) ile silanize edilmiştir. Daha sonra bu tek tabakanın üzerine çapraz bağlayıcı görevi göreceği olan 1,4-fenilen diisotiyosiyanat (PDC) uygulanmıştır. Teorik olarak, APTES tek tabakasındaki epoksi gruplarıyla film yüzeyindeki  $\text{-OH}$  gruplarının reaksiyona girdiği ve PDC' nin de karbon (C) bağlı uçlarından bir ucuyla APTES tabakasındaki bulunan amin grubundaki, diğer ucuyla ise amin modifiye DNA' daki amin grubundaki azot (N) ile bağlanarak tutuklanmanın gerçekleştiği düşünülmektedir.

Burada su kirliliğinin indikatör parametresi olarak bilinen ve suyoluyla bulaşan ciddi hastalıklara yol açan koliform grup bakterisi E.coli (koli basili)' nin patojen bir türü olan E.coli O157:H7 bakterisine özgü DNA (Gen numarası 957271), Prob DNA olarak seçilmiştir. Dönüştürücü olarak, dielektrik filmlerin kırılma indisi değişimlerini yüksek doğruluk payı ile ölçen prizma çiftleyici cihazı kullanılmıştır. Böylece DNA tutuklanması ve hibritleşmesi sonrasındaki küçük kırılma indisi değişimlerinden algılama yapılmıştır. DNA tutuklanmasının ve hibridizasyonun gerçekleştiği Floresan Mikroskopu fotoğraflarıyla desteklenmiştir. Ayrıca sentetik

DNA ile yapılan hibridizasyon işlemleri, evsel atıksu numunesinden DNA kiti (Bacteria DNA Preparation Kit from Jena Bioscience) kullanılarak izole edilen DNA' lar (Numune DNA) ile de yapılmıştır. Prizma çiftleyici cihazıyla Prob DNA tutuklanması ve Numune DNA hibridizasyonu kırılma indisi değişimlerinden algılanmıştır.

## SUMMARY

### **TITLE OF THE DISSERTATION: FABRICATION AND DEVELOPMENT OF FIBER-OPTIC DNA BIOSENSORS FOR ENVIRONMENTAL MONITORING**

**AUTHOR: ZEHRA BANU BAHŞI**

The purpose of this study is to fabricate and develop fiber-optic DNA biosensors for environmental monitoring. Sol-gel derived SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> thin films were deposited on glass substrates by using dip coater to obtain suitable surfaces for DNA immobilization and waveguide properties. SEM (Transmission Electron Microscope) micrographs showed that SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> thin films had homogenous nanosize pores. Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) confirmed that thin films had –OH groups on the surface for DNA immobilization. First, the substrate surface was silanized with APTES (3-(Triethoxysilyl)propylamine) monolayer. Then PDC (1,4 phenylene diisothiocyanate) was applied as a homobifunctional crosslinker. It is known that -OH groups on the film surface react with ethoxy groups of APTES. Then Carbon (C) terminals of PDC attach with nitrogen (N) terminals in amine groups of APTES and amine modified DNA.

Coliform bacteria like E.coli are indicators for water contamination and cause severe waterborne illnesses. Therefore, the DNA of E.coli O157:H7 (Gene ID 957271) which is the pathogen strain of E.coli, was chosen as a Prob DNA in this study. Prism coupler is used as an optical transducer that measures the refractive index changes of the dielectric films accurately. Thus, minute changes in refractive index could be detected after DNA immobilization and hybridization process. DNA immobilization and hybridization processes were supported by fluorescent microscope images. The developed biosensor was tested with domestic wastewater samples. First, DNA (Sample DNA) from the wastewater samples was extracted by using DNA isolation kit (Bacteria DNA Preparation Kit from Jena Bioscience). Later, prob DNA immobilization and sample DNA hybridization processes were detected from the refractive index changes by using prism coupler.

## TEŞEKKÜR

Çalıőmalarım sırasında bilgi ve tecrübeleriyle bana daima destek olan hocalarım Prof. Dr. Mehmet Karpuzcu, Doç. Dr. Güleda Engin, Doç. Dr. M. Hasan Aslan, Doç. Dr. Ferruh Özcan' a ve yardımlarını esirgemeyen arkadaşlarım Aligül Büyükaksoy, Sinan Mert Ölmezcan, İnci Türk, Burcu İnanç' a teşekkür ederim.

Her zaman verdikleri maddi ve manevi destekle yanımda olan aileme de çok teşekkür ederim.

# İÇİNDEKİLER DİZİNİ

ÖZET	iv
SUMMARY	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xiii
TABLolar DİZİNİ	xvi
1. GİRİŞ	17
2. BİYOSENSÖRLER	21
2.1 Biyolojik Algılama Elemanlarına (Reseptör) Göre Biyosensörlerin Tanımlanması	23
2.1.1 Reseptör Olarak Antikor (Antibody) Kullanılması	23
2.1.2 Reseptör Olarak Enzim Kullanılması	23
2.1.3 Reseptör Olarak DNA Kullanılması	25
2.1.3.1 Katı Yüzeyler Üzerinde DNA Tutuklanması ve Hibridizasyonu	28
2.1.3.1.1 Hibridizasyon Verimliliği ve Hassasiyeti	29
2.1.3.1.2 Prob Oligonükleotidin Yapı ve Dinamiği	30
2.1.3.1.2.1 Prob' un Yüzey Konsantrasyonu	30
2.1.3.1.2.2 Prob Uzunluğu ve Oryantasyonu	30
2.1.3.1.3 Hibridizasyon Şartları	32
2.1.3.1.3.1 Sıcaklık	33
2.1.3.1.3.2 İyonik Kuvvet	33
2.1.3.1.3.3 Baz Uyuşmazlığı	34
2.1.3.1.3.4 Kütle Taşınımı	35
2.1.3.1.3.5 Rastgele Yüzeğe Yerleşme (Nonspecific Adsorption)	35
2.2 Dönüştürücülere (Transducer) Göre Biyosensörlerin Gruplandırılması	36
2.2.1 Elektrokimyasal Dönüştürücüler	36
2.2.2 Pizo-elektrik (Piezo-electric) Cihazlar	37
2.2.3 Termal Sensörler	37
2.2.4 Optik Dönüştürücüler	37
2.2.4.1 Dolaylı (İşaretli, Labeled) Optik Algılama	39

2.2.4.2	Doğrudan (İşaretsiz, Label-Free) Optik Algılama	39
2.2.4.3	Fiber Optik (FO) Tabanlı Biyosensörler	40
2.2.4.4	Yüzey Plasmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) Tabanlı Biyosensörler	41
2.2.4.4.1	Yüzey Plasmon Rezonansı (SPR)	42
2.2.4.4.2	Prizma Çiftleyici (Prism Coupler)	43
2.2.4.4.2.1	Efektif İndeksin ( $\beta$ -Değeri) Tanımı	44
2.2.4.4.2.2	Prizma Çiftleyici ile Biyomoleküllerin Algılanması	46
2.3	Biyolojik Elemanların Tutuklanma (Immobilization) Yöntemleri	46
2.3.1	Adsorpsiyon	47
2.3.2	Mikro Kapsülleme	47
2.3.3	Yakalama (Entrapment)	47
2.3.4	Çapraz Bağlama	47
2.3.5	Kovalent Bağlama	48
2.3.6	Silanizasyon	48
2.3.6.1	Silanizasyonda Kullanılan Altlık Yüzeyleri	49
2.3.6.2	Çapraz Bağlayıcılar	50
3.	SOL-JEL TEKNİĞİ	51
3.1	Film Oluşumu	57
3.1.1	Film Oluşumunun Fiziği	59
3.1.1.1	Daldırarak Kaplama	59
3.2	Sol-Jel Tekniği ve Optik Biyosensörler	60
4.	ESCHERİCHİA COLİ (E.COLİ)	63
5.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	65
5.1	Çalışmanın Amacı	65
5.2	Kaplama Yapılacak Cam Altlıkların Temizlenmesi	65
5.3	Sensör Tasarımında Kullanılacak Altlıkların Üretimi	66
5.4	Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri	68
5.5	Fourier Dönüştürümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizleri	69
5.6	DNA Tutuklanması (Immobilization) için SiO <sub>2</sub> - TiO <sub>2</sub> İnce Film Yüzeylerinin Hazırlanması ve DNA Hibridizasyonu	69

5.7 Prizma Çiftleyici (Prism Coupler) Cihazı Kullanılarak Oluşturulan Deney Seti Kurulumu	72
5.8 Floresan Mikroskopu Analizleri	72
5.9 Su Kirlenmesinde İndikatör Bakteri olarak Kullanılan E. coli' nin İzlenmesi için Seçilen Sentetik DNA Zinciri	73
5.10Evsel Atıksu Numunesiyle Yapılan Çalışmalar	73
6. BULGULAR VE TARTIŞMA	77
6.1 SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Sonuçları	77
6.2 SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin FTIR Spektroskopisi Sonuçları	79
6.3 Prizma Çiftleyici Ölçüm Sonuçları	80
6.4 Optik Tabanlı DNA Biyosensörüne ait Yüzeylerin Floresan Mikroskopunda İncelenmesi	87
6.5 Evsel Atıksu Numunesinden İzole Edilen Bakteri DNA' sı ile Yapılan Prizma Çiftleyici Cihazı Ölçüm Sonuçları	89
7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	91
KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ	99

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
E.coli	Escherichia coli
EPEC	Enteropatojenik
ETEC	Enterotoksijenik
EIEC	Enteroinvaziv
EHEC	Enterohemorajik
DAEC	Difuz-adhering
EAggEC	Enteroagregatif
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
Å	Angstrom
nm	Nanometre
µM	Mikromolar
T <sub>m</sub>	Erime sıcaklığı
A	Adenin
G	Guanin
C	Sitozin
T	Timin
SDS	Sodyum dedosil sülfat
RNA	Ribo Nükleik Asit
θ	Gelme açısı
n	Kırılma indisi
λ	Dalga boyu
T	Film kalınlığı
ψ <sub>10</sub> , ψ <sub>12</sub>	Fresnel faz değişimleri
β	Efektif indis
f	Fonksiyonellik
TEOS	Tetraetilortosilikat
TBOT	Tetra-n-butilortotitanat
APTES	Aminopropiltrioksosilan
PDC	1,4 fenilendiisotiyosiyanat
DMSO	Dimetilsülfoksit

HEPES	4-(2-hidroksietil)-1-piperazineetanolsulfonikası
PEG	Polietilen glikol
FLSN	Floresan
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
FTIR	Foriuer Dönüşümlü Kızılötesi Spektrometresi

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Sekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Araştırmalara göre oluşturulan sıralama. (Kaynak ISI web of science. Ca. Son 20 yıldaki patojen bakteri üzerine bulunan 2500 makale).	19
1.2 Metricon 2010 Prizma Çiftleyici cihazının resmi ( <a href="http://www.metricon.com/">http://www.metricon.com/</a> ).	20
2.1 Biyosensörün şematik gösterimi (Eggins, B.R., Biosensors: An Introduction, Copyright 1996.©John Wiley & Sons Limited).	21
2.2 Biyosensörler.	22
2.3 Enzimli ve enzimsiz reaksiyonların enerji diyagramı	24
2.4 DNA molekülünün yapısı.	26
2.5 Erime sıcaklığı ( $T_m$ ) eğrisi.	27
2.6 Yüzeyle bağlı tek zincirli oligonükleotidlerin şematik gösterimi: (a) çözeltildeki uzaması, (b) yüzeyle yüklü fosfat omurgasının etkileşimi, (c) yüzeyle bazların etkileşimi, (d) ara gruplar yoluyla bağlanması.	31
2.7 Saç tokası şeklini almış bir prob oligonükleotidin şematik gösterimi.	32
2.8 Fiber Optik Biyosensör. (a) Dıştan: fiber optik, sensör alanına ve dışına ışık kılavuzluğunda kullanılır. (b) İçten: fiber optik kaplaması kaldırıldıktan sonra alıcı moleküller, fiber çekirdeği üzerine tutuklanır.	40
2.9 (a) Prizma Çiftleyicinin şematik gösterimi, (b) Yansıyan ışığın şiddeti ( $i$ )' ye karşı gelen açı ( $\theta$ )' nın grafiği.	43
2.10 Silika yüzeyinde oluşabilen Si-OH grupları.	50
3.1 İki fonksiyonel ( $f=2$ ) monomerle halka ve zincirlerin oluşumu; (a) dimer, (b) zincir, (c) halka.	55
3.2 Çok fonksiyonel monomerin ( $f>2$ ) dallanmasıyla yapılan parça polimer.	55
3.3 Jel yapısının şematik gösterimi. P oku bir porda başlar ve bir katı fazın içinden geçerek farklı bir pora girer. S oku ise bir katı fazdan diğer bir katı faza geçer. Jeller kolloid ölçüsünde üç boyutlu bir yapı oldukları için bu oklar $1\mu m$ ' den küçüktür.	56
3.4 Sol-jel ile elde edilen silikon oksit ağın, asit ve baz katalizörlü şartlar altındaki durumu.	57

<b>3.5</b> Sol-jel yöntemiyle film oluşumu (sol taraf).	58
<b>3.6</b> (A) Daldırarak kaplama işleminin basamakları: (a-e) banyo; (f) sürekli. (B) sürekli işlemin 3 ile gösterilen alandaki sıvı akış noktalarının detayı. U çekme hızı, S durgunluk noktası, $\delta$ bağlı tabaka ve h akışkan filmin kalınlığı.	59
<b>3.7</b> Sol-jel süreci.	62
<b>4.1</b> E. coli O157:H7' nin geçirimli elektron mikroskobu fotoğrafı.	64
<b>5.1</b> SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin üretim akış diyagramı.	67
<b>5.2</b> PEG 400 Katkılı SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin üretim akış diyagramı.	68
<b>5.3</b> DNA bağlanması için yüzeyin hazırlanması.	69
<b>5.4</b> DNA tutuklanması ve hibridizasyonu akış şeması.	71
<b>5.5</b> Prizma Çiftleyici cihazının deneysel kurulumu.	72
<b>5.6</b> DNA kiti kullanılarak bakteriden DNA izolasyonu şeması.	75
<b>6.1</b> SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Mikrografı.	77
<b>6.2</b> PEG 400 Katkılı SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Mikrografı.	78
<b>6.3</b> SiO <sub>2</sub> -TiO <sub>2</sub> İnce Filmlerin (Katkısız ve PEG 400 Katkılı) FTIR grafiği.	79
<b>6.4</b> Prob DNA tutuklanmasından önce 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete (i) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).	81
<b>6.5</b> Prob DNA tutuklanmasından sonra 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete (i) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).	82
<b>6.6</b> Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonundan sonra 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete (i) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).	83
<b>6.7</b> Katkısız İnce Film üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu için ölçüm sayısına karşılık kırılma indisi değerleri grafiği.	84
<b>6.8</b> Katkısız İnce Film üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması öncesi, sonrası ve Hedef DNA hibridizasyonu sonrası ölçülen İç Açığa karşı Şiddet grafiği.	86
<b>6.9</b> PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu sonrasında ölçülen İç Açığa karşılık Şiddet grafiği. $\longleftrightarrow$ işareti ile gösterilen hibridizasyon sonucu açığı değişimi.	87

- 6.10** FLSN bağlı (a) Eşlenik olan DNA, (b) Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonundan sonraki Floresan mikroskobu resimleri. 88
- 6.11** PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Numune DNA hibridizasyonu sonrasında ölçülen İç Açıya karşılık Şiddet grafiği. 90

## TABLolar DİZİNİ

<b><u>Tablo</u></b>	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>3.1</b> Kullanılan ligandlar.	52
<b>5.1</b> Su kirlenmesinde indikatör bakteri olarak kullanılan E. coli' nin izlenmesi için seçilen sentetik DNA zincirleri.	73
<b>6.1</b> Katkısız ince filmler üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu sonrası Prizma çiftleyici ölçüm sonuçları.	84
<b>6.2</b> PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu için Prizma çiftleyici cihazı ortalama ölçüm sonuçları ve standart sapmaları.	85
<b>6.3</b> PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu (Numune DNA, Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan DNA) için Prizma çiftleyici cihazı ortalama ölçüm sonuçları ve standart sapmaları.	89

# 1. GİRİŞ

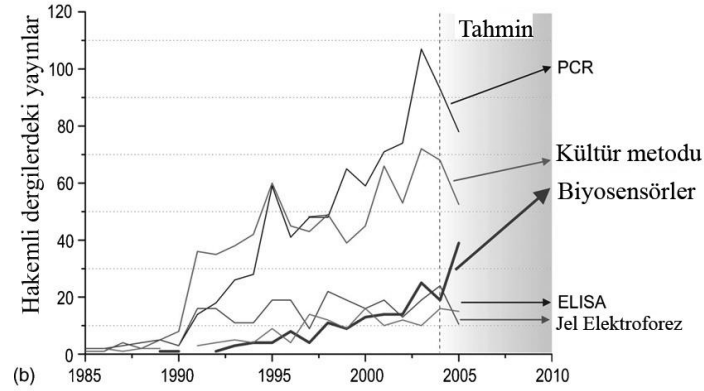
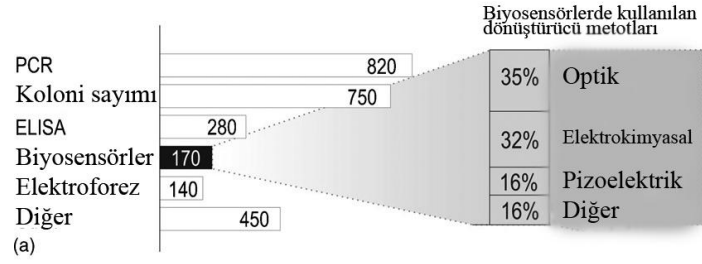
Biyosensörler, istenilen analiti (uyarıcı) biyolojik algılama elemanı ile fizikokimyasal bir dönüştürücüyü (transducer) bir araya getirerek ölçen cihazlara denir. Burada biyolojik algılama elementi genellikle dönüştürücü ile temas halindedir. Analit ile biyolojik algılama elementi temas haline geldiğinde biyolojik algılama elementi ile analit belirli etkileşimlerde bulunarak biyolojik algılama elementinde ya da onun bulunduğu ortamda bir değişikliğe yol açar. Bu değişikliği de dönüştürücü elektriksel bir sinyale çevirir. Burada biyosensörleri diğer sensörlerden farklı kılan özellik, biyosensörün biyolojik algılayıcı elementi kullanarak algılama işlemini gerçekleştirmesidir.

Biyosensörlerde biyolojik algılama elemanı olarak kullanılan doğal ya da sentetik biyomoleküllerin seçiciliğinin oldukça yüksek olması, biyosensörlerin taşınabilir boyutlara getirilme potansiyelinin bulunması, hızlı sonuç verebilmesi, güvenilirliği ve gerçek zamanlı ölçüm olanağı bulunması biyosensörlerin önemini ortaya koyar. Biyosensörler geniş uygulama potansiyellerine bağlı olarak, son yıllarda özellikle çevresel, tıbbi ve askeri alanlardaki uygulamalar ile ilgili çok sayıda araştırmanın konusu haline gelmiştir.

Dünyadaki sınırlı ve kolaylıkla kirletilebilen doğal kaynakların korunması için gerek yönetsel ve gerekse bireysel olarak çevrenin korunması ve kirletilmiş çevrenin eski haline getirilmesi için çok sayıda çalışma yapılmaktadır. Çevre izlemesi, çevrenin korunması ve eski haline getirilmesi bakımından büyük önemi haizdir. Çevrede kirletici unsurların sayısındaki artıştan dolayı, çevre kirliliğinin izlenmesi için daha hızlı ve daha ucuz analitik tekniklerin geliştirilmesine gereksinim duyulmuştur. Bu ihtiyaçla biyosensörler, geleneksel analitik metotlara (kromatografik metotlar gibi) alternatif veya tamamlayıcı analitik cihazlar olarak görülmektedir [Rodriguez-Mozaz et al., 2005].

Toprakta, suda ve havadaki kirliliğin izlenmesi, iki temel kategoride sınıflandırılabilir. Bunlar: (i) sadece evet veya hayır cevabını içeren tanımlama veya görüntüleme teknikleri ve (ii) istenmeyen kirletici parametrelerin konsantrasyonlarını belirleme ya da kirliliğin mücadele edilebilir seviyeler içerisinde olup olmadığını içeren kantitatif veya yarı kantitatif tekniklerdir. Biyosensörler ile bu iki tekniği bir arada kullanmak mümkündür. Kısa sürelerde numune hazırlama metotlarına ihtiyaç kadar hızlı, sürekli ve çok elemanlı analizlere olan ihtiyacın da büyümesinden dolayı biyosensörler ortaya çıkmıştır [Sadik and Mulchandani, 2000].

Sularla bulaşan hastalıklar çok büyük kitleleri etkilediğinden, patojenlere karşı savunmada suyun sağlıklı olması kritik bir öneme sahiptir. İçme suyunun patojenlerden geleneksel uygulamalar yoluyla arındırılmasından sonra, enfeksiyona sebep olan mikropların kirletmeyeceği nitelikteki bir su dağıtım şebekesiyle dağıtılması ayrıca büyük önem taşır. Özellikle büyük metropollerdeki su dağıtım şebekelerinde her yıl çok sayıda sorun yaşandığından, yapılan analizlerden kısa sürede sonuç almak üzere hızlı testlere gereksinim vardır. Patojenleri hızla bulma yeteneğinde olan biyosensörler çevre kirlenmesine neden olan patojenlerin tanımlanmasında giderek büyüyen bir kullanım alanına sahip olacaktır [Alocilja, and Radke, 2003]. Yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar doğrultusunda patojenlerin algılanmasında biyosensörlerin hızla gelişmekte olan bir teknoloji haline geldiği görülmektedir (Şekil 1.1). Patojenlerin algılanması, özellikle besin endüstrisi, klinik, su ve çevre kalite kontrolü alanlarında son derece önemlidir. Bununla ilgili yapılan çalışmalara göre E.coli ve Salmonella en çok çalışılan bakteri türleridir [Lazcka et al., 2007].



**Şekil 1.1** Araştırmalara göre oluşturulan sıralama. (Kaynak ISI web of science. Ca. Son 20 yıldaki patojen bakteri üzerine bulunan 2500 makale).

Bu çalışmada, çevre kirliliğinin izlenmesinde doğrudan (işaretsiz, label-free) ölçüm yapabilen optik bir biyosensör, yeni bir optik dönüştürücü olarak prizma çiftleyici cihazı kullanılarak tasarlanmıştır. Prizma çiftleyici, ince dielektrik filmlerin kırılma indislerini yüksek hassasiyetle ölçme yetisine sahip bir cihazdır (Şekil 1.2). Aynı zamanda bu çalışma, son derece ucuz, basit ve yüksek kimyasal homojenlik imkânı sağlayan sol-jel daldırma yöntemiyle elde edilen  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmlerinin, prizma çiftleyicide kullanılacak dalga kılavuzları olarak elde edilmesi de oldukça yeni bir çalışmadır. Bu filmlerin kovalent DNA bağlanması için uygun kimyaya sahip yüzeyler barındırmaları ve poroz filmler üretilerek bağlanma yüzeyinin artırılması sağlanmıştır.



**Şekil 1.2** MetriCon 2010 Prizma Çiftleyici cihazının resmi (<http://www.metriCon.com/>).

Prob DNA (biyoalgılayıcı element) olarak içme ve kullanma sularında kirliliğin indikatör parametresi olarak bilinen, insan ve hayvanlarda çeşitli hastalıklara sebep olan koliform bakteri grubundan E.Coli bakterisinin patojen bir türü olan E.Coli O157:H7 türüne ait DNA (gen numarası 957271) seçilmiştir.

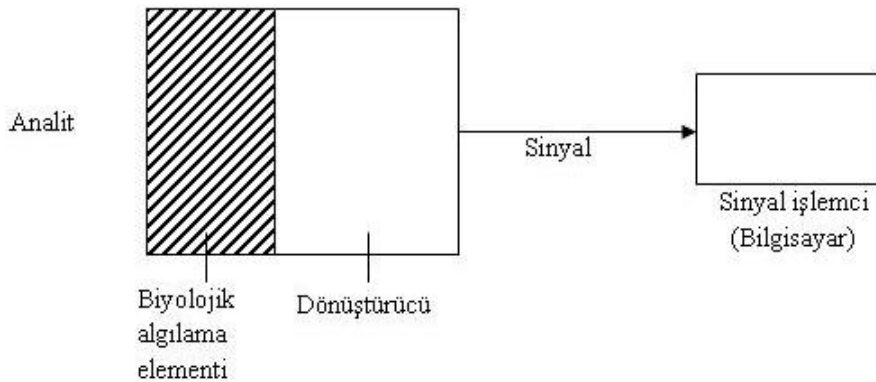
Çalışmada yüksek hassasiyette doğrudan ölçüm yapabilen yeni bir biyosensörün üretimi ve geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu çalışma ileride taşınabilir (portable), yerinde ölçümlerde kullanılacak bir cihaz geliştirilmesi hedefinin ön aşamasını teşkil etmektedir.

## 2. BİYOSENSÖRLER

Sensörler, bir sinyali veya uyarıcıyı (analit, stimulus) kabul eden ve yanıtlayan cihazlardır. Sensörler başlıca üç gruba ayrılır:

- Fiziksel sensörler, uzunluk, ağırlık, sıcaklık, basınç ve elektrik akımı gibi fiziksel miktarları ölçen cihazlardır.
- Kimyasal sensörler, fiziksel veya kimyasal yanıtlarla kimyasal maddeleri ölçen cihazlardır.
- Biyosensörler** ise biyolojik algılama elementi (reseptör) kullanılarak kimyasal maddeleri ölçen cihazlardır [Fraden, 2004].

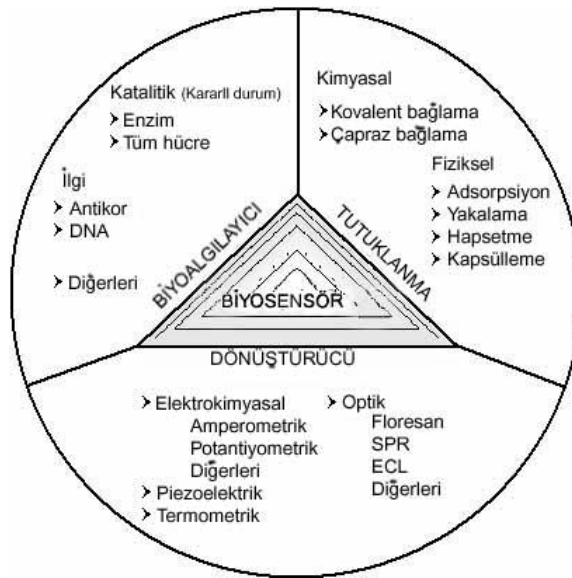
Bütün bu cihazlar, ölçülebilir cevaplar meydana getiren bir dönüştürücüye (transducer) bağlıdır. Biyosensörler de dönüştürücüyle bağlantılı biyolojik algılama elementinin birleşiminden oluşur (Şekil 2.1). Özet olarak biyosensörler, dönüştürücü elemanla direk bağlantı halinde olan bir biyolojik algılama elementinin kullanılmasıyla kantitatif veya yarı kantitatif analitik bilgilerin sağlanabildiği kendine yeten bütünleşik bir cihazdır [<http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Materials-Science-and-Engineering/3-051JSpring-2006/09FC4F88-E15A-4B89-B28A-0CDD596FA246/0/lecture17.pdf>].



**Şekil 2.1** Biyosensörün şematik gösterimi (Eggins, B.R., Biosensors: An Introduction, Copyright 1996.©John Wiley & Sons Limited).

Biyosensörler, Şekil 2.2' de biyolojik algılama elemanlarının, dönüştürücülerin ve tutuklanmanın çeşitlerine göre genel olarak gösterilmiştir. Biyolojik algılama elemanları olarak kullanılan biyomoleküllerin birbirleri arasındaki etkileşimlerin seçiciliği biyosensörlerin temelini oluşturur. Bir enzimin yalnız çok özel bir substrat ile reaksiyona girmesi, DNA tek zincirlerinin yalnız kendisinin tamamlayıcı olan zincir ile çiftleşmesi bu seçiciliğe bazı örneklerdir. Biyolojik algılama elemanı olarak antikor, nükleik asit, doku, organel, hücre reseptörü ve enzim gibi biyomoleküller kullanılabilir.

Dönüştürücüler, biyolojik algılama elementinin analit ile etkileşimini ölçerek bunu elektriksel sinyale dönüştüren elemanlardır. Bu dönüşüm genelde elektrokimyasal, elektriksel, termal, manyetik, akustik veya optik yöntemlerle yapılır [Rogers et al., 1995]. Dönüştürücülerin algılama limitinin düşük olması, sinyal/gürültü oranının yüksek olması, hassasiyetinin yüksek olması ve doğruluk payının yüksek olması beklenir.



Şekil 2.2 Biyosensörler.

(<http://www.karstenfaehrich.de/Biosensors/biosensors.htm>)

## **2.1 Biyolojik Algılama Elemanlarına (Reseptör) Göre Biyosensörlerin Tanımlanması**

Algılama elemanları, sensör cihazlarının anahtar bileşenidir. Algılama elemanları, sensörün belli bir analit veya analit grubunu, diğer maddelerin girişiminden kaçınarak, seçici olarak cevaplamasına olanak verirler. Biyosensörlerde, algılama elemanı olarak antikor (antibody), enzim ve DNA en sık kullanılan biyomoleküllerdir.

### **2.1.1 Reseptör Olarak Antikor (Antibody) Kullanılması**

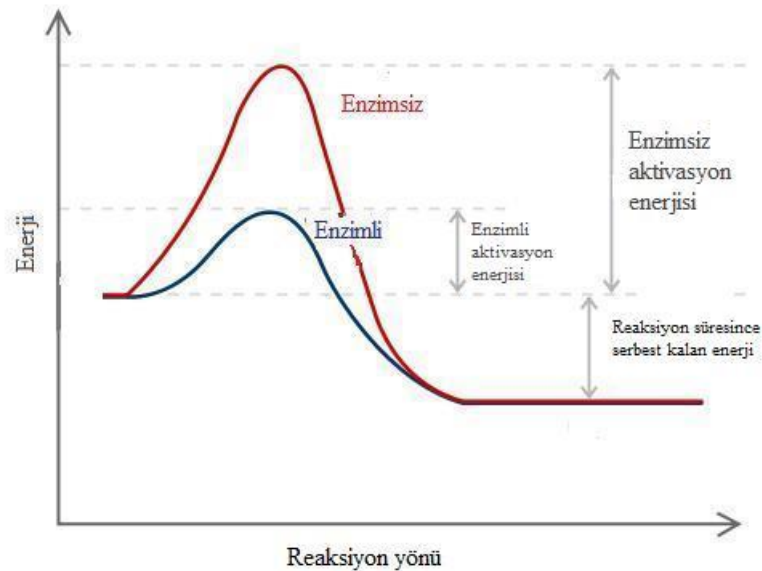
Antikorlar bağışıklık sisteminin merkezi araçlarıdır. Antikorlar patojenler gibi yabancı organizma moleküllerini spesifik olarak bağlayan proteinlerdir. İnsanların bağışıklık sistemleri  $10^{15}$  farklı tipte ve her biri farklı bağlanma özelliğine sahip antikor yaratma kabiliyetine sahiptir. Bu doğal üretime modern metotlarla üretilen antikorlarda ilave edildiğinde gerçekte herhangi bir molekülü yüksek afinite ile tanıyabilen antikorların rutin olarak sağlanması mümkündür. Antikorlar kullanılarak tanı testlerinin (diagnostic tests) geliştirilmesi biyoteknolojinin temel başarılarından biridir [Goodsell, 2004]. Antikor kullanılarak geliştirilen sensörler imünosensörler olarak da adlandırılır. İmünosensörler antikora bağlanan analitlerin (antijen) algılanması esasına dayanır [Liu and Saltman, 1996].

### **2.1.2 Reseptör Olarak Enzim Kullanılması**

Enzimler biyolojik reaksiyonları katalize eden özel proteinlerdir. Bir katalizör kimyasal reaksiyonların hızını artırır. Enzimler substratları ürüne dönüştürme hızını artırırken aynı zamanda her bir enzim özel bir ürünü tanımlar. Enzimler yüksek seçiciliğe sahip biyokatalizörlerdir. Genellikle bir enzim bir reaksiyonu katalize eder.

Enzimlerin katalizleme prensibi, kimyasal reaksiyonların katalizlenmesiyle benzerdir. Enzimler ürün oluşturma hızını aktivasyon enerjisini düşürerek hızlandırırlar. Aktivasyon enerjisindeki değişim ise enzimler ürün oluşturacak substratlarla etkileşime girip subtratları stabilize ettiğinde başarılı olmuş olur. Aktivasyon enerjisindeki düşüş yeterli aktivasyon enerjisine sahip olan molekül sayısını arttırır (Şekil 2.3).

Substratların enzimlere nasıl bağlandığını açıklayan iki ana teori bulunmaktadır. Bunlardan ilki anahtar-kilit (lock and key model) teorisidir. Bu teoriye göre enzim üzerinde substrat için bağlanma bölgeleri sabit (değişmez) biçimlidirler ve yalnızca özel şekilli bileşikler bu biçime uyar. Burada enzimi bir kilit olarak düşünürsek sadece buna uygun anahtar yani substrat uygun kontağı oluşturur. Diğer bir teori de enzimin biçimlendirilebileceğini öne süren alternatif bir teoridir. Substratın enzime bağlanmasından sonra enzim şeklinin değişmesi ve kararlı iki elemanlı kompleks bir yapının oluşmasıdır (induced fit theory) [Weiner, 2006 ].

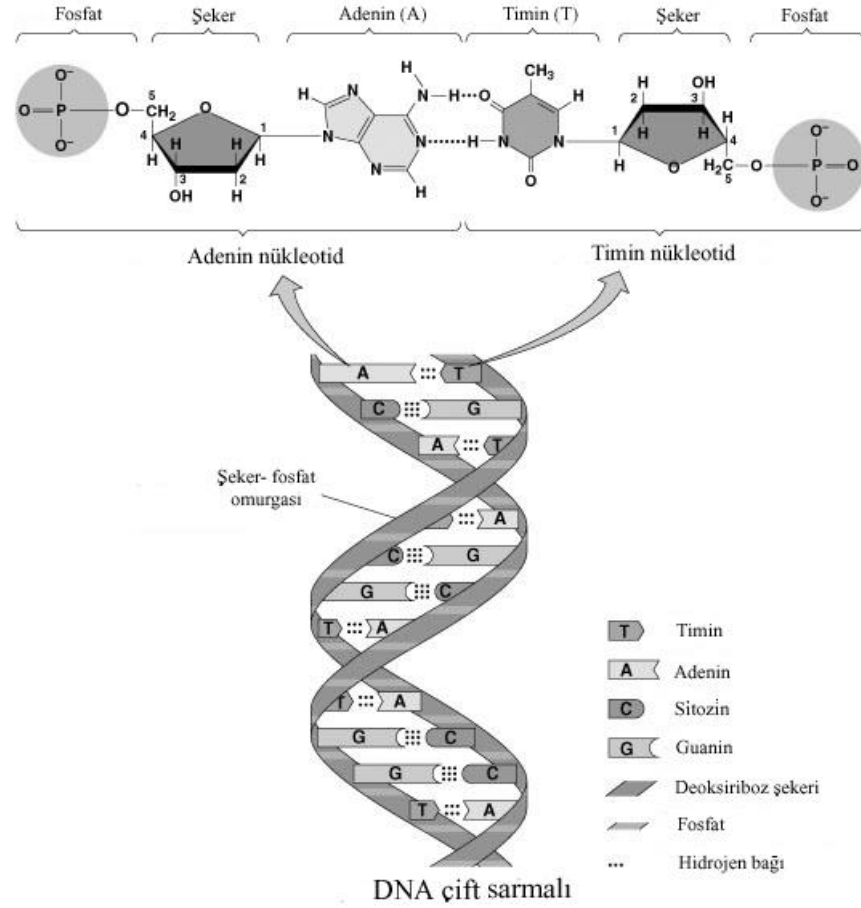


**Şekil 2.3** Enzimli ve enzimsiz reaksiyonların enerji diyagramı

[[http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Carbonic\\_anhydrase\\_reaction\\_in\\_tissue.svg](http://tr.wikipedia.org/wiki/Dosya:Carbonic_anhydrase_reaction_in_tissue.svg)].

### 2.1.3 Reseptör Olarak DNA Kullanılması

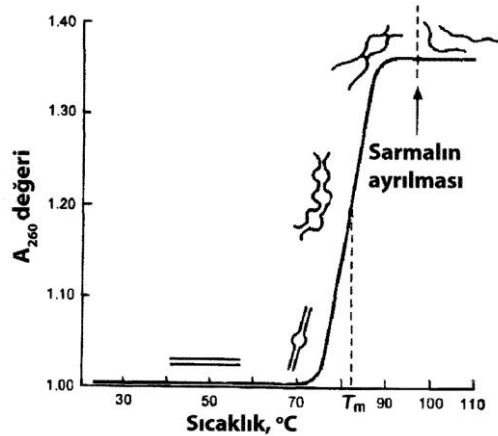
Hücrenin kromozomu (genom) nükleik asit ve histon olarak bilinen pozitif yüklü bir proteinden oluşur. DNA, bir eksen ve birbiri etrafına sarılarak çift sarmal (double helix) meydana getiren, iki DNA sırasından oluşan büyük bir moleküldür. DNA' yı oluşturan çift sarmalın her sırası "nükleotid" birimlerinin peşpeşe dizilmesi ile polinükleotid olarak oluşmaktadır. Her bir DNA yapı bloğu 5 karbonlu pentoz şekeri (deoksiriboz), fosfat molekülü ve azot ihtiva eden kapalı halka yapısında pürin ve pirimidin bazlarından ibaret bir nükleotiddir. Pürin bazları Adenin (A) ve Guanin (G) dokuz atomdan oluşan iki adet karbon-azot halkası ihtiva ederken, Primidin bazları Timin (T) ve Sitozin (C) altı atomdan oluşan bir adet karbon-azot halkasından ibarettir. Nükleotidler şeker-fosfat omurgası oluşumu için kovalent fosfodiester bağlarıyla birbirlerine bağlanırlar. Tüm hücrelerin DNA' ları birbirinin tamamlayıcısı olan 2 nükleotid zincirinin oluşturduğu bir helikal yapıdan oluşur. Negatif yüklü şeker-fosfat iskeleti DNA molekülünün dışında, bazlar ise heliksin merkezinde yer almaktadır. Diğer bir ifade ile hidrofilik karakterde olan şeker-fosfat omurgası helikal yapının dış kısmında, hidrofobik bazlar ise helikal yapının iç kısmında yer almaktadır. DNA' yı oluşturan iki ipliğin arası sabit olup (yaklaşık 2 nm) H bağları ile bağlanmıştır (Şekil 2.4) [Dilsiz, 2004][Villey et al., 1989]. İki ipliğin arasındaki merdiven basamaklarında gelişigüzel bir sıralanma yoktur; her zaman Guanin (G), Sitozinin (C); Adenin (A), Timinin (T) karşısına gelir. Hem pürin (adenin ve guanin) ile pirimidinler (sitozin ile timin) arasındaki hidrojen bağları, hem de diğer bağlar, meydana gelen heliksin düzgün olmasını sağlar. Bazların konumları sarmalın eksenine dik durumdadır. Birbirine komşu baz çiftlerinin dönümleri arasındaki uzaklık 3,4 Å' dur. Ayrıca her baz çifti komşusuna 36°' lik açı yapacak şekilde yerleşmiştir. Buna göre, yaklaşık 10 baz çifti 360°' lik tam bir dönüşü tamamlayacağından, her dönüşün boyu 34Å' dur.



**Şekil 2.4** DNA molekülünün yapısı.

DNA'nın iki zinciri, birbirine sadece H bağları ve hidrofobik etkileşimlerle bağlı olduklarından, nükleotidleri arasındaki kovalent bağlarda herhangi bir kopma olmaksızın çözülebilirler (denatürasyon). Denatürasyon olarak adlandırılan bu çözülme DNA'nın bazı fiziksel özelliklerinde değişmelere neden olur. Bunlardan biri molekülün UV-ışığı absorbe etme derecesinin değişimidir. Nükleotidlerin heterosiklik halkaları 260 nm dalga boyundaki UV-ışıkta maksimum absorpsiyon yaparlar. DNA zincirlerinde bazlar arasındaki H bağlarının kopması absorpsiyon derecesinde yükselmeye yol açar. Bir DNA çözeltisinin ısıtılması esnasında değişen sıcaklıklarda DNA'nın 260 nm dalga boyunda absorbe ettiği ultraviyole ışık ölçülürse, Şekil 2.5' de gösterilen erime eğrisi elde edilir. Şekilde ayrıca erime eğrisinin farklı bölgelerinde DNA molekülünün durumu gösterilmektedir. Artış başlamadan önce, molekül tümü ile çift sarmaldır. Artış bölgesinde, molekülün çeşitli kısımlarındaki baz çiftleri ayrılmaktadır. Ayrılan baz çifti sayısı, sıcaklık artışı

ile artmaktadır. 260 nm' deki absorbans artışının yarısının tamamlandığı sıcaklık erime sıcaklığı ( $T_m$ ) olarak adlandırılmaktadır.  $T_m$  sarmalın kararlılığı konusunda önemli bir ölçüm parametresi sağlar.  $T_m$ , GC baz çifti oranına bağlıdır. DNA molekülü ne kadar çok GC baz çiftine sahipse iki ipliğin ayrılması için gereken enerjide o denli fazla olmaktadır.



Şekil 2.5 Erime sıcaklığı ( $T_m$ ) eğrisi.

Aynı şekilde çözülmüş molekülün zincirleri tamamlayıcı bazları arasında H bağlarının oluşumu ile birleşip sarmal yapıyı yeniden oluşturabilir (renatürasyon) [Temizkan, 1999]. Çift sarmalın renatürasyonu, DNA'nın denatürasyonu sonucu ortadan kalkan tüm orijinal özellikleri yeniden oluşturur. Farklı türlerden veya aynı türe ait farklı örneklerden nükleik asitlerin dahil olduğu reaksiyon genellikle hibridizasyon olarak tanımlanır [Bal ve Karataş, 2007; Temizkan, 1999]. Bu özellikleri nedeniyle, DNA molekülü biyosensör algılayıcıları için gerekli tüm özelliklere sahiptir denilebilir [Alberts et al., 2002; İnanç, 2008].

DNA tabanlı biyosensörler, yüzeyde biyolojik olarak aktif tabakada moleküler algılama elemanı olarak tutuklanmış DNA'yı içeren ve temelde elektrokimyasal, optik, pizelektrik dönüştürücüleri kullanarak DNA ile bağlanma prosesini ölçen cihazlardır. Bir DNA hibridizasyon biyosensörünün çalışma prensibi, katı destek (dönüştürücü) üzerine tutuklanmış belli tek zincir DNA (single strand DNA, ssDNA)

dizileriyle (prob), analit içerisinde eşlenik olan ssDNA (hedef) dizilerinin eşleşmesine dayanır. DNA dizilerini, özgül ve seçici olarak belirleyebilme kabiliyeti, bir DNA biyosensöründe aranan en önemli özelliktir [Brett, 2005].

### 2.1.3.1 Katı Yüzeyler Üzerinde DNA Tutuklanması ve Hibridizasyonu

Katı yüzeyler üzerine DNA tutuklanması ve hibridizasyonu, ilk olarak membranlar üzerine 1970'lerde geliştirilmiştir. Uygulama alanı ne olursa olsun, bir biyosensör cihazının en bilinen yönü yüzeyde sınırlandırılmış fizyokimyasal prosesin çevrilebilir bir sinyale dönüşmesidir. DNA biyosensörlerinde cihazın dönüştürücü elementi, katı ara yüzeylerdeki tek ve çift zincirli oligonükleotidler arasındaki farkı ayırt eder. Yüksek derecede duyarlılığı sağlamak ve maksimum hibridizasyon verimliliği için optimum şartların tanımlanması çözülmesi gereken bir meseledir. 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:

- i. Yüzeyle sınırlandırılmış probun karakterizasyonu; probun çevre koşullarının tanımlanması, bağlanma metodu ve yüzey yapısı,
- ii. Yüzeye tutundurulmuş prob oligonükleotidlerle sıvı fazdaki hedef oligonükleotidler arasındaki etkileşimleri tanımlayan hibridizasyon şartları.

İki eşlenik olan zincir arasındaki rastgele çarpışma, katı yüzey üzerinde gerçekleşen hibridizasyon için temel bir gerekliliktir. Çarpışma olasılığı veya sıklığı 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.

Nükleotid çiftinin yapısı birbirine geçmiş iki antiparalel molekül görünümündedir. Üç boyutlu yapı tek başına zayıf ancak hep birlikte güçlü olan ve çift sarmal yapı içinde molekülleri kararlı halde tutabilen bir dizi zayıf etkileşimle sağlanır. Bu etkileşimler hidrojen bağları, hidrofobik, elektrostatik, van der Waals ve dipol etkileşimleridir. Hibridizasyon, sıkı paket sarmal eğri yapısını oluşturmak üzere bu etkileşimlerin oluşumunu içerir.

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

#### **2.1.3.1.1 Hibridizasyon Verimliliği ve Hassasiyeti**

Sıvı ortamda iki eşlenik olan nükleik asit zincirinin hibridizasyon prosesi, iki molekül arasında özgül bir etkileşim olup, çözelti içinde homojen şekilde olur. Yüzey hibridizasyonunda ise bu proses özgül bir adsorpsiyon prosesidir. Temelde aynı etkileşimler meydana gelir, fakat farklı karakterize edilebilir.

Hibridizasyon verimliliği, optimum hibridizasyon koşullarında yüzeyde eşlenik zincirlerle hibridize olan prob oligonükleotidlerin oranının bir ölçüsüdür. Hibridizasyon hızı ise hedef zincirlerin yüzeye akış hızıdır.

### **2.1.3.1.2 Prob Oligonükleotidin Yapı ve Dinamiği**

Her ne kadar çift zincirli DNA'nın yapısı çok iyi çalışılmış olsa da, özellikle katı yüzey üzerindeki tek zincirli DNA çok az tanımlanmıştır. Olayı çekici kılan şudur ki katı yüzey üzerine konmuş prob tek zincir oligonükleotidlerin, ayakta dümdüz eşlenik olan hedef tek zincir oligonükleotidle hibridizasyon için hazır bulunmasıdır. Gerçekte prob yapısı ve yüzey yoğunluğunun, yüzeydeki miktarının çok küçük olması nedeniyle karakterizasyonu zordur. Yüzeydeki prob yapısı, yüzey yükü, hidrofobiklik, prob tutuklanma metodu, fizikokimyasal ve kimyasal koşullar gibi çok sayıda parametreye bağlıdır.

#### **2.1.3.1.2.1 Prob' un Yüzey Konsantrasyonu**

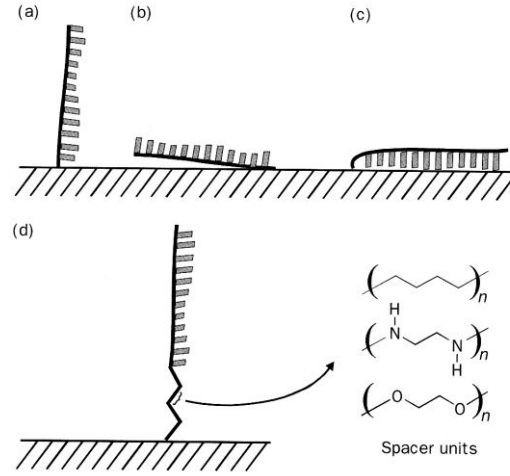
Yüzeyde oligonükleotidlerin yüksek yüzey paketlenmesi sonucunda hibridizasyondaki siterik engel, hibridizasyon verimliliği üzerine direk bir etkiye sahiptir. Bu nedenle yüzey konsantrasyonunun dikkatli bir şekilde kontrolü, uygun hibridizasyon verimliliği ve ölçüm limiti için özellikle önemlidir.

Göz önünde bulundurulması gereken diğer bir faktör ise yakın komşu hibridizasyonları etkileyebilen hedef zincir uzunluklarındaki farklılıklardır. Hedef zincir, prob' tan daha küçük olduğunda, hibridizasyon hızı uzunluktaki farklılıkla doğru orantılı olarak artacaktır. Hedef zincir uzadıkça, hibridizasyon hızı azalır.

#### **2.1.3.1.2.2 Prob Uzunluğu ve Oryantasyonu**

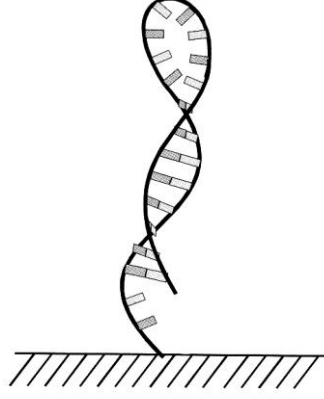
Prob' un çözelti içindeki kullanılabilirliği hibridizasyonun hem hızı hem de verimliliği üzerine direk etkilidir. Probun uzunluğu ve sahip olduğu ara grup (spacer) ikincil yapıyı belirler. Prob molekülünün oryantasyonu da desteklenen

yüzey özelliklerine bağlıdır (Şekil 2.6). Oligonükleotidin ara bir grup ile yüzeye bağlanması en yakın komşu sterik etkileri azaltır ve hibridizasyon verimliliğini iyileştirir. Ara grubun, uzunluk ve özellikleri (yük, hidrofobiklik, esneklik) önemlidir ve prob tabakasının yapısını etkiler. Glikoller ve amino tabanlı ara gruplar, suda daha çok çözünürlük ve farklı uzunluk ve uçlu (terminal) reaktif gruplarla kullanılabilirler.



**Şekil 2.6** Yüzeye bağlı tek zincirli oligonükleotidlerin şematik gösterimi: (a) çözeltideki uzaması, (b) yüzeye yüklü fosfat omurgasının etkileşimi, (c) yüzeye bazların etkileşimi, (d) ara gruplar yoluyla bağlanması.

8-10 bazdan daha az uzunlukta tek zincirli oligonükleotidler için moleküller zayıf ikincil yapı göstereceklerdir. 11 nükleotidden daha uzun oligonükleotidler kendi üzerine kıvrılabilir ve saç tokası (hairpin) şeklini alabilir (Şekil 2.7). Böyle saç tokası yapısının meydana gelmesi çözeltideki probun kullanılabilirliğini azaltır ve hibridizasyon verimliliğini düşürür. Saç tokası yapısının, sıcaklık uygulamasıyla veya formaldehid gibi denatürasyon ajanları ilave edilmesiyle kolaylıkla kararlılığı bozulabilir [Caruana, 2004].



**Şekil 2.7** Saç tokası şeklini almış bir prob oligonükleotidin şematik gösterimi.

Yüzeyin fizikokimyasal doğası (hidrofob, yük, elektrik potansiyel v.b.), probun yapısını etkileyecektir. Yüzey ile oligonükleotidin negatif yüklü omurgası arasındaki elektrostatik kuvvetler molekülün yapısına etki eder. Negatif yüklü yüzeyler, oligonükleotidleri yüzeyden iterken, pozitif yüklü yüzeyler, fosfat gruplarıyla bağlantıya geçerek, oligonükleotidin yatay konuma gelmesine neden olur [Lemeshko et al., 2001]. Hidrofobik yüzeyler, oligonükleotitlerin bazlarıyla etkileşime girerek, oligoları hibridizasyon için uygun olmayan bir konuma getirir (Şekil 2.7) [Chan et al.,1998].

### 2.1.3.1.3 Hibridizasyon Şartları

Hibritleşme reaksiyonunun çözeltideki kinetiği ikinci mertebe hız denklemi (second order rate equation) ile ifade edilir. Katı yüzey üzerindeki hibridizasyon kinetiğini ise deneysel olarak gerçek zamanlı izlemek oldukça zordur. Yine de hibridizasyon şartlarının ayarlanmasıyla optimum hibridizasyon verimliliği ve kararlılığı elde edilir. Hibritleşme kararlılığı ve verimliliği ortam sıcaklığına, baz çifti uyumsuzluğu sayısına, iyonik güce, rastgele adsorpsiyona ve kütle taşınımına bağlıdır [Caruana, 2004].

### 2.1.3.1.3.1 Sıcaklık

Hibridizasyonda en önemli parametrelerden birisi sıcaklıktır. Hibridizasyon sıcaklığı, erime sıcaklığına ( $T_m$ ) göre belirlenir. Oligonükleotidin erime sıcaklığı  $T_m$ , baz uzunluğu ve tuz konsantrasyonuna aşağıdaki Eşitlik 2.1' e göre bağlıdır:

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G + C) - 600/L \quad (2.1)$$

(%G+C: oligonükleotidin G ve C içeriği, L: baz çiftinin uzunluğu)

Çözelti içinde, hibridizasyonun maksimum hızına  $T_m$ ' in yaklaşık 20-25 °C altında ulaşılır. Sıcaklık  $T_m$ ' e yaklaştıkça hibridizasyon hızında azalmayla hibridler ayrılmaya başlar. Her ne kadar yüzeye bağlı hibridizasyon hızı üzerine detaylı olarak çalışılmış olmasa da, benzer şekilde davrandığı düşünülmektedir [Caruana, 2004].

### 2.1.3.1.3.2 İyonik Kuvvet

İyonik kuvvet, hibridlerin kararlılığını, oluşma hızını ve yüzeye bağlı prob moleküllerin etkileşimlerini etkiler. Yüksek iyonik kuvvet, hibridlerin kararlılığını düzenler 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 tutuklanması sağlanır [Caruana, 2004].

### 2.1.3.1.3.3 Baz Uyuşmazlığı

Oligonükleotid hibritlerinin ayrışmalarından sonra tekrar bir araya gelmeleri için bazların tekrar eşleniklerinin karşısına gelmeleri ve hidrojen bağları oluşturmaları gerekmektedir. Bazlar tamamen eşlenik olmadıkları zaman da hibritleşme oluşabilir. Bu da baz çifti uyuşmazlığına yol açabilir. Yeniden birleşme olayının derecesi, bu uyuşmazlıkların sayısı ve çeşidine bağlıdır. Yeniden birleşme ile oluşan hibritleşmiş oligonükleotid dizilerinin kararlılığı aşağıdaki etkenlere bağlıdır:

- Molekülün orta kısmında oluşan bir uyuşmazlık, kenarlarda oluşacak bir uyuşmazlığa göre daha düşük bir kararlılığa yol açacaktır.
- Molekül uzunluğunun bir yüzdesi olarak ifade edilen uyuşmazlık sayısı oluşan çift zincir molekülün kararlılığını etkiler. Birden fazla sayıdaki uyuşmazlıklar dağılmışsa, toplanmış haldeki uyuşmazlıklardan daha büyük bir kararsızlığa yol açarlar.
- Uyuşmazlık meydana getiren bazların çeşitleri de değişik kararsızlıklara yol açabilir.

Reseptör olarak oligonükleotid kullanan biyosensörlerin çoğunlukla tek baz uyuşmazlığını algılayabiliyor olması beklenir. Genel bir kural olarak, prob oligonükleotid uzunluğu azaldıkça tek baz uyuşmazlığının tespiti veya eşlenik-eşlenik olmayan oligonükleotid ayrımının yapılması kolaylaşır. Hibritleşmiş oligonükleotidlerde birbirinin eşleniği olmayan baz çiftleri bulunuyorsa bunların rastgele etkileşim (nonspecific interaction) sonucu ortaya çıkmış olduğu ve bu tür oluşumların engellenmesi gerektiği söylenebilir. Her %1' lik birbirinin eşleniği olmayan baz çifti içeren DNA çift sarmalının ergime sıcaklığı  $1\pm 0.5$  °C kadar azalır. Birbirinin eşleniği olmayan baz çifti içeren DNA çift sarmalının ergime sıcaklığı aşağıdaki Eşitlik 2.2' deki formülle bulunabilir:

$$T_m = 81.5 + 16.6(\log[\text{Na}^+]) + 0.41(\%G+C) - 600/L - (50 \times M/L) \quad (2.2)$$

Bu formülde  $M$  minimum eşlenik olmayan baz çifti sayısı,  $L$  toplam baz çifti sayısıdır [Caruana, 2004; Büyükaksoy, 2009].

#### 2.1.3.1.3.4 Kütle Taşınımı

Kütle taşınımının hibritleşme verimine etkisi en çok içinde analit oligonükleotidleri bulunduran bir çözelti akışı ile ölçüm yapan biyosensörlerde görülür. Hedef zincirin yüzeye bağlı eşlenik zincirle çarpışma olasılığı fiziksel olarak hedef zinciri içeren çözeltinin akış hızını arttırarak sağlanır. Kütle taşınımının hızı, hibridizasyon hücrelerini karıştırarak veya sallayarak da arttırılabilir. Hibritleşme sırasında yüzeye doğru difüzyon ile beraber yüzey boyunca difüzyon da meydana gelir. Bu yüzden prob oligonükleotid yapışmış olan yüzey alanını arttırmak ya da analit ihtiva eden çözelti hacmini azaltmak analitin yüzeye doğru difüzyonunu arttıracaktır [Caruana, 2004; Büyükaksoy, 2009].

#### 2.1.3.1.3.5 Rastgele Yüzeye Yerleşme (Nonspecific Adsorption)

Rastgele yüzeye yerleşme (nonspecific adsorption) oranını azaltmak, yüksek sinyal/gürültü elde etmek için gereklidir. Oligonükleotide karşı hassas yüzey iki ayrı yapışma (yerleşme) konumundan meydana gelir. İlki oligonükleotid ile istenilen bağı yapan probdur. Diğeri de probun etrafındaki alandır. Bu alanda yüzeye istenilen yapışma oluşmaz. Burada meydana gelen yapışma rastgele yapışmadır. Yüzeye rastgele yapışma prob oligonükleotidlerin etrafındaki alanın yapısına, ortamın pH değerine, iyonik gücüne ve sıcaklığa bağlıdır. Biyosensör tasarımlarındaki amaç bu rastgele yapışmanın olmaması ve prob ile analitin istenilen biçimde birbirine yapışmasıdır [Caruana, 2004; Büyükaksoy, 2009].

## 2.2 Dönüştürücülere (Transducer) Göre Biyosensörlerin Gruplandırılması

Biyosensör uygulamalarında reseptörün analit ile etkileşimi birçok şekilde ölçülebilir. Dönüştürücüler başlıca dört ana grup altında toplanabilir:

### 2.2.1 Elektrokimyasal Dönüştürücüler

**i. Potansiyometrik (Potentiometric):** Genel anlamda bir çalışma ve referans elektrot arasındaki potansiyel farkının ölçümünü esas alır. Elektrot potansiyelinin belirlenmesi doğrudan analit konsantrasyonunu tanımlar.

[[www.scribd.com/doc/9380782/biyosensorler-2](http://www.scribd.com/doc/9380782/biyosensorler-2)].

**ii. Amperometrik (Amperometric):** Amperometri genel anlamda belli bir potansiyeldeki akım şiddetinin ölçümünü esas alır. Genellikle elektrokimyasal olarak aktif olmayan analitleri çalışan elektrot üzerinde okside veya redükte edilebilen ürünler haline katalitik olarak çevirebilen bir enzim sistemine dayanır. Amperometrik biyosensörlerde kullanılan enzimler genellikle oksijen-substrat reaksiyonunu katalizleyen oksidaz enzimleridir

[[www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html](http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html)].

**iii. Kondaktometrik (Conductometric):** Çoğu reaksiyon çözeltinin kompozisyonunda bir değişim içerir. Bu normalde, elektriksel olarak ölçülebilen, çözeltinin elektriksel iletkenliğinde bir değişimle sonuçlanır [Eggins, 2002].

**iv. FET- Tabanlı Sensörler:** Minyatürleştirme, silikon çip-tabanlı alan-etkili transistör (silicon chip-based field-effect transistor) üzerine elektrokimyasal dönüştürücülerden birinin yapılandırılmasıyla başarılabılır. Bu metot temelde potansiyometrik sensörlerle kullanılmıştır, fakat amperometrik veya kondaktometrik sensörlerle de kullanılabilir [Eggins, 2002].

### 2.2.2 Pizo-elektrik (Piezo-electric) Cihazlar

Bu cihazlar, bir kristal titreşiminden elektrik akımının üretimini içerirler. Titreşim frekansı, reaksiyondaki değişimle bağlantılı olan, yüzeydeki adsorplanan malzemenin kütesinden etkilenir. Yüzey akustik dalga (surface acoustic wave) cihazları bu tür sistemlerdir [Eggins, 2002].

### 2.2.3 Termal Sensörler

Tüm kimyasal ve biyokimyasal reaksiyonlar, sıcaklığın üretimini veya absorpsiyonunu içerir. Bu sıcaklık değişimi, hassas termistörlerle ölçülebilir ve buradan analizi yapılacak maddenin miktarıyla ilişkilendirilir [Eggins, 2002].

### 2.2.4 Optik Dönüştürücüler

Optik dönüştürücüler, daha büyük esnekliğe ve minyatürleştirmeye olanak sağladığından fiber optiklerin geliştirilmesiyle hayatımızda önemli bir yer almıştır. Kullanılan teknik, absorpsiyon spektroskopiyi, floresan spektroskopiyi, lüminesans spektroskopisini, içsel yansıma (internal reflection) spektroskopisini, yüzey plasmon (surface plasmon) spektroskopiyi ve ışık saçılmasını içerir [Eggins, 2002]. Optik biyosensör formatlarında analit molekülleri direk (işaretsiz, label-free) ya da dolaylı (işaretli, labeled) yollardan algılanabilir.

Optik sensörler, sapan manyetik alanlara ve elektrostatik engellere karşı duyarsız olduklarından pek çok hassas uygulama için uygundur. Optik sensör, bir ışık kaynağı, bir fotodetektör ve ışık kılavuzu cihazı (lensler, aynalar, optik fiberler gibi) olmak üzere en az üç elemana gereksinim duyar. Optik fiberler dışında ışığın

hedefe lenslerle odaklanması ve tekrar detektöre yansıtılmasıyla da geliştirilen cihazlar mevcuttur [Fraden, 2004].

Optik biyosensörler bir biyokimyasal etkileşimin dönüştürülmesi için optik özellikler kullanarak uygun bir dış sinyali oluşturan sensör cihazları olarak tanımlanır. Sensör yüzeyi üzerindeki biyokimyasal etkileşim dönüştürücünün (şiddet, faz, polarizasyon, v.b.) ışık karakteristiğini değiştirir. Biyoalgılama olayı absorpsiyon, floresan, luminesans veya kırılma indisi gibi farklı optik özelliklerin değişimiyle ölçülebilir.

Optik biyosensörlerin temeli optik dalga kılavuzudur (optical waveguide). Optik dalga kılavuzları, telekomünikasyon uygulamaları için geliştirilmesine rağmen mekanik kararlılıkları, değişken (flexible) şekilleri, gürültüden etkilenmemeleri ve uzun mesafelere kadar etkin ışık iletimi gibi özelliklerinden dolayı sensör uygulamalarında da iyi bir yer edinmiştir.

Optik biyosensörler klinik, endüstriyel kontrol prosesleri, veterinerlikle ilgili alanlar, gıda, çevresel izlemeler gibi çok geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bu uygulamalar için yüksek hassasiyette, hızlı cevap verebilen ve gerçek zamanlı ölçüm yapılabilecek kompakt bir sensöre ihtiyaç vardır. Bu özellikler optik sensörlerle başarılmıştır. Çünkü optik sensörler, gerçekte emisyon, absorpsiyon, floresan, refraktometri veya polarimetri temelli çok sayıda farklı tekniği içermektedir. Bu avantajlarının yanında küçültülebilir, sağlam, güvenilir olması, düşük enerji tüketimleri ve içerdiği optik elementlerin dizilimlerinin kolaylığı sebebiyle de tercih edilmektedirler.

Optik biyosensör formatlarında analit molekülleri doğrudan (direct; label-free, işaretli) ya da dolaylı (indirect; labelled, işaretli) yollardan algılanabilir. Doğrudan ölçüm metodu, floresan, radyoaktif maddeyle işaretleme veya enzim büyütme gibi dolaylı olarak ölçülen metottan daha hassas değildir. Fakat genellikle öncelikli numune hazırlamaya ihtiyaç yoktur. Gerçek zamanlı değerlendirmelerde kullanılabilir. Biyomolekül konsantrasyonu, bağlanma özellikleri ve kinetik sabitler

doğrudan ölçüm metoduyla hesaplanabilir. İlk işaretli (label-free) biyosensörler (doğrudan ölçen) (Biacore®) 1990 yılında ticaretleştirildiğinden beri, biyomoleküler etkileşimlerin analizinin yararlarıyla ilgili sayıları artarak giden pek çok yayın yapılmıştır.

Optik teknikler hızlı, yenilenebilir ve yüksek hassasiyete sahip yöntemlerdir. Fakat bazı durumlarda biyomoleküllerin kimyasal özelliklerini değiştirme ihtimali olan işaretler kullanılmasının gerekmesi bir dezavantajdır [Fan et al., 2008].

#### **2.2.4.1 Dolaylı (İşaretli, Labeled) Optik Algılama**

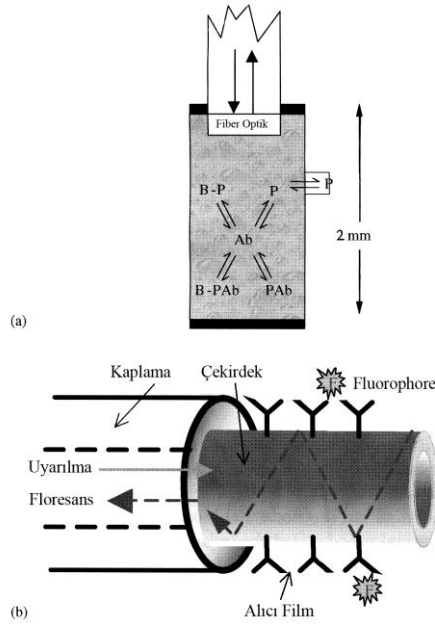
Dolaylı yoldan algılamada biyomolekül bir çeşit işaretle işaretlenir ve bu işaretin optik özelliklerde meydana getirdiği değişiklik ölçülür. Bu işaretleme hem hedef moleküle hem de biyoalgılayıcı elemente yapılabilir. İşaretlemede floresan boyalar gibi etiketler (tags) kullanılır. Floresanın şiddeti, hedef moleküllerin varlığını ve hedef moleküle biyoalgılayıcı element arasındaki güçlü etkileşimi gösterir. Her bir moleküldeki floresan sayısı kesin olarak kontrol edilemediği gibi etkilenmiş (bias) floresan sinyalinden dolayı miktar analizi yapmak zordur.

#### **2.2.4.2 Doğrudan (İşaretsiz, Label-Free) Optik Algılama**

Doğrudan optik algılama da hedef moleküllerine herhangi bir işaretleme veya değişiklik yapılmaz. Hedef moleküller doğal formlarında algılanır. Bu tip bir algılama uygulamada kolay ve ucuzdur. Ayrıca moleküler etkileşimlerin kinetik ve miktar ölçümlerine izin verir.

### 2.2.4.3 Fiber Optik (FO) Tabanlı Biyosensörler

Fiber optik tabanlı biyosensörler fiber tel boyunca ışığın iletimi temeline dayanır. FO tabanlı biyosensörler dıştan (extrinsic) ve içten (intrinsic) olmak üzere iki temel grupta sınıflandırılır (Şekil 2.8). Dıştan sensörler sadece giren ve çıkan ışığı esas alıp tek bir fiber kullanarak yapar. İçten sensörler sönen dalga ölçümüne dayanır.



**Şekil 2.8** Fiber Optik Biyosensör. (a) Dıştan: fiber optik, sensör alanına ve dışına ışık kılavuzluğunda kullanılır. (b) İçten: fiber optik kaplaması kaldırıldıktan sonra alıcı moleküller, fiber çekirdeği üzerine tutuklanır.

Dıştan teknikte ışık tutuklanmış tabakanın da olduğu FO boyunca hareket eder. Yansıyan, saçılan veya yayılan ışık numuneden ikinci fiberle veya ikiye ayrılmış orijinal fiberle geri döner. Yayılan ışık detektöre gelir. Böylece ilgili analitin konsantrasyonu ölçülür. En basit FO tabanlı biyosensör verilen dalga boyunu absorplayan analitin konsantrasyonundaki herhangi bir değişimi belirlemek için absorbans ölçümlerini kullanır. İşaret (label) kullanılarak floresan ölçümü yapmakta mümkündür (Şekil 2.8a).

İçten sensörlerde gittikçe incelen erimiş silis fiber kullanılır. Absorbans, luminesans, polarizasyon veya kırılma indis değişimleri ölçülür. Fakat direk ölçüm genellikle mümkün değildir. Floresan işareti kullanılarak rekabete dayalı konfigürasyonlar kullanılır (Şekil 2.8b).

FO tabanlı biyosensörler, optik dönüştürücülerin geliştirilmesi, daha iyi elektronikler ve tutuklanma metotlarının düzenlenmesiyle endüstriyel proseslerde, çevre izlemesinde, gıda prosesinde ve klinik uygulamalarda gittikçe artan kullanıma sahiptirler. FO tabanlı biyosensörler kolayca küçültülebilir ve farklı hedef bileşiklerinin belirlenmesi için entegre edilebilir. Bu da ticari FO tabanlı biyosensörlerin gelişmesini mümkün kılar [Lechuga, 2005].

#### **2.2.4.4 Yüzey Plasmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance, SPR) Tabanlı Biyosensörler**

Yüzey Plasmon Rezonansı, metal elektronlarının ışıkla etkileşimlerini içeren optik-elektriksel bir olaydır. SPR'ın optik-elektronik temeli bir metal yüzeyinde bir grup elektrona (plasmon) ışık fotonlarıyla enerji aktarımına dayanır.

SPR, makromoleküler etkileşimlerin incelenmesinde kullanılan bir yöntemdir. SPR tabanlı biyosensörler, sensör yüzeyindeki ve çözültideki moleküllerin etkileşimlerini, molekülleri işaretlemeye gerek kalmadan (kompleks oluşumu ve ayrılmaları) kırılma indisi değişimlerini ölçerek belirler. Etkileşimler gerçek zamanlı olarak görüntülenebilir ve bağlanan ligandın miktarı belirlenip ayrılma ve bağlanma sabitleri yüksek duyarlılıkla ölçülebilir. SPR yöntemi son yıllarda biyosensör uygulamalarında yerini almış, protein, oligonükleotid, faj, viral partiküller, hücreler gibi farklı biyolojik sistemlerdeki etkileşimleri çalışmak için kullanılmaktadır [Homola et al., 1999; İnanç, 2008].

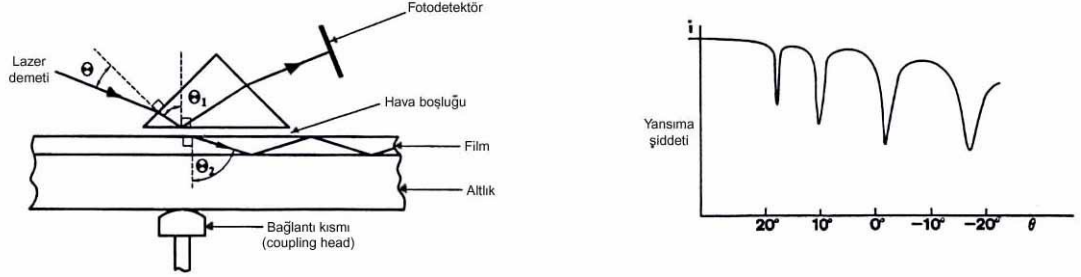
#### 2.2.4.4.1 Yüzey Plasmon Rezonansı (SPR)

Genellikle rezonans şartlarının başarılması için optik uyarılmanın iki yolu vardır. Bunlardan ilki prizma çiftleyici yapısında toplam yansıma ve diğeri de kafes kırınımında (diffraction gratings) kırılmadır. En çok kullanılanı kolay olmasından dolayı toplam yansımadır. Bu Kretschmann konfigürasyonu olarak adlandırılır. Tipik bir Yüzey Plasmon Rezonansı düzeneğinde, gelen ışık prizmanın iç yüzeyinden yansıtılır. Bu prizmanın dış yüzeyi ise ince metal bir filmle kaplıdır. Kritik bir açıda (rezonans açısı) yansıyan ışığın şiddeti dramatik bir şekilde düşer. Bunun nedeni de, bu yansıma sırasında meydana gelen sönen dalganın (evanescent wave) metal yüzeyinde elektronlarla rezonans yaratmasıdır. Işık şiddetinin dramatik düştüğü kritik açı metal yüzeyindeki malzemenin kırılma indisine bağlıdır [Büyükaksoy, 2009].

Metal filmin kalınlığı minimum yansıma değeri için kritiktir. Optimum kalınlık ışığın dalga boyuna ve sınır ortamın optik sabitlerine bağlıdır. Altın için optimum kalınlık, 790 nm dalga boyunda 45 nm' dir.

Rezonans açısı, plasmon alanının algılama mesafesi içerisinde metal yüzeye yakın ortamın kırılma indisi değişimlerine karşı çok hassastır. Malzemenin homojen değişimi (gaz gibi) veya kimyasal etkileşim gibi kırılma indisinin herhangi bir değişimi plasmon rezonans açısının açısal pozisyonundaki değişimle ölçülebilir. Tüm bu durumlarda SPR eğrisi daha yüksek açılara doğru değişir. Bu gerçek algılama uygulamaları için kullanılabilir. Genelde SPR sensörü belirli bir analit için işlevsel hale getirilmiş özel sensör yüzeyi kullanılarak biyospesifik etkileşimlerin ölçülmesi için oldukça yüksek özellikli bir biyosensöre dönüştürülebilir [Lechuga, 2005; Lawrence and Geddes, 1997; Liu et al., 2004].

### 2.2.4.4.2 Prizma Çiftleyici (Prism Coupler)



**Şekil 2.9** (a) Prizma Çiftleyicinin şematik gösterimi, (b) Yansıyan ışığın şiddeti ( $i$ )' ye karşı gelen açı ( $\theta$ )' nın grafiği.

Prizma çiftleyici dielektrik ve polimer filmlerin kırılma indisi ve film kalınlığını ölçmek için kullanılan bir cihazdır. Malzemenin kırılma indisi geçen elektromanyetik radyasyonun dalga boyuna bağlı olduğundan kırılma indisi bilinen bir prizmayla bağlantılı olarak monokromatik bir lazer kullanılır. Lazer ışını, prizmaya doğru yönlendirilir ve diğer taraftaki fotodetektöre yansıtılır. Ancak gelen açı  $\theta$ ' nın belirli değerlerinde ışın yansımaz fakat bunun yerine film tabanına doğru geçer. Bu açılar “mod açıları (mode angles)” olarak adlandırılır. Bilgisayar sürücülü dönen masa (rotary table) lazerin gelen açısıyla değişir. Bulunan ilk mod açısı kırılma indisini, bir moddan diğerine açı farklılığı da numune kalınlığını belirler [[http://en.wikipedia.org/wiki/Prism\\_coupler](http://en.wikipedia.org/wiki/Prism_coupler)].  $\theta$ ' nın mod açıları olarak adlandırılan belirli değerlerinde, fotonlar toplam içsel yansıma kriterini (total internal reflection criterion) bozarlar ve prizma tabanından hava boşluğuna doğru oradan da film içerisine geçerler ve optik yayılma moduna girerler. Bu da fotodetektöre çarpan ışığın şiddetinde ani düşüşe neden olur. Eğer fotodetektöre çarpan şiddet,  $\theta$  açısının bir fonksiyonu olarak çizilirse Şekil 2.9b' dekine benzer bir karakteristik elde edilecektir. Verilen altlık tipi için modların açılal yerleri sadece film kalınlığı ve indisine bağlıdır. Bundan dolayı iki mod açısı ölçülürse uygun bir bilgisayar algoritmasıyla film kalınlığı ve indisi hesaplanabilir.  $m$ . modu için (en soldaki mod  $m=0$  olduğu yer), özgün değer eşitliğini takiben, mod eşitliği olarak tarif edilen aşağıdaki Eşitlik 2.3 yazılır:

$$\left(\frac{2\pi}{\lambda}\right) * n \cos(\theta_2) * T + \psi_{10} + \psi_{12} = m\pi \quad (m = 0,1,2 \dots) \quad (2.3)$$

Formülde yer alan  $\lambda$  dalga boyunu,  $n$  filmin indisini,  $T$  film kalınlığını ve  $\psi_{10}$  ve  $\psi_{12}$ ' de sırasıyla film-hava ve film-altlık ara yüzeyindeki Fresnel faz değişimini göstermektedir. Yukarıdaki eşitlik sayısal olarak çözülmek zorunda olan oldukça karmaşık soyut (transcendental) bir eşitliktir. Fakat iki mod için eşitliğin simultane çözümü film kalınlığı ve indisini sağlamaktadır.

#### 2.2.4.4.2.1 Efektif İndeksin ( $\beta$ -Değeri) Tanımı

Her bir mod, çok iyi tanımlanmış prizma tabanına gelen açıyla karakterize edilirken,  $n_p$  indisine sahip prizmanın tabanına  $\theta_1$  açısıyla çarpan ışık için  $\beta$ -değeri basit olarak aşağıdaki Eşitlik 2.4' deki formülle tanımlanır:

$$\beta(\theta) = n_p \sin(\theta_1) \quad (2.4)$$

Genellikle herhangi bir ışık için  $\beta$ - değeri basitçe  $n \sin\theta$ ' dir. Burada  $n$  ışığın hareket ettiği ortamın indisi ve  $\theta$ ' da gelen açıdır. Snell's yasasıyla,

$$n_1 \sin(\theta_1) = n_2 \sin(\theta_2) \quad (2.5)$$

$\beta$ -değeri, ışık ışınının iki ortam arasındaki sınırda kırılmaya uğradığında korunur. Ayrıca fotonlar prizmanın tabanından film optik yayılma modu içerisine geçerken sanki prizma/film arayüzeyinde kırılır gibi davranır. Böylece Snell's

yasasına uyulur. Işık ışınının  $\beta$ -değeri prizma ve film arasında değişmez. Buna ek olarak, eğer prizmanın bağlantı (coupling) açısı biliniyorsa prizma giriş yüzeyine gelen herhangi bir açı için prizma tabanı üzerine ışığın gelme açısı kolaylıkla hesaplanabilir. Bundan dolayı herhangi bir mod için  $\beta$ -değeri, mod gözlenirken prizmanın giriş yüzeyine göre ışığın yaptığı açıdan hesaplanabilir.

$\beta$ -değeri çok önemlidir. Çünkü Fresnel faz değişimlerinin ( $\psi_{10}$  ve  $\psi_{12}$ ) hesaplanmasına imkân verir. Eğer iki  $\beta$ -değeri deneysel olarak hesaplanabilirse  $\psi_{10}$  ve  $\psi_{12}$  belirlenebilir ve özgün değer Eşitlik 2.3' de ince filmin kalınlık ve indisini belirlemede kullanılabilir. Bundan dolayı prizma çiftleyici tekniği film modları için  $\beta$ -değerinin ölçülmesinde bir metot sağlar. Sonra da mod eşitliği içerisinde bu değerlerin yerine konmasıyla kırılma indisi ve kalınlığın hesaplanmasına imkân tanır.

Ayrıca  $\beta$ -değerleri toplam içsel yansıma olduğu zaman ki belirlemelerde de gereklidir. Örneğin prizma tabanına ışık çarptığı zaman,  $\beta$ -değeri film indisi aşağısına düşene kadar Snell's yasasıyla komşu film içerisinde kırılmaya uğrayamaz ya da optik yayılma moduna geçemez. Bundan dolayı tüm film modları için  $\beta$ -değerleri film indisinden daha düşük olmak zorundadır. Buna ilaveten, daha yüksek indise sahip film üste gelecek şekilde çift film tabakası olduğu durumlar için  $\beta$ -değerleri alt tabakadaki düşük film indisinden yüksek olacağından ışık yüksek/düşük film arayüzeyinde bütünüyle yansıyacaktır. Benzer olarak daha düşük indise sahip altlık üzerinde tek bir film tabakası içinde altlık indisinden daha yüksek  $\beta$ -değerleri ile modlar film-altlık ara yüzeyinde bütünüyle yansıyacaktır.

Özet olarak,  $\beta$ -değerleri prizma çiftleyici tekniğiyle film parametrelerinin hesaplanmasına imkân tanıyan hammadelerdir. Herhangi bir mod için  $\beta$ -değerleri kolaylıkla Eşitlik 2.4' den bulunur. Sonuçta herhangi bir mod için  $\beta$ -değerleri film indisini aşamaz ve eğer bir mod için  $\beta$ -değeri altlık veya film indisinden daha yüksekse, ışık filmin daha düşük sınırında tam içsel yansımanın sonucu olarak filmde hapsolacaktır [Metricon, 2003].

#### 2.2.4.4.2.2 Prizma Çiftleyici ile Biyomoleküllerin Algılanması

Prizma çiftleyici cihazı daha öncede bahsedildiği gibi dielektrik filmlerin kırılma indislerini ölçer. Bu çalışmada ise sol-jel yöntemiyle elde edilen  $TiO_2-SiO_2$  ince filmler üzerine biyoalgılayıcı element olarak tutuklanan Prob DNA ve sonrasında Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu sonucunda meydana gelen kırılma indisi değişimleri, dönüştürücü olarak prizma çiftleyici cihazının kullanılmasıyla araştırılmıştır.

Buna benzer bir çalışma, dalgakılavuzu olarak kullandığımız  $TiO_2-SiO_2$  ince filmler yerine poroz silikon kullanılmasıyla daha önce Rong et al. ile De Tomassi et al. tarafından yapılmıştır [Rong et al., 2006; De Tomassi et al., 2006]. Bu çalışmalarda poroz silikon kullanılmasından dolayı DNA' nın tutuklanması da farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

### 2.3 Biyolojik Elemanların Tutuklanma (Immobilization) Yöntemleri

Biyosensörler ve pek çok biyoanalitik metotlar yüksek yoğunluklu fonksiyonel moleküllere, uzun dönemli kararlılığa ve dayanıma ihtiyaç duyarlar [Shriver-Lake, 1998]. Uygun bir biyosensörün yapılması için biyolojik elemanların dönüştürücü üzerine bağlanması gerekir. Bu proses tutuklanma olarak bilinir. Sensör yüzeyi üzerine alıcı molekülün tutuklanması sensör performansı için bir anahtar noktasıdır. Beş temel metot kullanılarak tutuklanma yapılır [Eggins, 2002]. Adsorpsiyon, yakalama (entrapment) ve kovalent bağlama katı yüzeyler üzerine biyomoleküllerin tutuklanmasında başlıca kullanılan tekniklerdir [Shriver-Lake, 1998]. Bu teknikler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

### 2.3.1 Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, fiziksel ve kimyasal adsorpsiyon olmak üzere ikiye ayrılır. Fiziksel adsorpsiyon, van der Waals bağlarının oluşumuyla, bazen de hidrojen bağlarıyla meydana gelirken, fiziksel adsorpsiyona göre çok daha kuvvetli olan kimyasal adsorpsiyon kovalent bağların oluşumuyla gerçekleşir. Yüzeğe adsorbe olan biyomalzeme pH, sıcaklık ve iyonik kuvvet değişimlerine karşı çok hassastır. Adsorpsiyonla oluşturulan bir biyosensörün ömrü yaklaşık 1 gündür.

### 2.3.2 Mikro Kapsülleme

Bu metotta biyomalzemenin dönüştürücü üzerine tutuklanması için inert bir membran kullanılır. Membran ile dönüştürücü ve biyomalzeme arasında yakın bir bağlantı sağlanır. Bu metot sıcaklık, pH, iyonik kuvvet ve kimyasal kompozisyon değişimlerine karşı kararlı haldedir. Mikro kapsülleme metoduyla oluşturulan bir biyosensörün ömrü 1 haftadır.

### 2.3.3 Yakalama (Entrapment)

Monomer bir çözeltiyle karıştırılan biyomalzeme polimerizasyonla jel içerisinde hapsedilir. Bu metodun içerdiği bazı problemler vardır. Bunlardan ilki büyük bariyerlerin meydana gelmesidir. Bu da altlığa difüzyonu engelleyerek reaksiyonu yavaşlatıp sensörün cevap verme zamanını da geciktirmiş olur. İkinci problem ise jeldeki porlara doğru biyoaktivite kaybının gözlenmesidir.

### 2.3.4 Çapraz Bağlama

Biyomalzemenin bifonksiyonel reaktifler kullanarak katı yüzeylere kimyasal olarak bağlanmasıdır. Limitli difüzyon ve biyomalzemenin zarar görmesi gibi bu

metodunda sınırlamaları vardır. Buna ilaveten sistemin mekanik kuvveti çok zayıftır. Fakat adsorbe olmuş biyomalzemelerin kararlılığı için gerekli bir metottur.

### 2.3.5 Kovalent Bağlama

Biyomalzeme içerisindeki fonksiyonel gruplarla dönüştürücü arasında olan kovalent bağlanmadır. Bu metot  $\text{NH}_2$ ,  $\text{CO}_2\text{H}$ ,  $\text{OH}$ ,  $\text{C}_6\text{H}_4\text{OH}$  ve  $\text{SH}$  gibi nükleofilik grupları kullanır. Bu metot kullanılarak oluşturulan biyosensörün ömrü 4–14 ay arasında değişmektedir [Eggins, 2002]. Biyomalzemelerin tutuklanmasında kovalent bağlanma tercih edilmektedir. Bu metotla tutuklanmış biyomoleküllerin yüksek yüzey yoğunlukları elde edilmiştir [Shriver-Lake, 1998].

Bağlama ajanları olarak organik fonksiyonel silanlar organik bileşikleri (proteinler) inorganik altlıklara (silika, kuartz, platinyum, vb.) bağlamak için kullanılır. Biyomolekülleri kovalent bağlamak ve silanize yüzeyler için pek çok yöntem vardır.

### 2.3.6 Silanizasyon

Pek çok sensör uygulaması için altlık malzemesi olarak erimiş (fused) silis, kuartz veya cam kullanılır. Spesifik olmayan protein adsorpsiyonu bu tür yüzeyler için bir problem oluşturmaktadır. Silanlar hem spesifik olmayan adsorpsiyonu azaltmak hem de kovalent bağlamada uygun kısımları sağlamak için yüzeyleri değiştirmede kullanılır. Pek çok altlık, silanların metoksi/etoksi ucuyla reaksiyona giren içerdikleri yüzey hidrosilleriyle değiştirilebilir. Silanların diğer sonu da biyomolekülleri veya çapraz bağlayıcıları bağlamada reaktif bir uç sağlar.

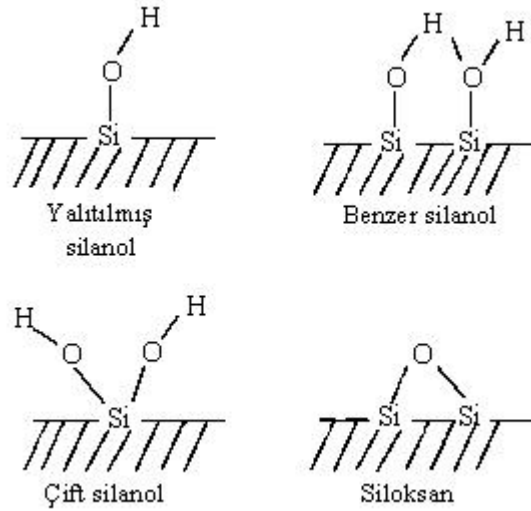
Biyomalzemelerin tutuklanması için üç temel silan bileşiği kullanılır. Bunlardan ilki ucunda tiyol grubuna sahip merkaptopropiltrimetoksisilandır. İkinci

silanda ucunda amin grubu bulunan aminopropiltrimetoksisilandır. En sonucusu ise epoksi ucu içeren glisidoksiopropiltrimetoksisilandır. Hangi silanın kullanılacağı biyomolekül üzerindeki reaktif grubun (amin, tiyol, karbonhidrat) seçimine ve çapraz bağlayıcıların tipine (homobifonksiyonel veya heterobifonksiyonel) göre belirlenir.

Altlıkların silanizasyonu için iki prosedür uygulanır. Bunlardan ilki sıvı faz metodu olarak bilinen silan çözeltisi içerisinde bekletmedir. Diğer prosedür ise altlık üzerine silanın gaz kaplamasıdır. Sıvı faz metodunda altlık su veya organik çözelti içinde %2–10 arasında bulunan silanlı çözeltiye yerleştirilir. Gaz kaplama metodunda ise silan gazının üretimi için silan içeren organik bir çözücünün geri akışı (reflux) gerekir.

### **2.3.6.1 Silanizasyonda Kullanılan Altlık Yüzeyleri**

Biyomalzemelerin etkili tutuklanması için reaktif hidroksil grupların üretiminde altlıkların temizlenmesi kritiktir. Silika yüzeyinde oluşabilen birkaç Si-OH grubu vardır. Bunlardan bir çift (geminal) ve yalıtılmış olanlar reaktif, benzer (vicinal) silanol ve siloksan grupları reaktif değildirler (Şekil 2.10). Eğer yüzey yağ, kir, deterjan gibi kalıntılardan temizlenmezse reaktif hidroksil grupları oluşmayacaktır. Bunun sonucunda da silan yüzeye uygun olarak kaplanmayacaktır. Yüzeyde düzgün olmayan bir silan tabakasının oluşmasının sebebi yüzeyin yetersiz temizlenmesi, silanın bozulması ve polimerizasyonudur.



**Şekil 2.10** Silika yüzeyinde oluşabilen Si-OH grupları.

### 2.3.6.2 Çapraz Bağlayıcılar

Homobifonksiyonel ve heterobifonksiyonel olmak üzere iki grup çapraz bağlayıcı vardır. Çapraz bağlayıcılar protein veya diğer molekülleri kovalent bağlayabilmek için iki reaktif gruba sahip moleküllerdir. Reaktif gruplar arasında köprüdürler. Heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcısında farklı özellikli iki ayrı fonksiyonele sahip reaktif gruplar vardır. Heterobifonksiyonel çapraz bağlama ile bağlanma seçici olarak kontrol edilebilir olup iki basamakta gerçekleşir. Diğer taraftan homobifonksiyonel çapraz bağlamada reaktif gruplar aynıdır. Bu tip bir çapraz bağlamada genellikle tek basamaklı bir prosedür uygulanır [Shriver-Lake, 1998].

### 3. SOL-JEL TEKNİĞİ

Sol-jel prosesleri camların ve seramiklerin tozsuz proseslerinde uzun zamandır kullanılmaktadır. Cam ve polimerler arasında yer alan sol-jel malzemeleri, biyotutuklanma için kullanılarak biyosensör malzemesi olarak yeni imkânlar sağlamıştır. Bundan dolayı antikor, DNA, RNA, antijenler, bitki ve hayvan hücreleri ve bakteriler bu metot kullanılarak çeşitli altlıklar üzerine bağlanmıştır. Temelde bu teknik iki basamaktan oluşur. İlk basamak ‘sol’ üretimi için sulu çözeltideki başlangıç maddelerinin (Al(III), Ti(IV), V(V), Sn(IV), silisli (IV) veya polisilisli (IV) esterler) hidrolizidir. Bunu takiben ikinci basamakta sulu oksit hidrojinin oluşumu için faz ekstraksiyonu ve polimerizasyonudur. Sol-jel sensör malzemeleri arasında pratik uygulamalarda en çok kullanılanlar, kimyasal olarak tepkimeye girmeyen, ısı, fotokimyasal ve yapısal kararlılığa ve mükemmel optik saydamlığa sahip olarak karakterize edilen camlardan türetilenlerdir [Andreescu et al., 2005].

‘Kolloid’ çok küçük parçalardan oluşan bir süspansiyondur. Parça boyutu çok küçük olduğunda (~1-1000nm) yerçekimi kuvvetleri ihmal edilebilir olup parçalar arası etkileşim kuvvetleri Van-der Waals çekimi ya da yüzey yükleri gibi kısa menzilli kuvvetlerdir. Dağıtılmış fazların eylemsizliği öyle küçüktür ki askıda kalan moleküller çarpışmalarından meydana gelen momentumla rastgele sürüklenirler. ‘Sol’ bir sıvı içerisindeki katı partiküllerin kolloidal süspansiyonudur. ‘Ayrosol’ ise bir gaz içerisinde partiküllerin kolloidal süspansiyonudur (Süspansiyon eğer partiküller sıvıysa ‘sis’ olarak eğer katı ise ‘duman’ olarak adlandırılabilir). ‘Emülsiyon’ diğer bir sıvıya dökülmüş sıvının süspansiyonudur. Kolloidlerin bu tüm tipleri, üretilen polimerler veya seramiklerden yapılabilen partiküllerde kullanılabilir.

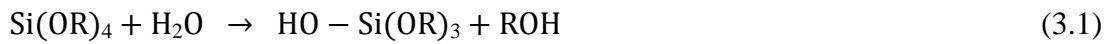
**Tablo 3.1** Kullanılan ligandlar.

Alkil		Alkoksi	
methyl	•CH <sub>3</sub>	methoxy	•OCH <sub>3</sub>
ethyl	•CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	ethoxy	•OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<i>n</i> -propyl	•CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -propoxy	•O(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<i>iso</i> -propyl	H <sub>3</sub> C(•C)HCH <sub>3</sub>	<i>iso</i> -propoxy	H <sub>3</sub> C(•O)CHCH <sub>3</sub>
<i>n</i> -butyl	•CH <sub>2</sub> (CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>n</i> -butoxy	•O(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> CH <sub>3</sub>
<i>sec</i> -butyl	H <sub>3</sub> C(•C)HCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	<i>sec</i> -butoxy	H <sub>3</sub> C(•O)CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>
<i>iso</i> -butyl	•CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	<i>iso</i> -butoxy	•OCH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<i>tert</i> -butyl	•C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>	<i>tert</i> -butoxy	•OC(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub>
Diğer			
acetylacetonate	$\text{H}_3\text{COC}(\bullet\text{O})\text{CH}_2(\text{O}\bullet)\text{COCH}_3$ <pre>       H       H       H                         H-C-O-C-C-C-O-C-H                               H       H       H            O       O                                 •       •           </pre>		
acetate	$\bullet\text{OOCCH}_3$ <pre>       H         H-C-C-O•                O           </pre>		

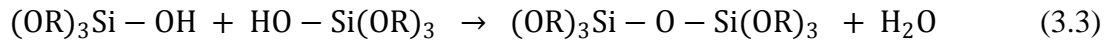
Sol-jel kaplama işleminde, metal veya metaloid elementlerden ibaret bir kolloidin hazırlanması için başlangıç çözeltileri değişik ligandlar (diğer metal veya metaloid atomları içermeyen ekler) ile çevrenir. Örneğin alüminyum oksit için başlangıç bileşikleri Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> gibi inorganik tuzlar (karbon içermeyen) veya Al(OC<sub>4</sub>H<sub>9</sub>)<sub>3</sub> gibi organik bileşikler içerir. Son zamanlardaki sol-jel araştırmalarında çok genişçe kullanılan başlangıç bileşiğinin sınıfı alkoksitlerdir. ‘Alkanlar’, ‘metan’ (CH<sub>4</sub>) ve ‘etan’ (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>) da ki gibi tekli bağla bağlanmış sadece karbon ve hidrojen içeren organik moleküllerdir. Genel formülleri (C<sub>n</sub>H<sub>2n+1</sub>)’ dir. ‘Alkil’ alkan molekülünün üretilmesinden bir hidrojenin kaldırılmasıyla elde edilen ligand formudur. Örnek olarak ‘metil’ (•CH<sub>3</sub>) veya ‘etil’ (•C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>) verilebilir. ‘Alkol’ metanol (CH<sub>3</sub>OH) veya etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)’ deki gibi alkil veya diğer moleküllere OH (hidroksil) grubunun ilavesiyle elde edilen molekül formudur. ‘Alkoksi’, metoksi (•OCH<sub>3</sub>) veya etoksi (•OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)’ deki gibi alkoldeki hidroksilden bir protonun kaldırılmasıyla elde edilen ligand formudur. Tablo 3.1’ de çok kullanılan ligand örnekleri verilmektedir.

Metal alkoksitler, bir metal veya metaloid atomuna bağlı organik liganda sahip, metalorganik bileşikleridir. Bu doğrultudaki çalışmaya örnek silikon tetraoksittir

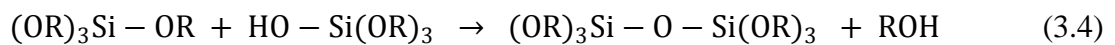
(veya tetraetoksilen veya tetraetil ortosilikat, TEOS,  $\text{Si}(\text{OC}_2\text{H}_5)_4$ ). Organometalik bileşikler, metal alkoksitlerdeki gibi metal-oksijen-karbon bağlantısı olmayan, direk metal-karbon bağlarına sahip olarak tanımlanırlar. Bundan dolayı alkoksitler organometalik bileşikler değildirler. Metalalkoksitler, su ile kolay reaksiyona girdiği için başlangıç çözeltilerinde yaygın olarak kullanılırlar. Bu reaksiyon sırasında bir hidroksil iyonu metal atomuna bağlı hale geldiğinden, reaksiyonun adı hidrolizdir. Aşağıdaki reaksiyonda alkoksitlerin hidroliz reaksiyonuna örnek olarak verilebilir:



R, bir proton veya diğer ligandları gösterir (eğer R alkilse, sonra  $\cdot\text{OR}$  alkoksi grubudur) ve ROH alkoldür. (-) işareti, kimyasal bağı göstermek için kullanılır. Hidroliz reaksiyonu mevcut katalistin ve suyun miktarına bağlı olarak sonuna kadar gidebilir (bunun sonucu OR grubunun tümü OH tarafından yer değiştirir) veya metal kısmi (partial) hidrolize uğrar  $[\text{Si}(\text{OR})_{4-n}(\text{OH})_n]$ . İnorganik başlangıç çözeltileri de hidrolize olabilirler.



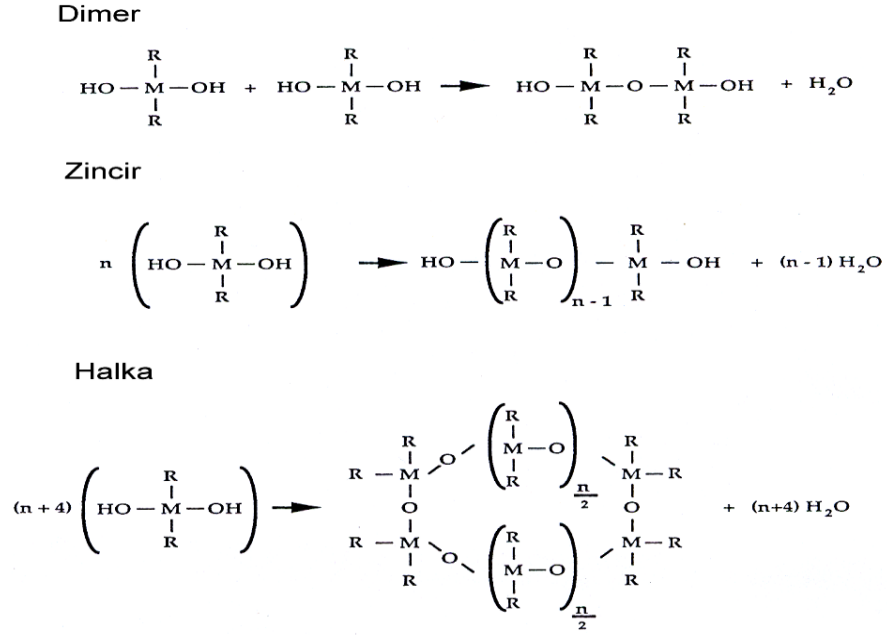
veya



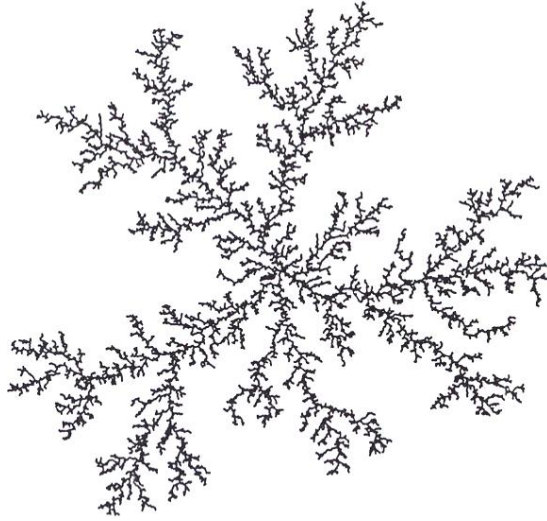
gibi iki kısmi hidrolize olmuş molekül yoğunlaştırma reaksiyonunda birlikte bağlanabilir (Eşitlik 3.3) (Eşitlik 3.4). Bu tanımlamayla yoğunlaşma, su veya alkol gibi küçük moleküllerin serbest bırakılmasıdır. Reaksiyonun bu tipi, polimerizasyon işlemiyle silikon içerikli daha büyük moleküller yaparak devam edebilir. ‘Polimer’ monomer olarak adlandırılan hücrelerin yüzlerce veya binlercesinin bağlanmasıyla geniş bir molekül olarak şekillenir. ‘Oligomer’ molekülün ara boyutudur. ‘Mono’ dan çok daha büyük fakat ‘makro’ dan çok daha küçüktür. Monomerlerin bağ yapabilme sayısına fonksiyonellik denir ve  $f$  ile gösterilir. Metal atomunu M ile gösterirsek, 4 ligand ile bağlanan  $MR_2(OH)_2$  bileşiğinde, ligandların ikisi reaktif olmayan R grubu, diğer ikisi reaktif olan hidroksil grubudur ( $f=2$ ). Bu tür bileşikler Şekil 3.1’ de gösterildiği gibi lineer halkalar veya zincirler şeklinde polimerize olabilir. Eğer  $f>2$  ise zincirler birbirinin içine geçen üç boyutlu yapı (crosslinking) oluşturabilir. Silikon alkoksitin polimerizasyonu sırasında kompleks dallanma olabilir (Şekil 3.2). Çünkü tamamen hidrolize olmuş monomer  $[Si(OH)_4]$  tetrafonksiyoneldir. Diğer taraftan su konsantrasyonun düşük olduğu durumlarda (dört ligandan daha az) yoğunlaşma olabilir ve genellikle bu durumda daha az sayıda dallanma meydana gelir.

Bir polimer üç boyutlu yapıda oluşabildiğinden katı maddelerle özdeşleştirebiliriz. Örneğin, elmas tetrafonksiyonel C monomerin bir polimeri olarak sayılabilir.

Eğer monomer ikiden daha çok bağ yapabilirse, şekillenebilen molekülün boyutları üzerinde hiçbir limit olmaz. Eğer bir molekül makroskobik boyutlara yaklaşırsa ve çözelti boyunca genişlerse, bu malzemeyi ‘jel’ olarak adlandırabiliriz. Başka bir deyişle jel, bir sıvı fazın içerisinde katı iskelet içeren maddedir.



**Şekil 3.1** İki fonksiyonel ( $f=2$ ) monomerle halka ve zincirlerin oluşumu; (a) dimer, (b) zincir, (c) halka.

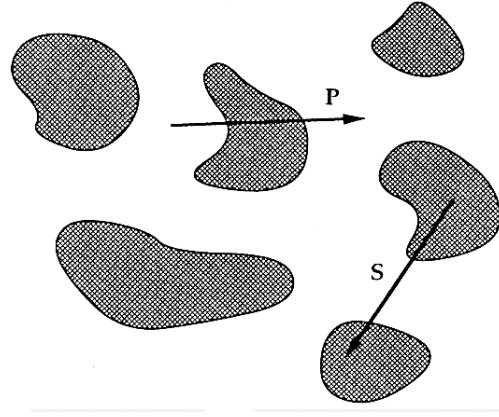


**Şekil 3.2** Çok fonksiyonel monomerin ( $f>2$ ) dallanmasıyla yapılan parça polimer.

Jelin elastisitesi katı yapının sürekliliği sonucu oluşur. Parçacıklar arası çekim kuvvetleri, parçacıkları birleştirerek bir ağ yapısının şekillenmesine sebep olduğunda jeller parçacıkların birleşmesiyle oluşan solları meydana gelebilir. Jellerde değişik bağ tipleri bulunur. Polimerik jeller, kovalent bağlıdır. Jelatinli jeller zincirlerin birbirine dolaşmasıyla oluşur. Partikül jeller van der Waals kuvvetleri tarafından

kurulur. Bağlar, partikül sistemlerindeki gibi tersinirdir (reversible) yada polimerik sistemlerdeki gibi kalıcıdır.

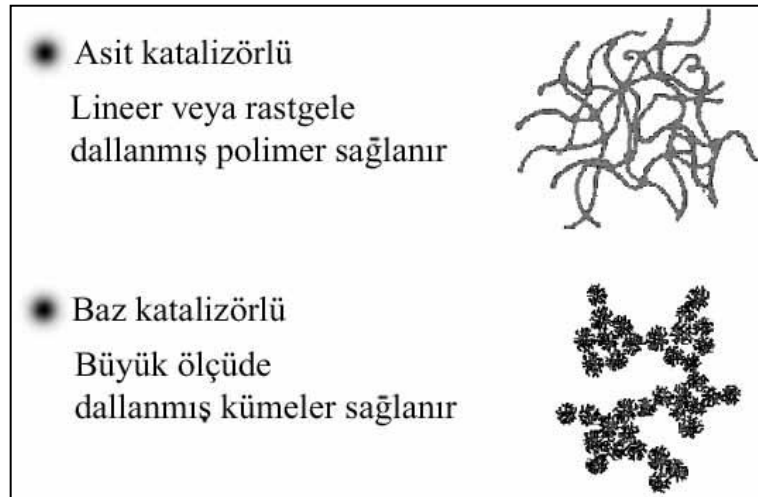
Henisch' e göre 'jel' sıvıya yaklaşan yarı katı özellikte iki elemanlı sistem olarak tanımlanmıştır. Aynı zamanda jel, kolloidal boyutlarda sürekli katı ve sıvı fazlardan meydana gelen malzeme olarak tanımlanabilir. Sürekli manası, numunenin bir tarafından diğer tarafa katı fazın içinden sıvı fazın içine geçmeden gidebilmesidir (Şekil 3.3).



**Şekil 3.3** Jel yapısının şematik gösterimi. P oku bir porda başlar ve bir katı fazın içinden geçerek farklı bir pora girer. S oku ise bir katı fazdan diğer bir katı faza geçer. Jeller kolloid ölçüsünde üç boyutlu bir yapı oldukları için bu oklar 1µm' den küçüktür.

Jel oluşumu topakların birbirine çarpacak kadar büyümesiyle başlar. Daha sonra bu topaklar kümeleşir ve kümeler birbirleriyle bağlanır. Jelleşme kalıp içerisine dökülen çözüldiden sonra meydana gelebilir. Bu şekilde arzu edilen şekillerde cisimler elde edilir. Eğer jelin en küçük boyutu birkaç milimetreden daha büyükse, nesne 'monolit' olarak adlandırılır. Alternatif olarak, jelleşme çözüldinin hızlı buharlaştırılmasıyla da üretilebilir. Bu şekilde fiberler veya filmler hazırlanabilir [Brinker and Scherer, 1990].

Özet olarak, sol-jel prosesi koloidal süspansiyonun oluşumuyla inorganik ağın gelişimini (sol) ve sürekli sıvı faz içerisinde ağın oluşumu için solün jelleşmesini içerir (gel). Bir sol-jel inorganik ağın özellik ve karakteristiği, hidroliz ve yoğunlaştırma reaksiyonlarının hızlarını etkileyen birkaç faktöre bağlıdır. Bu faktörlerden en önemli olanları pH, katalizörün niteliği ve konsantrasyonu,  $H_2O/Si$  mol oranı (R) ve sıcaklıktır. Bundan dolayı bu faktörlerin kontrolüyle çok geniş aralıklarda sol-jel’ den türetilmiş inorganik ağın yapı ve özelliklerini değiştirmek mümkündür. Sol-jel ile elde edilen silikon oksit ağı asit katalizörlü şartlar altındaysa lineer veya rastgele dallanmış polimerler sağlanır. Diğer taraftan baz katalizörlü şartlar altında elde edilen silikon ağı ise jelleşmeden önce birbirinin içine geçmemiş büyük ölçüde dallanmış kümeler üretir. Bundan dolayı ayrı kümeler halinde bulunurlar (Şekil 3.4) [<http://www.psrc.usm.edu/mauritz/solgel.html>].



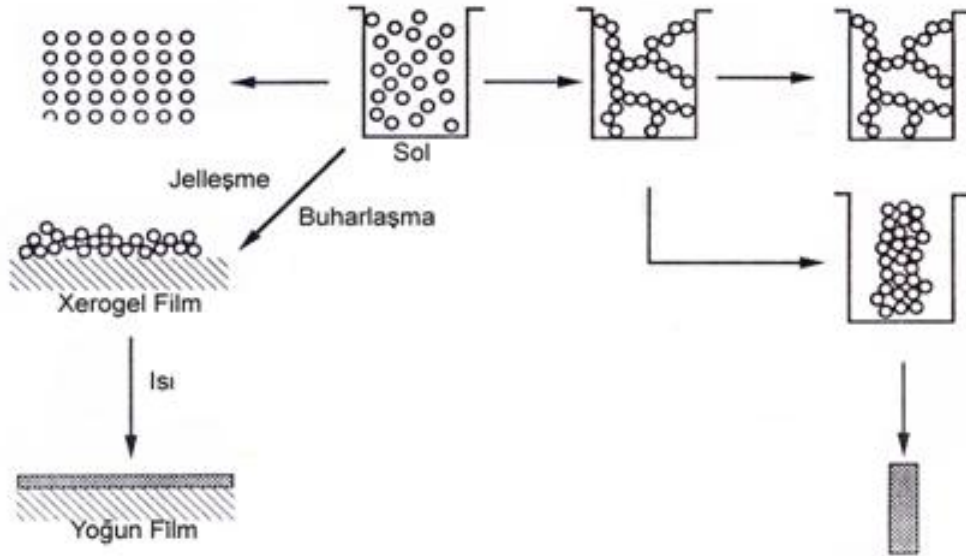
**Şekil 3.4** Sol-jel ile elde edilen silikon oksit ağı, asit ve baz katalizörlü şartlar altındaki durumu.

### 3.1 Film Oluşumu

Sol-jel kaplama işleminde, jelleşmeden önce daldırma, döndürme veya püskürtme ile hazırlanan ince filmler için sıvı sol veya çözelti kullanılır (Şekil 3.5).

Sol-jel ile film oluşumu, CVD, buharlaştırma veya püskürtme gibi geleneksel ince film oluşum işlemleriyle karşılaştırıldığında düşük maliyetli bir kaplama işlemidir. Ayrıca sol-jel kaplama işleminde por hacmi, por çapı, yüzey alanı gibi kaplanan filmlerin mikro yapısı kontrol edilebilir.

Daldırma veya 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 porozitesinin de kontrol altına alınmasını sağlar. Örneğin, por hacmi %0' dan %65' e, por boyutu  $<0.4 \text{ nm}'$  den  $> 5 \text{ nm}'$  ye ve yüzey alanı  $<1 \text{ m}^2/\text{g}'$  dan  $> 250 \text{ m}^2/\text{g}'$  a değiştirilebilir.

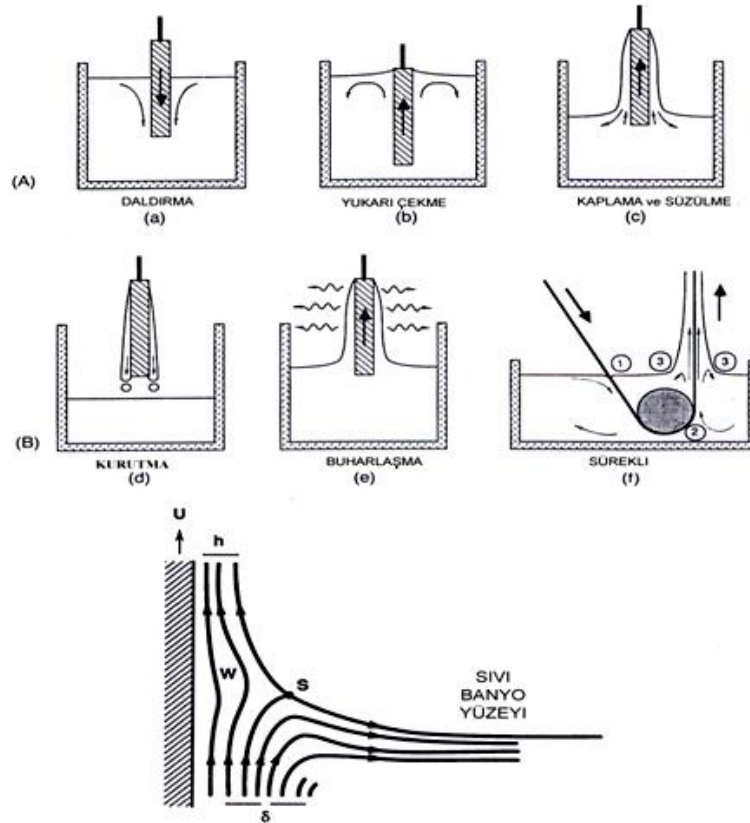


Şekil 3.5 Sol-jel yöntemiyle film oluşumu (sol taraf).

### 3.1.1 Film Oluşumunun Fiziği

#### 3.1.1.1 Daldırarak Kaplama

Daldırarak kaplama işlemi beş bölümde tanımlanır. Bunlar daldırma, başlama (start-up), kaplama, kurutma ve buharlaşmadır (Şekil 3.6). Alkol gibi uçucu çözücüler kullanıldığında buharlaşma, başlama, kaplama ve kurutma basamakları sırasında da meydana gelir. Şekil 3.6'de gösterildiği gibi sürekli daldırarak kaplama, işlemi kolaylaştırır. Çünkü başlama ve kurutma zamanını elimine eder.



**Şekil 3.6** (A) Daldırarak kaplama işleminin basamakları: (a-e) banyo; (f) sürekli. (B) sürekli işlemin 3 ile gösterilen alandaki sıvı akış noktalarının detayı. U çekme hızı, S durgunluk noktası,  $\delta$  bağılı tabaka ve h akışkan filmin kalınlığı.

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, aşağı ve yukarı doğru hareket eden tabakaların ayrodinamik 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 genişemesinin etkin kuvveti, (4) Kaplanan bölge sınırındaki sıvının eylemsizlik kuvveti, (5) Yüzey gerilim gradyanı, (6) Ayrışma ve birleştirme basıncı (1µm kalınlıktan daha düşük filmler için önemlidir), olarak tanımlanır [Brinker and Scherer, 1990].

### 3.2 Sol-Jel Tekniği ve Optik Biyosensörler

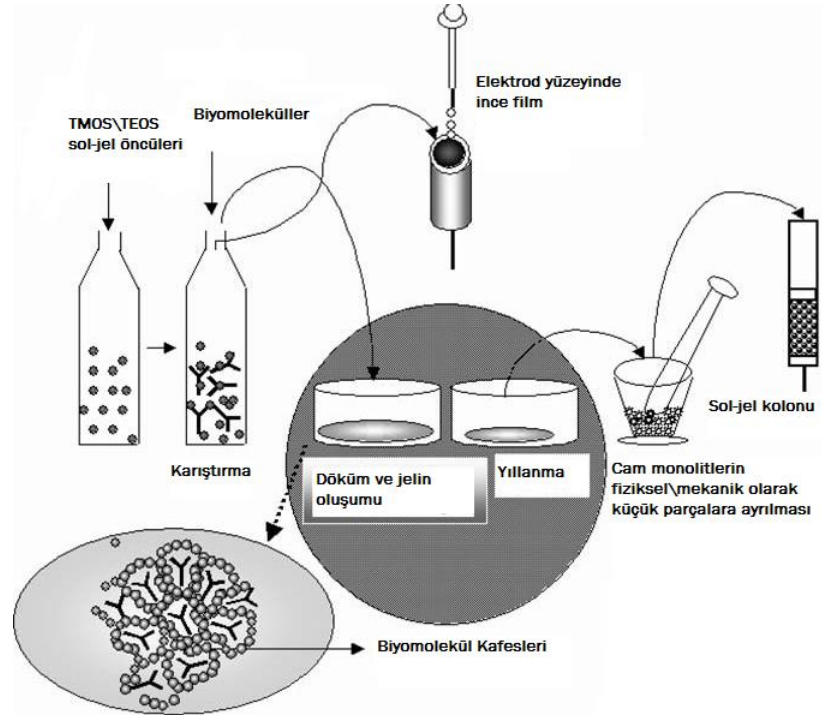
Katı fazdaki optik biyosensörler, aynı anda sahip olunması gereken pek çok özelliği bünyelerinde barındırmalıdır. Birinci ve en önemli özellik malzemenin, UV' den kızılötesine farklı dalga boylarında optik geçirgenliğe sahip olmasıdır. İkinci özellik ise malzemenin kimyasal olarak kararlı, reaksiyona girmeyen yapıda ve hem gaz hem de sıvılarda fonksiyona sahip olmasıdır. Malzeme biyomolekülle etkileşime girmemeli, analitlerin girişine izin vermelidir. Optik biyosensörlerde biyomolekülün katı destek üzerine tutuklanması, fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağ ve fiziksel tutundurma ile sağlanır. Tüm bu bahsedilen özelliklere sahip malzemenin geliştirilmesi sırasında çok sayıda problemle karşılaşılır [İnanç, 2008].

Son yıllarda, bu özellikleri karşılamak üzere sol-jel silika malzemeler geliştirilmiştir [Rickus et al., 2002]. Sol-jel teknolojisi kolaylığından ve çok yönlülüğünden dolayı optik sensör ve biyosensörlerin gelişmesinde artarak giden bir kullanıma sahiptir. 250 nm dalgaboyunun üzerindeki dalgaboylarında saydam (transparent) olabilirler. Bu özellik sol-jel malzemeleri optik uygulamalar için uygun

hale getirir [Jeronimo et al., 2007]. Cam ve polimer arasında bir yapıda olan sol-jel malzemelerin, biyomoleküllerin tutuklanmasına da uygun olduğu anlaşılmış, bu da biyosensör uygulamalarında yeni imkânlar sağlamıştır [Andreescu et al., 2005]. Sol-jel matrisler optik olarak geçirgen olduğundan tutuklanan biyolojik moleküllerin kimyasal etkileşimlerine ve bu etkileşimlerin gösterimine olanak sağlarlar. Biyomoleküllerin sol-jel içinde tutuklanması çalışmaları son yıllarda gittikçe artan yeni bir alandır [Gill and Ballesteros, 2000; Jin and Brennan, 2002]. Sol-jel yapıdaki katı matris 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 [Rickus 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 yapısıyla su ile dolu gözeneklere ev sahipliği yapar. En önemli özelliği ise yapısındaki gözeneklerin nano boyutlarda olmasıdır. İnorganik ağ içinde büyük biyomoleküller tutuklanabilirken küçük iyon ve moleküller bu ağ içine ve dışına difüze olabilirler (Şekil 3.7). Bu sayede tutuklanan biyomolekülün yakın çevresinde gelişen kimyasal değişimlere tepki vermesi mümkün olmaktadır [Rickus et al., 2002].

Sol-jel tekniğiyle başarıyla tutuklanan ilk biyomolekül enzimlerdir [Gill and Ballesteros, 2000]. Bunun dışında sol-jel malzemelerle hücrelerin ve bakterilerin tutuklanmasına çalışılmış ve çeşitli başarılar elde edilmiştir; bakteri [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 [Carturan et al., 1998]. Ayrıca, sol-jel matrislerin oluşturulmasında DNA' nın kalıp olarak kullanıldığı bir uygulamada olmuştur [Numata et al., 2004].



**Şekil 3.7** Sol-jel süreci.

Belirli nükleik asitlerin teşhisi için hibridizasyon testleri başta çok geniş araştırma alanları olmak üzere, sürekli klinik ve öngörü analizlerinde kullanılmaktadır. Buna karşın yeni biyosensör teknolojileri daha hızlı, düşük maliyetli ve DNA test edebilmesi şarttır. Sol-jel, biyosensörlerin üretilmesi bakımından uzun vadeli tekrar kullanılabilirliği, yüksek hassasiyeti ve düşük maliyetli bir yöntem olduğu için, sol-jel temelli optik biyosensörler, DNA tanısı için çok kullanışlı olabilirler. Bu avantajın bilinmesiyle birlikte, sol-jel tekniği kullanılarak üretilen yeni nesil biyosensörlerin tasarım, performans ve üretim optimizasyonu için geliştirilmeye ihtiyaç duyulmaktadır.

## 4. ESCHERİCHİA COLİ (E.COLİ)

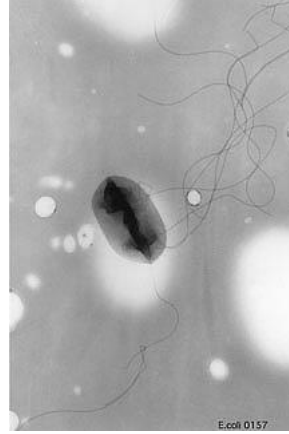
E.coli bütün dünyada üzerinde en çok çalışılan bakteri türlerinden biridir. İlk kez 1885 yılında Theodor Escherich tarafından izole edilmiştir. Enterobacteriaceae familyasının koliform grubu içinde yer alır. Koliform grup denince, aerob ve fakültatif anaerob, gram negatif, spor oluşturmeyen ve 35 °C’ de 48 saat içinde laktozdan gaz ve asit oluşturan tüm çubuk bakteriler anlaşılır. Koliform grubun içinde sadece E. Coli doğrudan bağırsak kökenlidir. Bu nedenle gıdalarda, içme ve kullanma sularında, deniz ve göllerde E. coli bulunmasına izin verilmez. Grubun diğer üyeleri doğal olarak toprakta bulunabilir.

E.coli farklı antijenik özellikleri ile çok sayıda suş (strain) ve serotipe ayrılmaktadır. Bazı suş ve serotipler insan ve hayvanlar için patojenite gösterir. İnsanlarda diyareye neden olan E.coli suşları 2. Dünya savaşından sonra ortaya çıkarılmıştır. Bugün insanlarda diyareye neden olan E.coli serotipleri patojenik, enteropatojenik, enterovirulent, diyarejenik serotipler olarak adlandırılmaktadır. Bu serotipler virülens özellikleri, patojenite mekanizması, klinik sendromlar ve O:H serotiplerine göre başlıca; enteropatojenik (EPEC), enterotoksijenik (ETEC), enteroinvaziv (EIEC), enterohemorajik (EHEC), difuz-adhering (DAEC), entero-agregativ (EAaggEC) olmak üzere 6 ana grup altında toplanmaktadırlar. EHEC olarak tanımlanan grubu başlıca E.coli O157:H7 serotipi oluşturur. EHEC izolatları çeşitli toksinler oluşturmakla birlikte bunlardan sadece birkaçı tanımlanabilmiştir. Diyareye neden olan en önemli E.coli serotipleri E.coli O157:H7 ve O126:H7’ dir. İlk kez 1955 yılında tanımlanmış olan hemolitik üremik sendrom (HUS) en fazla ölüme neden olan hastalıktır.

E.coli O157:H7 serotipi genel olarak Kuzey Amerika kıtası ülkelerinde daha sıklıkla görülmekle beraber, bugün 6 kıtada en az 16 ülkede giderek artan sayıda vakaya rastlandığı, genel olarak mayıs-ekim aylarında vaka sayısında artış olduğu, hastalığın 5 yaş ve daha altındaki çocuklar ile 65 ve daha yukarı yaşlılarda daha fazla görüldüğü bildirilmektedir. E. coli O157:H7 serotipinin kaynağı üzerinde farklı görüşler bulunmaktadır. Araştırma sonuçları bu bakterinin başta süt inekleri olmak

üzere sıcakkanlı hayvanlar olarak tanımlanan memeli ve kanatlı hayvanların dışkıları ile ete, süte, toprağa, suya ve dolayısıyla tüm çevreye yayıldığını göstermiştir. Başta sığır dışkısı olmak üzere doğrudan veya dolaylı olarak hayvanların dışkısının bulaştığı her türlü gıda maddesi E.coli O157:H7 enfeksiyonu bakımından potansiyel tehlike taşımaktadır. Nitekim pek çok gıda maddesinde ve ayrıca içme ve kullanma suları ile yüzülen göllerde E.coli O157:H7 varlığı gösterilmiştir. 2000 yılı haziran ayında Kanada’ da klorlama ünitesindeki basit bir arıza nedeniyle nehir suyuna karışmış olan E.coli O157:H7 serotipi salgına ve ölümlere neden olmuştur. 1999 yılında Washington’ da insanlar kirlenen içme sularından ve Clark eyaletinde kirlenmiş suda yüzmekten dolayı hastalanmışlardır.

Sonuç olarak, E.coli bakterisinin yüzlerce çeşidinden biri olan E.coli O157:H7 çok güçlü toksin üretir, su ve gıdalarla geçen çok ciddi hastalıklara neden olur [Halkmanveark., 2001; <http://www.epa.gov/safewater/contaminants/ecoli.html#two>]. Şekil 4.1’ de E.coli O157:H7’ ye ait geçirimli elektron mikroskobu (TEM) fotoğrafı görülmektedir.



**Şekil 4.1** E. coli O157:H7’ nin geçirimli elektron mikroskobu fotoğrafı.

## 5. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

### 5.1 Çalışmanın Amacı

Bu çalışmada çevre kirliliğinin izlenmesinde optik DNA biyosensörü, yeni bir optik dönüştürücü olarak prizma çiftleyici cihazının kullanılmasıyla geliştirilmiştir. Doğrudan ölçüm yapabilen optik biyosensörün üretiminde dönüştürücü olarak prizma çiftleyici cihazının kullanılması bir yeniliktir. Bu cihazın kullanılmasıyla yüksek hassasiyette ve doğrudan ölçüm yapmak mümkündür. Böyle bir cihazın kullanılmasıyla yapılan çalışmalar ileride taşınabilir (portable), yerinde ölçümlerde kullanılacak bir biyosensörün geliştirilmesi hedefinin ön aşamasını teşkil etmektedir.

Aynı zamanda bu çalışma, son derece ucuz, basit ve yüksek kimyasal homojenlik imkânı sağlayan sol-jel daldırma yöntemiyle elde edilen  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmlerinin, prizma çiftleyicide kullanılacak dalga kılavuzları olarak elde edilmesi de oldukça yeni bir çalışmadır. Biyolojik algılayıcı elemanların (Prob DNA) tutuklanması için uygun yüzey yapısına sahip katı yüzeyler,  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmlerin üretilmesiyle sağlanmıştır.

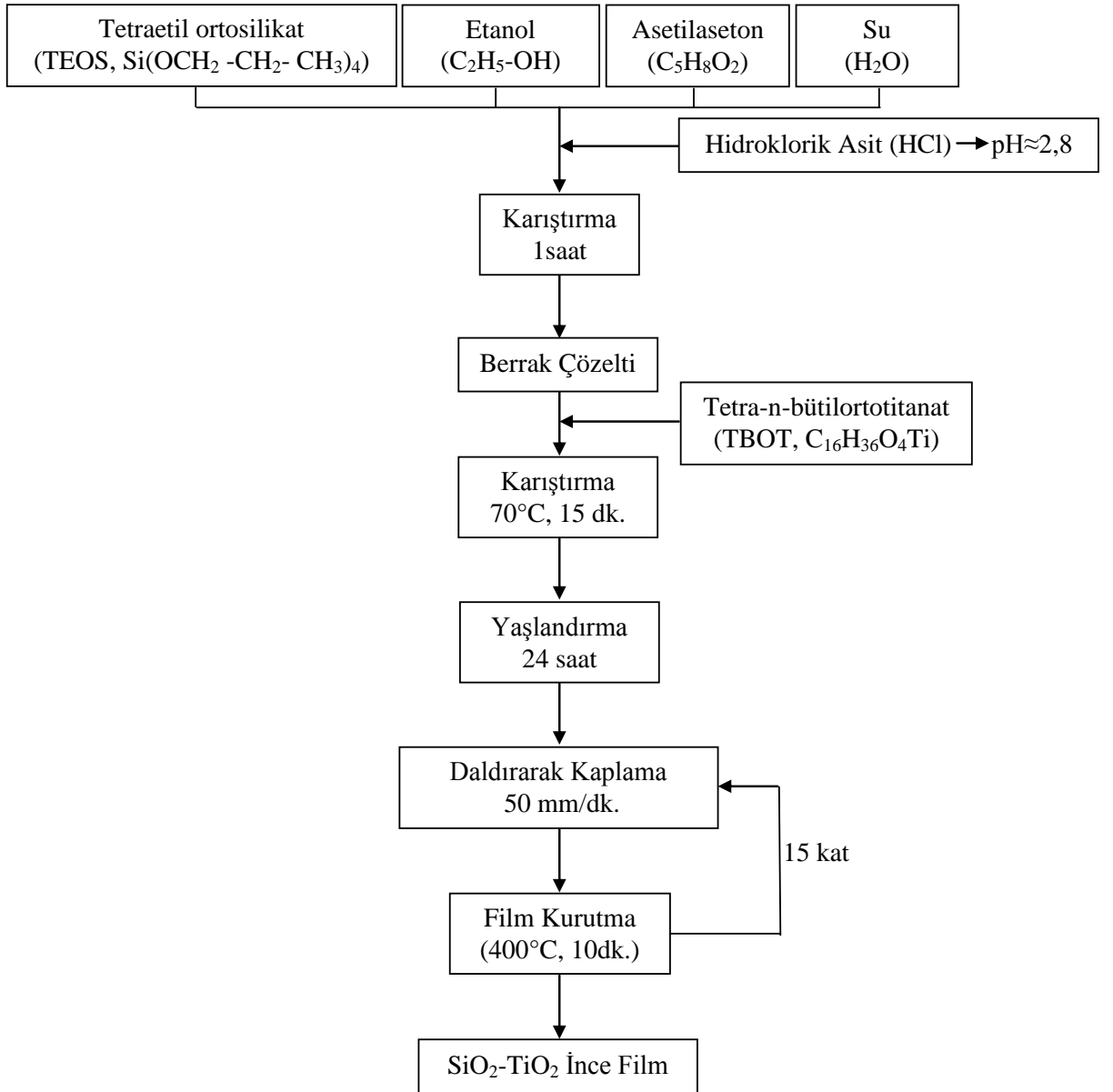
### 5.2 Kaplama Yapılacak Cam Altlıkların Temizlenmesi

Kaplama yapılacak altlıkların seçimi ve temizliği çok önemlidir. Altlığın temiz olmaması filmin yapısını, elektriksel ve optik özelliklerini olumsuz etkileyeceğinden dolayı altlık çok iyi temizlenmelidir. Altlığın mümkün olduğunca az sayıda yüzey kusuruna sahip olması gerekir. Aynı zamanda ısıl ve mekaniksel açıdan da dayanıklı olmalıdır.

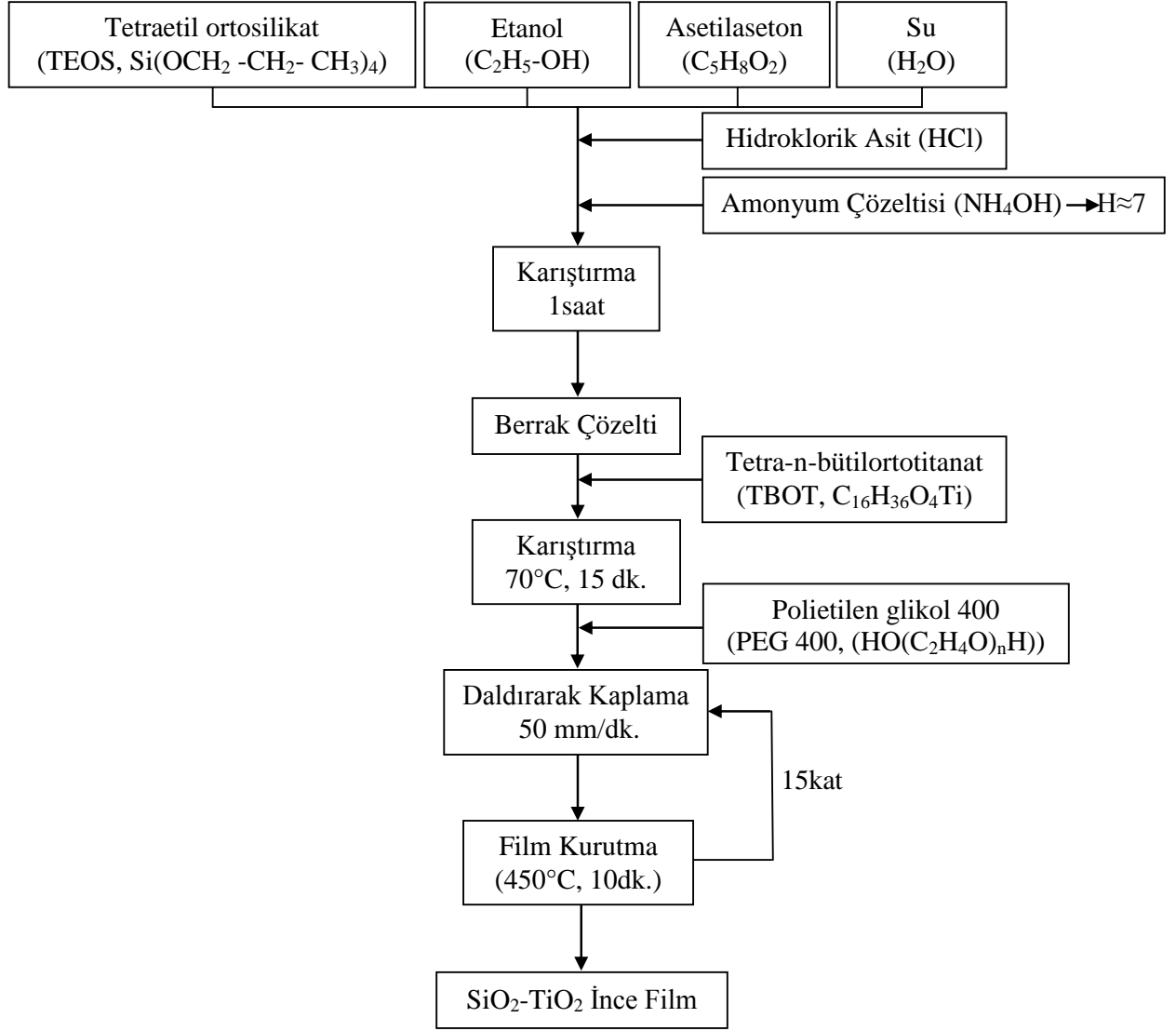
Altlık olarak yüzey kusuru çok az olan mikroskop camları kullanılmıştır. Mikroskop camları önce deterjan ile yıkandıktan sonra saf su ve etanol ile temizlenip 100 °C' lik etüvde kurutulmuştur. Kaplama yapıldıktan sonra istenilen boyutlarda elmas uçlu kalem kullanılarak kesilmiştir.

### 5.3 Sensör Tasarımında Kullanılacak Altlıkların Üretimi

Dalga Kılavuzu özelliği gösteren Ti katkılı SiO<sub>2</sub> filmlerinin üretim aşamaları, Şekil 5.1' ve 5.2' deki akış diyagramında gösterilmiştir. SiO<sub>2</sub> ve TiO<sub>2</sub> kaynağı olarak sırasıyla TEOS (Tetraetil ortosilikat, C<sub>8</sub>H<sub>20</sub>O<sub>4</sub>Si) ve TBOT (Tetra-n-butil ortotitanat, C<sub>16</sub>H<sub>36</sub>O<sub>4</sub>Ti) kullanılmıştır. İlk olarak TEOS, etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>-OH), asetil aseton (C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) ve su (H<sub>2</sub>O) içerisinde mol oranları sırasıyla 1:0,5:1:3 (TEOS:Etanol:Asetilaseton:Su) olacak şekilde karıştırılmıştır. Karışıma katalizör olarak Hidroklorik asit (HCl) ilave edilmiştir. Şekil 5.1' de çözelti 1 saat karıştırıldıktan sonra berrak çözelti elde edilmiştir. Daha sonra TBOT, TEOS:TBOT mol oranı 1:1 olacak şekilde çözeltiye ilave edilmiştir. Çözelti 70 °C' de 15 dakika karıştırıldıktan sonra 24 saat yaşlandırmaya bırakılmıştır. Şekil 5.2' de ise katalizör ilavesinden sonra Amonyum çözeltisi (NH<sub>4</sub>OH) ile pH ≈7' ye ayarlanmıştır. 1 saat karıştırıldıktan sonra berrak çözelti elde edilmiş ve daha sonra TBOT (TEOS:TBOT; 1:1) ilavesi yapılmıştır. Çözelti 70 °C' de 15 dakika karıştırıldıktan sonra film yüzeyinde homojen porların oluşumu için 0,5 mL PEG 400 (polietilen glikol, (HO(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O)<sub>n</sub>H)) ilave edilmiştir. Her iki üretim metodunda da çözeltiler cam altlıklar üzerine 50 mm/dk geri çıkış hızıyla daldırarak kaplama (dip coating) tekniği kullanılarak kaplanmıştır. Her bir kaplamadan sonra Şekil 5.1 ve Şekil 5.2' de sırasıyla filmler 400 °C ve 450 °C' de 10 dakika kurutulmuştur. İstenilen kalınlığa 15 kat kaplamadan sonra ulaşılmıştır. Sol-jel yöntemiyle daldırarak kaplama cihazı kullanılarak SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> ince filmler üretilmiştir.



Şekil 5.1 SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin üretim akış diyagramı.



Şekil 5.2 PEG 400 Katkılı SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin üretim akış diyagramı.

#### 5.4 Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) Analizleri

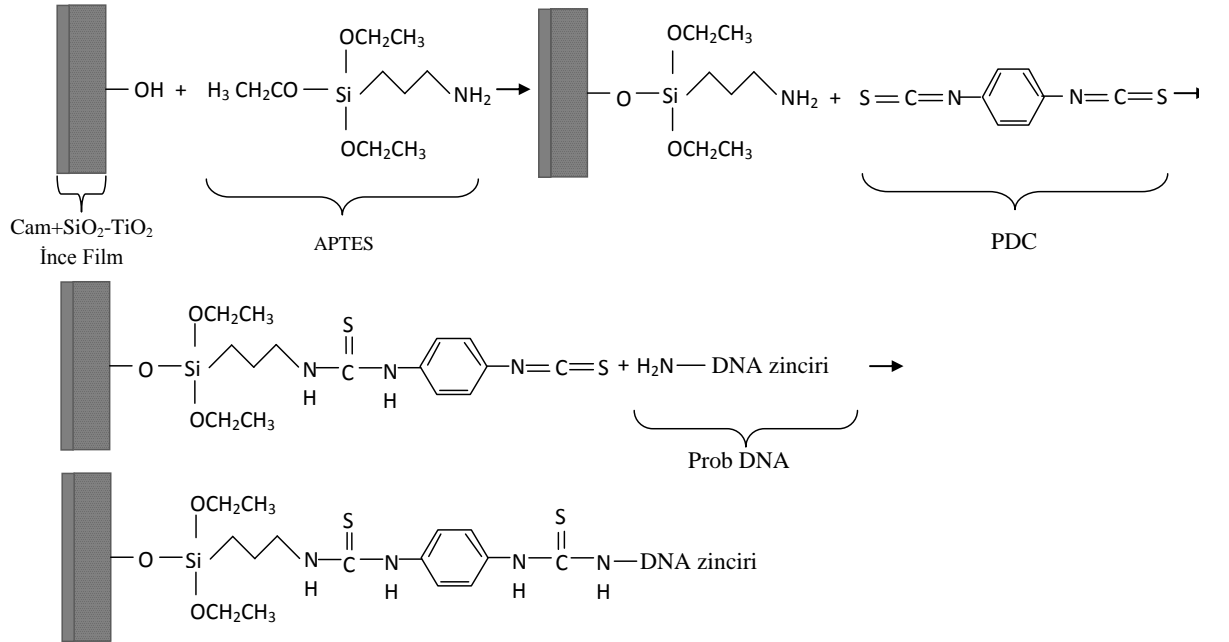
Çalışmalar sırasında Phillips XL30 SFEG taramalı elektron mikroskobu kullanılmış ve filmlerdeki porların boyut, miktar ve dağılımları incelenmiştir.

## 5.5 Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizleri

Filmlerin kimyasal yapısının belirlenmesi için FTIR, Bio–Rad Tropical Option for FTS 175 C cihazı kullanılarak sodyum klorür camına kaplanan filmler incelenmiştir. Böylece kaplamada mevcut olan Si-O-Si bağları ile camda bulunan Si-O-Si bağlarının ayırt edilebilmesi ve tutuklanma için gerekli olan yüzeydeki –OH bağlarının varlığının tespiti sağlanmıştır.

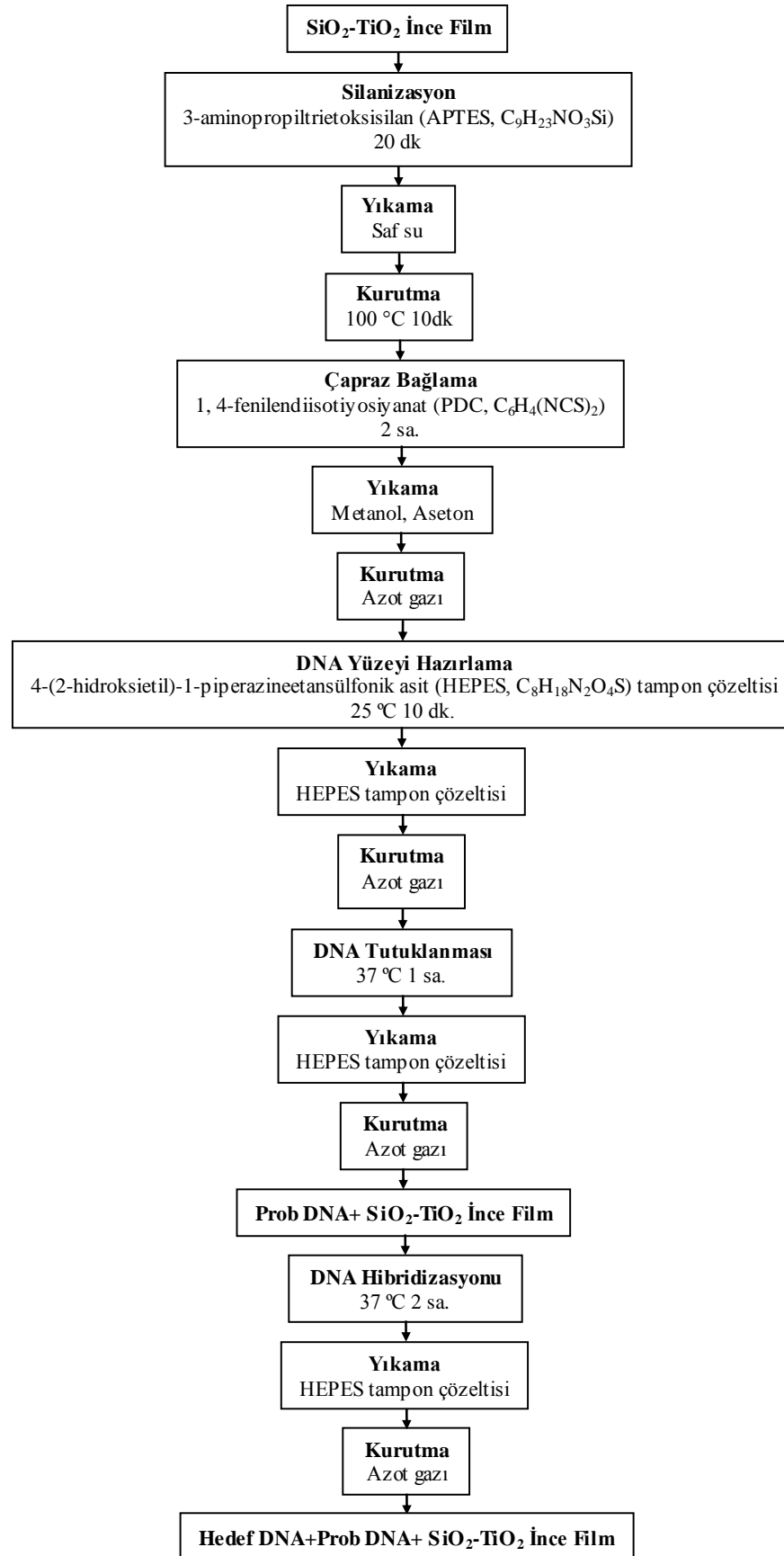
## 5.6 DNA Tutuklanması (Immobilization) için SiO<sub>2</sub>- TiO<sub>2</sub> İnce Film Yüzeylerinin Hazırlanması ve DNA Hibridizasyonu

Amin modifiye DNA problemlerinin SiO<sub>2</sub>- TiO<sub>2</sub> ince film yüzeyine ya da yapıdaki porların içerisine kovalent bağlanabilmesi için film yüzeyi çeşitli kimyasal işlemlerden geçirilmiştir. Şekil 5.3’ de gösterilen yüzey hazırlama işlemleri yapılmıştır.



Şekil 5.3 DNA bağlanması için yüzeyin hazırlanması.

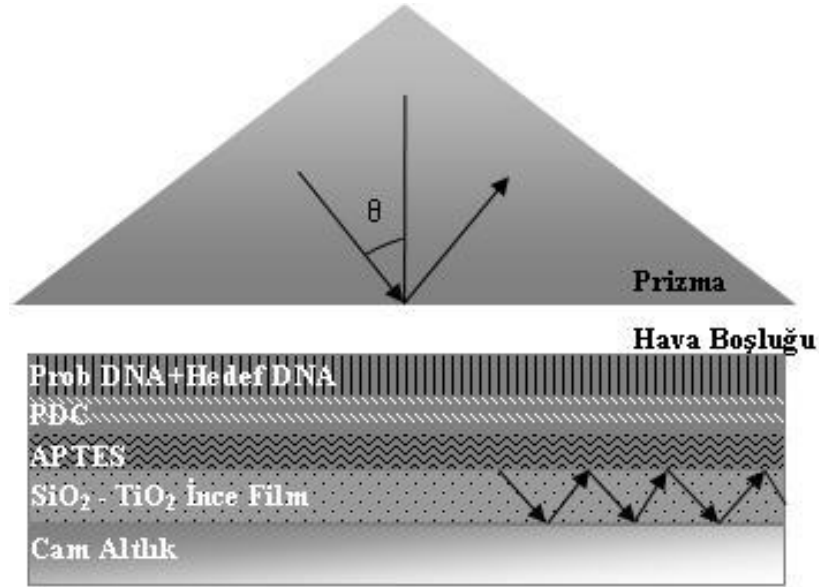
İlk olarak film yüzeyi, saf su ve metanol (1:1) karışımı içerisindeki %2' lik APTES (3-(Trietoksil)propilamin,  $C_9H_{23}NO_3Si$ ) çözeltisiyle 20 dakika silanize edilmiştir. Silanizasyondan sonra saf su ile yıkanan filmler etüvde 100 °C' de 10 dakika kurutulmuştur. Daha sonra film yüzeyleri, DMSO' da (Dimetil sülfoksit,  $CH_3)_2SO$ ) %0,2 olan PDC (1,4-fenilen diisotiyosiyanat,  $C_6H_4(NCS)_2$ ) çözeltisinde 2 saat bekletilmiştir. Filmler sırasıyla metanol ve asetonla yıkandıktan sonra azot gazıyla kurutulmuştur. DNA tutuklanmasından önce film yüzeyleri 20 mM' lık HEPES tampon çözeltisinde 10 dakika bekletilmiştir. Daha sonra HEPES tampon çözeltisiyle yıkanıp azot gazıyla kurutulmuştur. Böylece film yüzeyleri amin modifiye DNA tutuklanması için uygun hale getirilmiştir. DNA tutuklanması için prob DNA zinciri 100  $\mu M$  konsantrasyonda olacak şekilde HEPES tampon çözeltisinde çözülmüştür. DNA tutuklanması inkübatörde 37 °C' de 1 saat olarak yapılmıştır. Tutuklanma işleminden sonra film yüzeyleri, kovalent bağlanmayan kalıntı DNA' lardan giderilmek için HEPES tampon çözeltisiyle yıkanıp, azot gazıyla kurutulmuştur. DNA tutuklanmış film yüzeyleri 37 °C' de 2 saat 100  $\mu M$  Hedef DNA çözeltisiyle hibridize edilmiştir. DNA tutuklanması ve hibridizasyonu akış şeması Şekil 5.4' de verilmiştir.



Şekil 5.4 DNA tutuklanması ve hibridizasyonu akış şeması.

## 5.7 Prizma Çiftleyici (Prism Coupler) Cihazı Kullanılarak Oluşturulan Deney Seti Kurulumu

Şekil 5.5’ de prizma çiftleyici cihazı kullanılarak oluşturulan deney seti kurulumu gösterilmiştir. Prob DNA tutuklanmasından önce, sonra ve Hedef DNA hibridizasyonundan sonra ölçümler alınmıştır. Ölçümlerin doğruluğu açısından her bir basamakta numunenin farklı noktalarından ölçüm yapılmış ve ortalamaları alınmıştır.



Şekil 5.5 Prizma Çiftleyici cihazının deneysel kurulumu.

## 5.8 Floresan Mikroskobu Analizleri

Prizma çiftleyici cihazıyla alınan sonuçları desteklemek amacıyla Floresan mikroskopu kullanılmış ve Floresan bağlı Hedef DNA hibridizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmiştir.

## 5.9 Su Kirlenmesinde İndikatör Bakteri olarak Kullanılan E. coli' nin İzlenmesi için Seçilen Sentetik DNA Zinciri

Çalışmamızda E.coli bakterisinin zararlı bir türü olan E.coli O157:H7 EDL933 türüne ait Gen numarası 957271 olarak verilen 20 mer' lik Prob DNA zinciri seçilmiştir. Sentetik Prob DNA ve Hedef DNA (Eşlenik olan (Complementary) ve Eşlenik olmayan (Non-complementary)) zincirleri aşağıdaki Tablo 5.1' de verilmiştir.

**Tablo 5.1** Su kirlenmesinde indikatör bakteri olarak kullanılan E. coli' nin izlenmesi için seçilen sentetik DNA zincirleri.

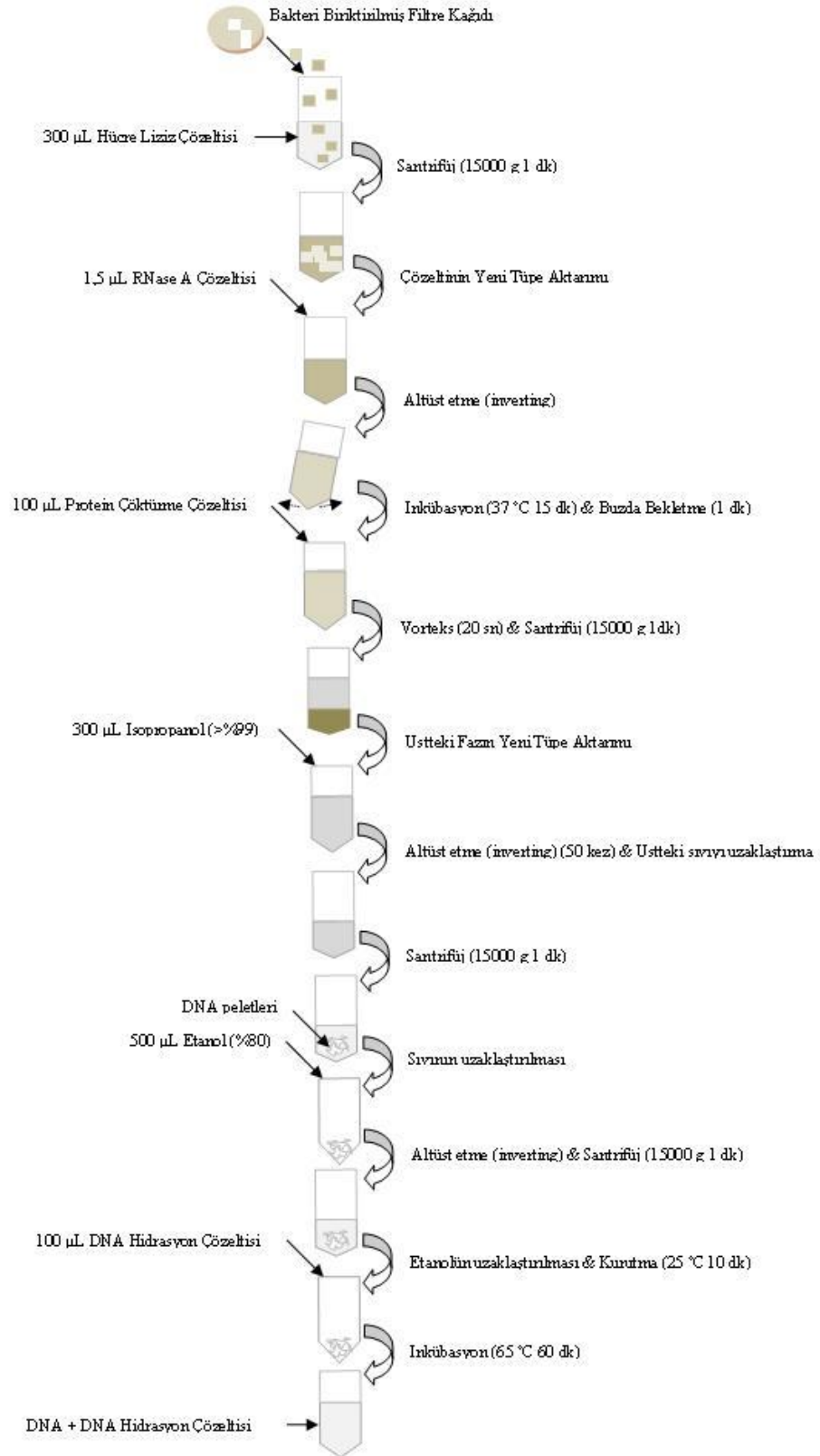
Adlandırma		Sentetik DNA Zincirleri
Prob DNA		5' - (_C6Amino) CACCTCCGCAACCGATATTA -3' 5' - (_C6Thiol) CACCTCCGCAACCGATATTA -3'
Hedef DNA	Eşlenik olan (Comp.)	5' - (_FLSN) TAATATCGGTTGCGGAGGTG-3'
	Eşlenik olmayan (Non-comp.)	5'-( _FLSN) CGGCTGCTGGCACATAGT-3'

## 5.10 Evsel Atıksu Numunesiyle Yapılan Çalışmalar

Su içerisinde koli basili algılaması yapılmak üzere evsel atıksu arıtım tesisinin girişinden alınan ham atıksu ilk olarak süzgeçten geçirilerek büyük partiküllerden temizlenmiştir. Daha sonra kaba filtreden geçirilen atıksu askıda katılarında çökmesi için 2 gece karanlık ortamda bekletilmiştir. Askıda katılar çöktükten sonra üzerindeki su kaba filtreden tekrar süzümüştür. Daha sonra 1L elde edilen su vakumlu süzme

düzeninde por çapı 0,45 µm olan selüloz-asetat membran filtreden (47mm filtre çapı) geçirilmiş ve su içerisindeki bakterilerin filtrede toplanması sağlanmıştır. Filtrede biriktirilen bakteriler +4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır.

DNA kiti (Bacteria DNA Preparation Kit from Jena Bioscience) kullanılarak bakterilerin DNA izolasyonu yapılmıştır. Bunun için DNA kitinde bulunan hazırlama prosedürü sırasıyla takip edilmiştir (Şekil 5.6). İlk olarak filtreler küçük parçalar halinde kesilmiştir. Daha sonra 1,5 mL’ lik mikrotüplerin içerisine 300 µL hücre liziz çözeltisi (cell lysis solution) ve bakterilerin bulunduğu kesilmiş filtre parçaları ilave edilmiştir. Mikrotüpler 15000 g’ de 1 dakika santrifüjlenerek hücrelerin lizize uğraması sağlanmıştır. Daha sonra tüpler içerisindeki çözelti yeni mikrotüplere aktarılmıştır. Tüplerin içerisine 1,5 µL RNase A çözeltisi (RNase A solution) ilave edilmiş ve elimizle hafif altüst ederek (inverting) karıştırılmıştır. Daha sonra mikrotüpler 37 °C’ de 15 dakika inkübe edilmiş ve 1 dakika buzda bekletilmiştir. RNase arıtımı basamağından sonra proteinin çöktürülmesi için mikrotüplere 100 µL protein çöktürme çözeltisi (protein precipitation solution) eklenerek 20 saniye vortekslenmiştir. Daha sonra 15000 g’ de 5 dakika santrifüj yapılmıştır. Mikrotüplerin içerisinde iki faza ayrılmış kısımdan üstte olanı, içerisinde 300 µL isopropanol (>%99) bulunan yeni mikrotüplere aktarılmıştır. Elimizle 50 kez tüp altüst edilerek karıştırılmıştır. Daha sonra mikrotüplerdeki üstte kalan sıvı dökülmüş ve tüp 15000 g’ de 1 dakika santrifüjlenmiştir. DNA küçük beyaz peletler şeklinde elde edilmiştir. Daha sonra 500 µL etanol (%80’ lik) ilave edilerek DNA peletlerinin birkaç kez yıkanması için tüpler elimizle altüst edilmiş sonra 15000 g’ de 1 dakika santrifüjlenmiştir. Son olarak dikkatli bir şekilde etanol uzaklaştırılmış ve tüp açık havada oda sıcaklığında 10 dakika kurumaya bırakılmıştır. DNA hidrasyonu için 100 µL DNA hidrasyon çözeltisi (DNA hydration solution) eklenmiş ve hidrasyon olmuş DNA 65 °C’ de 60 dakika inkübe edilmiştir. DNA kiti ile izole ettiğimiz DNA’ ya spektrofotometrede bakılarak konsantrasyonu 440 ng/µL olarak hesaplanmıştır. İzole ettiğimiz DNA’ lar +4 °C’ de buzdolabında saklanmıştır.

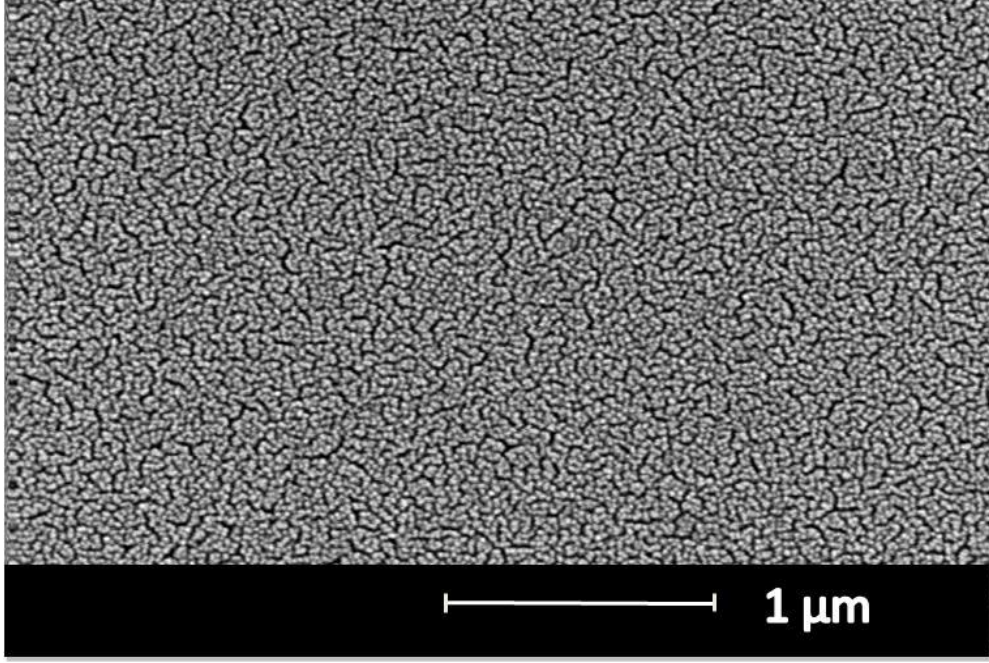


Şekil 5.6 DNA kiti kullanılarak bakteriden DNA izolasyonu şeması.

DNA kiti kullanılarak evsel atıksudan izole edilen bakteri DNA' sı (440 ng/ $\mu$ L) ince filmler üzerine tutuklanan prob DNA üzerine hibridize edilmiştir. Evsel atıksudan izole edilen bakteri DNA' sının (Numune DNA) hibridizasyonunu desteklemek amacıyla aynı zamanda ince filmin farklı bölgelerine sentetik eşlenik olan DNA ve eşlenik olmayan DNA' lar da hibridize edilmiştir. Tüm bu DNA tutuklanması ve hibridizasyonu aşamaları daha önce bahsedilen şekilde (Şekil 5.4 bkz.) gerçekleştirilmiştir. Prizma çiftleyici cihazıyla her bir aşamadan sonra (prob DNA tutuklanması öncesi, sonrası, Numune DNA, Eşlenik olan DNA ve Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonları sonrası) ölçümler yapılmıştır.

## 6. BULGULAR VE TARTIŞMA

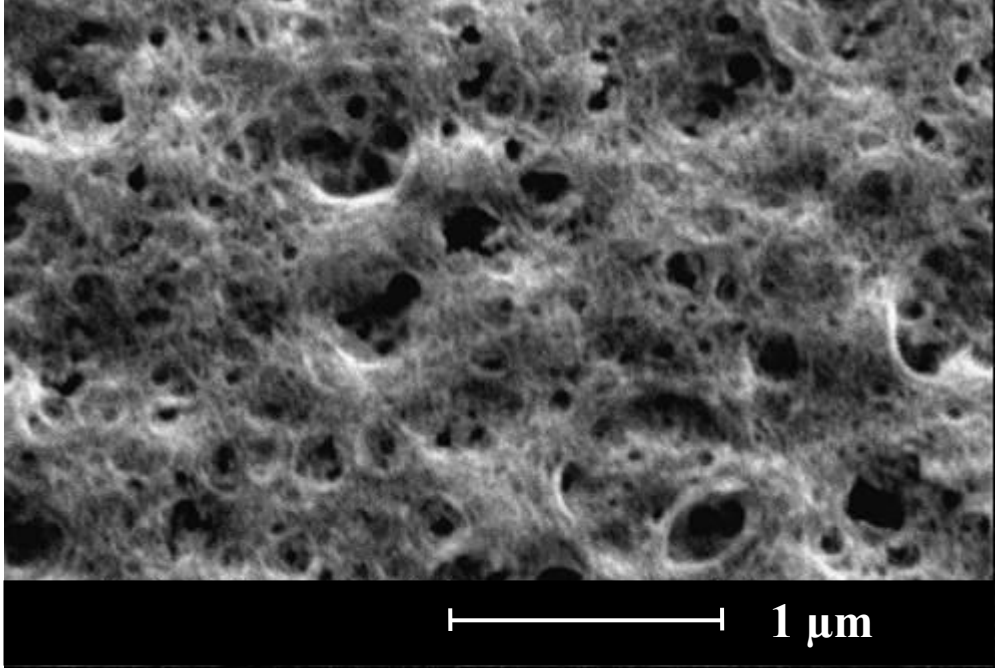
### 6.1 SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Sonuçları



Şekil 6.1 SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Mikrografı.

Şekil 6.1’ deki SEM mikrografında 400 °C’ de kurutulan filmlerde uniform dağılmış nano-boyutlu porların bulunduğu homojen bir yüzey morfolojisi gözlenmiştir. Yüksek homojenlik ve yüzey alanı hem DNA’ ların uniform bağlanmasını hem de bunun sonucunda prizma çiftleyici cihazı ölçümlerinin daha güvenilir olmasını sağlar. Ayrıca filmlerin amorf yapıda olması, tane sınırlarından geçen ışığın saçılmasını azalttığından dolayı dalgakılavuzu özelliğini desteklemektedir. Filmlerimiz amorf yapıda olsa bile dalgakılavuzu özelliği gerekmektedir. Çünkü prizma çiftleyici cihazında lazerin prizmadan geçerek film içerisinde ilerlemesi istenmektedir. Lazerin film içerisinde ilerlemesi sırasında detektöre gelen yansıyan ışığın şiddetindeki düşüşten elde edilen dalga kılavuzu yapısındaki piklerin maksimumunun yarısındaki tam genişliğin (Full Width Half Maximum, FWHM) belirgin düşüşüyle gerçekleşir. Pik genişliğinin düşük yani

piklerin daha keskin çıkması, altlıktan etrafındaki daha düşük indisli yerlere (cam ve hava) ışık kaybının düşük olmasıyla sağlanır. Tasarlanan sensör hassasiyeti de elde edilen piklerin FWHM değerlerine bağlıdır. Elde edilen piklerin FWHM değeri  $0,1^\circ$  olarak hesaplanmıştır. Bu değer sensörümüzün hassasiyetinin iyi olduğunu gösterir.

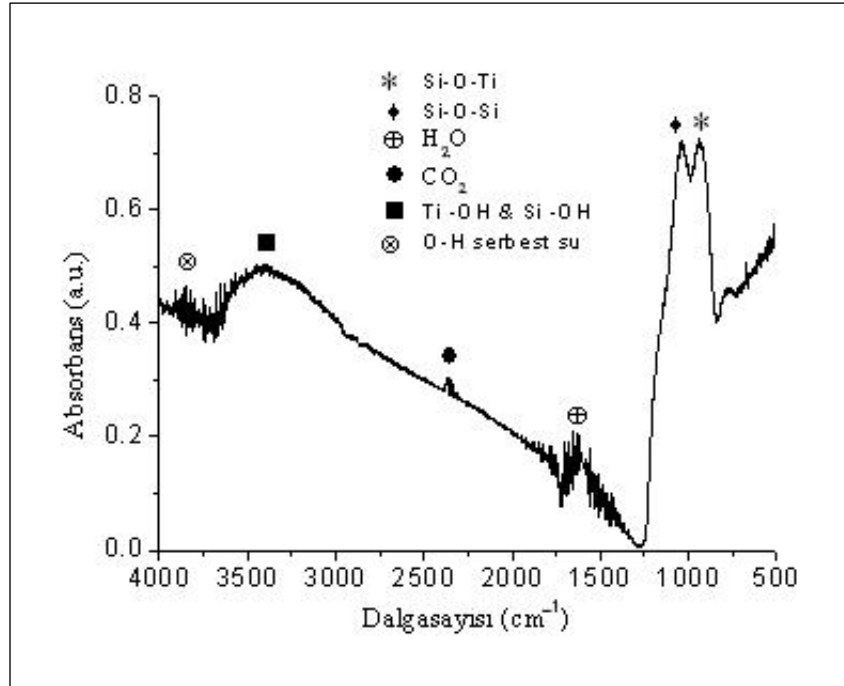


**Şekil 6.2** PEG 400 Katkılı SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin SEM Mikrografı.

Şekil 6.2' deki 450 °C' de kurutma yapılan PEG 400 katkılı ince filmlerin SEM mikrografına göre, filmlerin oldukça pürüzlü bir yüzeye sahip olduğu ve homojen dağılmış porların boyutlarının 50–500 nanometre arasında dağılmış bulunduğu gözlenmiştir. Filmlerdeki nanoboyutta porlu pürüzlü yüzeyler PEG 400 katkısıyla elde edilmiştir. Çünkü PEG kurutma sırasında oksitlendikten sonra karbon dioksit olarak ayrışır. Filmden karbondioksit ayrılırken nanoboyutta porlar meydana gelir [Kato, 2005]. Bu porlarla hem filmin yüzey alanı hem de Prob DNA bağlanması için uygun alanların sayısı artmış olur.

## 6.2 SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin FTIR Spektroskopisi Sonuçları

Şekil 6.3’ de ince filmlerin FTIR grafiği görülmektedir. Her iki filmde de (Katkısız ve PEG 400 Katkılı) çıkan FTIR sonuçları aynıdır. Grafiğe göre 940 cm<sup>-1</sup> civarında Si–O–Ti bağlarının titreşiminden, 1030 cm<sup>-1</sup> civarında ise Si–O–Si bağlarının titreşiminden pikler elde edilmiştir. 3400 cm<sup>-1</sup> civarındaki geniş bant ise filmlerdeki Ti–OH ve Si–OH gruplarının titreşiminden meydana gelmiştir. Ortamdaki CO<sub>2</sub> ve adsorbe olmuş H<sub>2</sub>O’ nun varlığı sırasıyla 2350 cm<sup>-1</sup> ve 1620 cm<sup>-1</sup> civarında meydana gelen piklerle görülmüştür. Bu bağ titreşimlerini destekleyici çeşitli makalelerde yapılan FTIR sonuçları görülmüştür [Wang et al., 2005] [Tian et al., 2007] [Song et al., 2002].



Şekil 6.3 SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce Filmlerin (Katkısız ve PEG 400 Katkılı) FTIR grafiği.

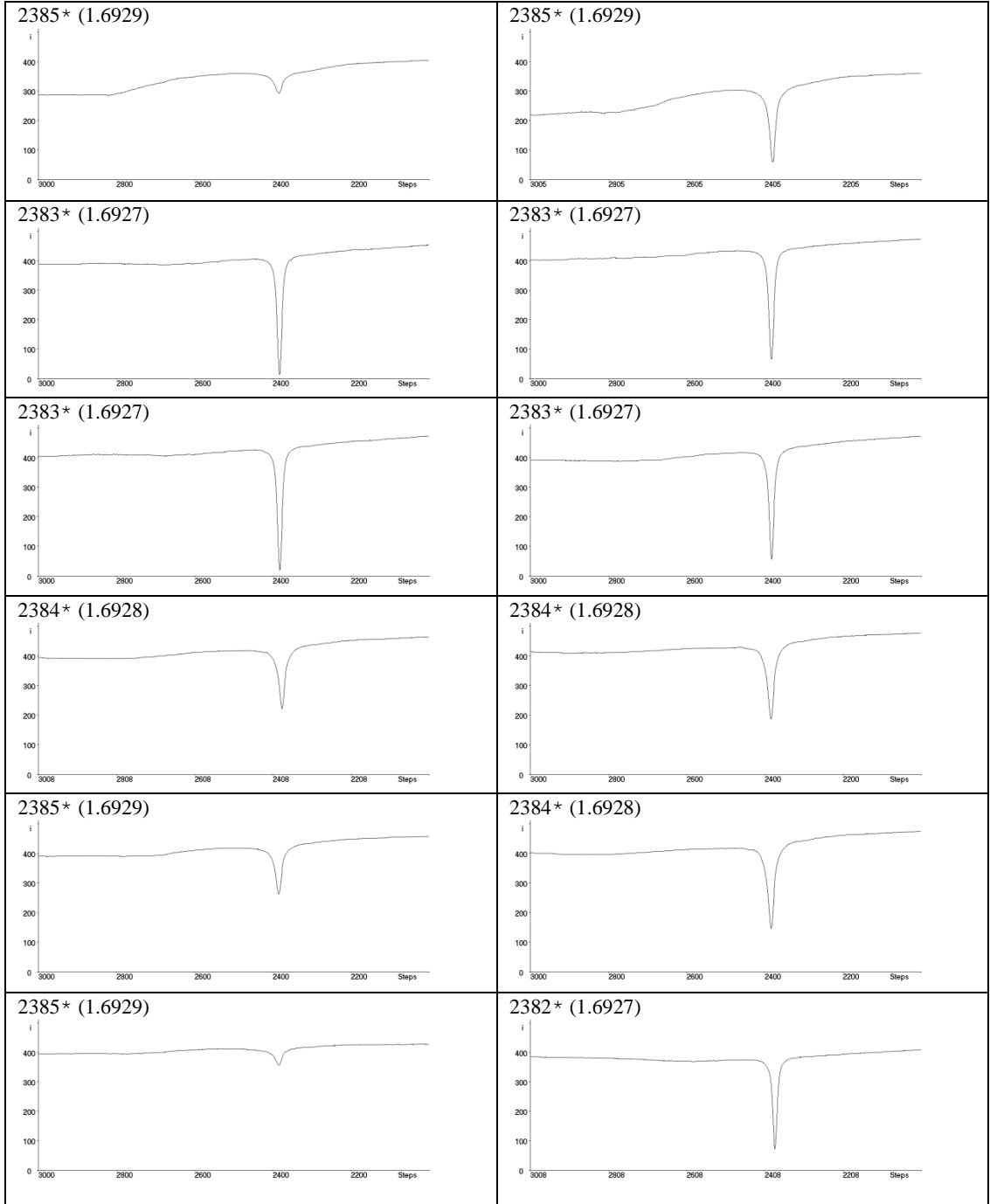
SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> ince filmler, cam altlıktan daha yüksek kırılma indisli, dalgakılavuzu özelliğine sahip tabakalar ve APTES tek tabakası için uygun yüzeyler sağlamak için üretilmiştir. FTIR ölçüleriyle desteklenen sol-jel tekniğiyle üretilmiş filmlerdeki Ti–OH ve Si–OH gruplarının varlığı APTES’ deki etoksi (ethoxy)

gruplarıyla bağlanması için uygun bölgelerdir. Bifonksiyonel çapraz bağlayıcı olarak kullanılan PDC ise uçlarında sahip olduğu karbon atomlarıyla bir uçtan APTES' deki azot atomuna diğer uçtan da amin modifiye Prob DNA' daki amino grubundaki azot atomuyla kovalent bağlanma gerçekleştirir. İleri sürülen yüzey yapısı Şekil 5.3 (bkz.)' de gösterilmiştir. Benzer yüzey kimyası cam altlıklar üzerine Festag et al. tarafından önerilmiştir [Festag et al., 2005].

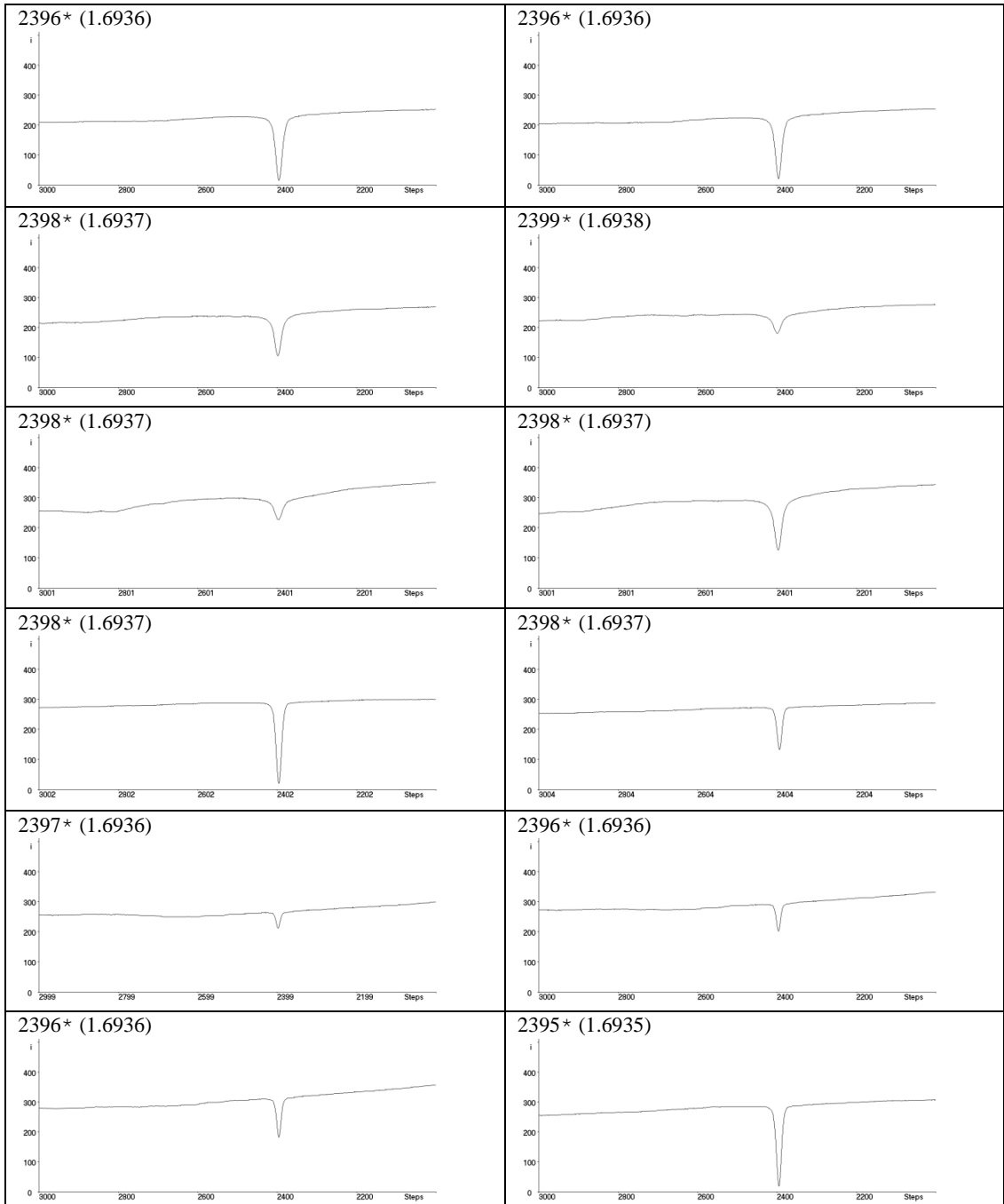
### 6.3 Prizma Çiftleyici Ölçüm Sonuçları

$\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  (Si:Ti; 1:1) ince filmlerin teorik kırılma indisi değeri,  $\text{SiO}_2$  (1,46) ve  $\text{TiO}_2$  (~2,57)' in kırılma indislerinin ağırlıklı ortalamalarından 2,01 olarak hesaplanmıştır. Prizma çiftleyici cihazıyla ölçümlerde alınan ilk efektif indis değeri (ilk pik) kırılma indisi değerine çok yakın olduğu için efektif indis yerine kırılma indisi olarak adlandırılabilir. Prizma çiftleyici cihazıyla yapılan ölçümlerde sırasıyla katkısız ve PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan prob DNA tutuklanmasından önceki ortalama kırılma indisi değerleri 1,6928 ve 1,5798 olarak ölçülmüştür. Ölçümlerde çıkan ortalama kırılma indisi değerlerinin teorik değerden düşük çıkmasının nedeni ise SEM mikrograflarından da açıkça görüldüğü gibi filmlerin porlu bir yapıya sahip olmasıdır. Ortalama kırılma indisi değerlerinden hesaplanan yüzde por hacimleri sırasıyla katkısız ve PEG katkılı filmler için yaklaşık % 32 ve % 43 olarak hesaplanmıştır.

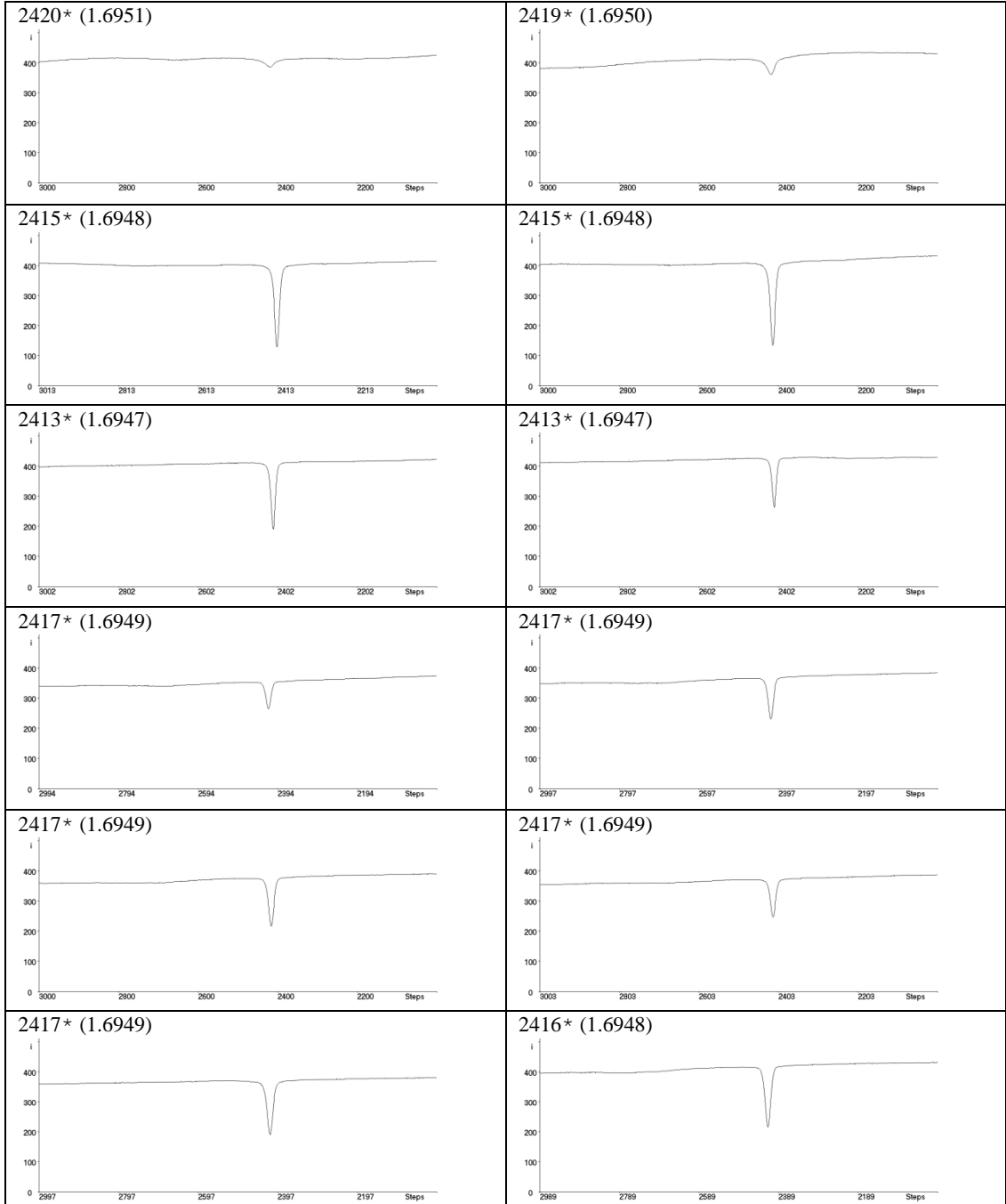
Katkısız ince filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması öncesi, sonrası ve Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonu sonrası 12 farklı noktadan ölçülen prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve grafikleri sırasıyla Şekil 6.4, Şekil 6.5 ve Şekil 6.6' da gösterilmektedir.



**Şekil 6.4** Prob DNA tutuklanmasından önce 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete (i) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).



**Şekil 6.5** Prob DNA tutuklanmasından sonra 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete (i) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).



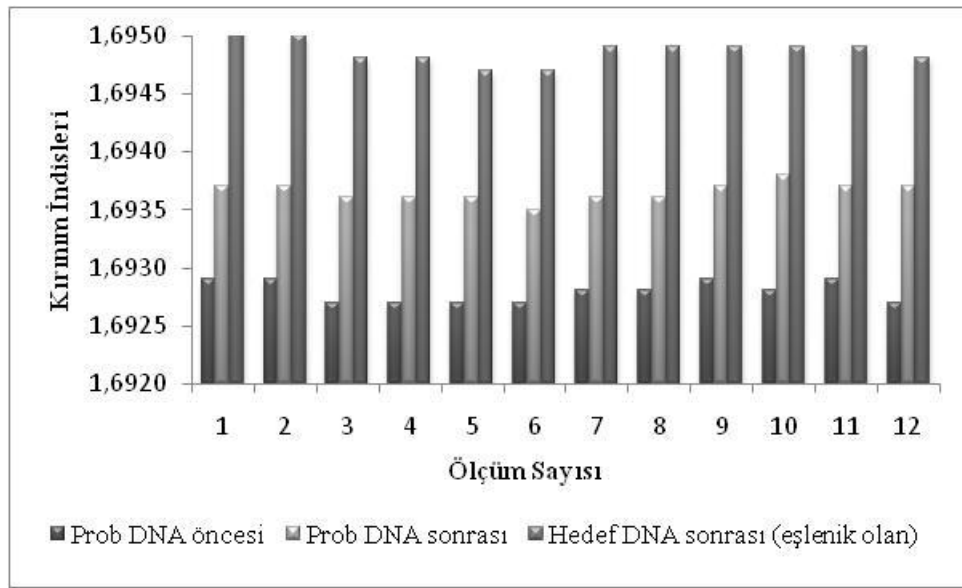
**Şekil 6.6** Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonundan sonra 12 farklı noktadan alınan prizma çiftleyici cihazı ölçüm değerleri ve şiddete ( $i$ ) karşı basamak (steps) grafikleri (grafiklerin üzerinde yıldız ile gösterilen ilk değer basamağı, parantez içerisindeki değer ise kırılma indisi göstermektedir).

Katkısız ince filmler üzerine yapılan prob DNA tutuklanmasından önceki ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,6928 olarak ölçülürken prob DNA tutuklanmasından sonraki ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,6937 olarak artmıştır. Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonundan sonra ölçülen ortalama kırılma indisi değeri de 1,6949' dur. Tablo 6.1' de ortalama kırılma indisi değerleri

ve standart sapmaları verilmiştir. Ölçüm sayısına karşılık ölçülen kırılma indisi değerleri de Şekil 6.7' de grafik olarak verilmiştir.

**Tablo 6.1** Katkısız ince filmler üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu sonrası Prizma çiftleyici ölçüm sonuçları.

	Prob DNA Öncesi	Prob DNA Sonrası	Hedef DNA Sonrası
Ortalama Kırılma İndisi Değerleri	<b>1,6928</b>	<b>1,6937</b>	<b>1,6949</b>
Standart Sapma	<b>0,00009</b>	<b>0,00008</b>	<b>0,00012</b>



**Şekil 6.7** Katkısız İnce Film üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu için ölçüm sayısına karşılık kırılma indisi değerleri grafiği.

PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanmasından önceki ölçülen ortalama kırılma indisi değeri ise 1,5798 iken Prob DNA tutuklanmasından sonra ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,5814 olarak artmıştır. Sonrasında Hedef DNA olarak hem Eşlenik olan hem de Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonu yapılmıştır. Eşlenik olan DNA hibridizasyonu sonucunda ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,5819 olarak artarken, Eşlenik olmayan hibridizasyon da ise ortalama

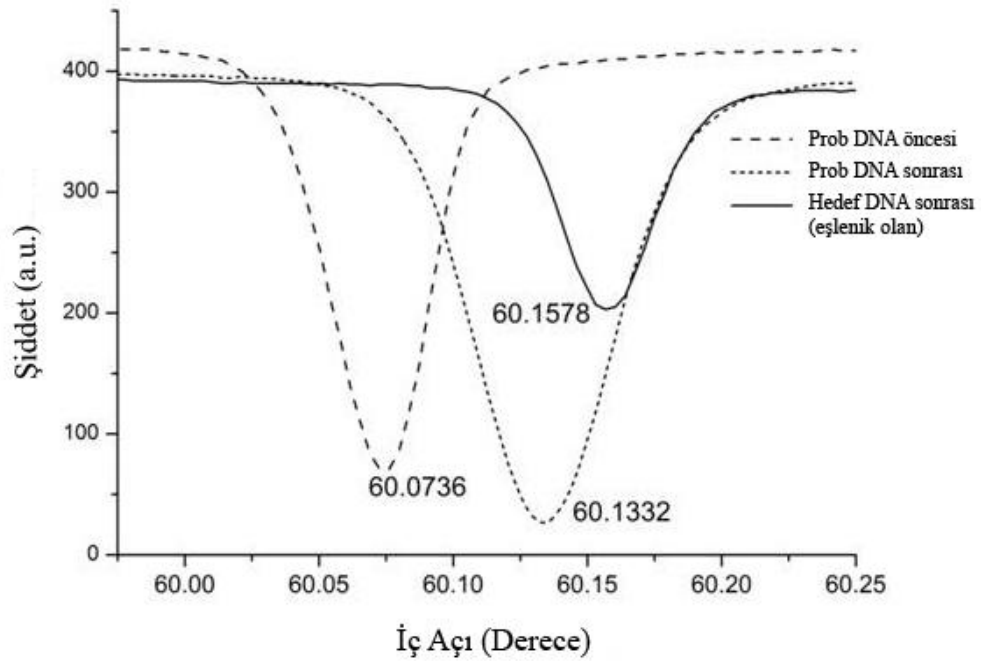
kırılma indisi değeri 1,5813 olarak ölçülmüştür. Ölçülen ortalama kırılma indisi değerleri ve standart sapmaları Tablo 6.2' de verilmiştir.

**Tablo 6.2** PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu için Prizma çiftleyici cihazı ortalama ölçüm sonuçları ve standart sapmaları.

	Prob DNA Öncesi	Prob DNA Sonrası	Eşlenik olan DNA	Eşlenik olmayan DNA
Ortalama Kırılma İndisi Değerleri	<b>1,5798</b>	<b>1,5814</b>	<b>1,5819</b>	<b>1,5813</b>
Standart Sapma	<b>0,0007</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0004</b>	<b>0,0008</b>

Prob DNA tutuklanmasından sonraki ölçülen ortalama kırılma indisi değerleri artmıştır. Bunun sebebi DNA' ların yüzeye tutuklanırken aynı zamanda porlar içerisine de tutunmasıdır. Böylece porlar içerisindeki havanın ( $n=1$ ) yerini DNA' lar ( $n \approx 1,5$ ) doldurmuş ve kırılma indisi değerini yükseltmiştir. Eşlenik olan DNA hibridizasyonundan sonraki ortalama kırılma indisi değerinin yükselmesi ise porlarda tek DNA zinciri yerine çift DNA zincirinin oluşmasıdır. Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonunda ise ölçülen ortalama kırılma indisi değeri (1,5813), Prob DNA tutuklanmasından sonraki değerle (1,5814) yaklaşık olarak aynıdır. Bunun sebebi Eşlenik olmayan DNA ile hibridizasyonun gerçekleşmemiş olmasıdır.

Katkısız ince film üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA hibridizasyonu sonrasındaki ortalama kırılma indisi değişimlerine karşılık gelen çiftleşme açısına karşı şiddet grafiği Şekil 6.8' de verilmiştir. Grafiğe göre açılar, Prob DNA öncesi  $60,0736^\circ$ , Prob DNA sonrası  $60,1332^\circ$  ve Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonu sonrası ise  $60,1578^\circ$  dir. Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan) hibridizasyonu sonrasında açılar artmıştır.

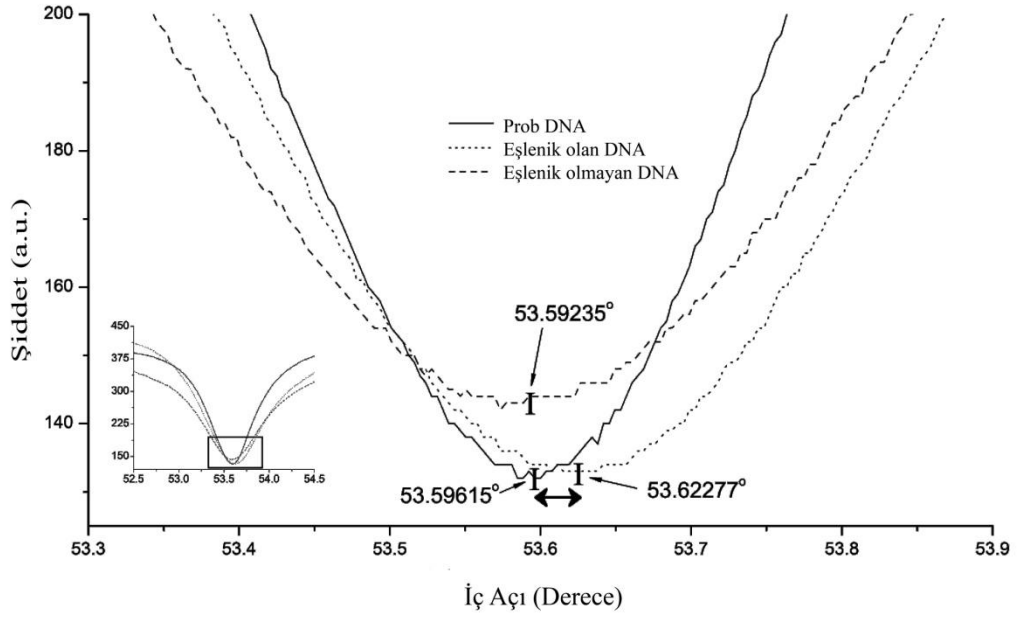


**Şekil 6.8** Katkısız İnce Film üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması öncesi, sonrası ve Hedef DNA hibridizasyonu sonrası ölçülen İç Açıya karşı Şiddet grafiği.

Kırılma indisinin ve açının bu artışı Rong et al. tarafından yapılan çalışmalarla da uyum sağlamaktadır [Rong et al., 2006][Rong et al., 2006, p.13-15]. Bu çalışmalarda DNA için aynı şekilde prizma çiftleyici cihazıyla ölçüm yapılmış, fakat dalgakılavuzu olarak poroz silikon kullanılmıştır. Ölçüm limiti  $2,17 \mu\text{M}$  olarak rapor edilmiştir. Çalışmalarımızda ise ölçüm limitimiz aynı aralıkta ( $8,13 \mu\text{M}$ ) ve  $0,002^\circ$  rezonans değişimiyle (prizma çiftleyicinin çözünürlüğü) uyumlu olarak sağlanmıştır. Çalışmamız, farklı dalgakılavuzu malzemesi ve farklı porozite seviyeleri kullanmış olduğumuzdan dolayı biraz daha düşük prob yoğunluğu ve daha yüksek ölçüm limitiyle sonuçlanmıştır. Buna rağmen çalışmalarımız göstermiştir ki sol- jel tekniğiyle ürettiğimiz  $\text{SiO}_2\text{-TiO}_2$  ince filmlerin prizma çiftleyici cihazıyla yapılan oligonükleotid ölçümleri için uygun olduğudur.

PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu sonrası ölçülmüş olan ortalama kırılma indisi değerlerine karşılık gelen iç açılara karşı şiddet grafiği Şekil 6.9' da verilmiştir. Kırılma indisi değerlerine karşılık gelen iç açı değerleri sırasıyla

Prob DNA sonrası  $53,5961^\circ$ , Eşlenik olan DNA hibridizasyonu sonrası  $53,6227^\circ$  ve Eşlenik olmayan DNA sonrası ise  $53,5923^\circ$  olarak ölçülmüştür. Ölçülen açılarda Eşlenik olan DNA kısmında artış olurken Eşlenik olmayan DNA kısmında ise bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuç hibridizasyonun yalnızca eşlenik hedef DNA' lar kullanıldığında gerçekleştiğini ve sensörün doğru çalıştığını kanıtlamaktadır.



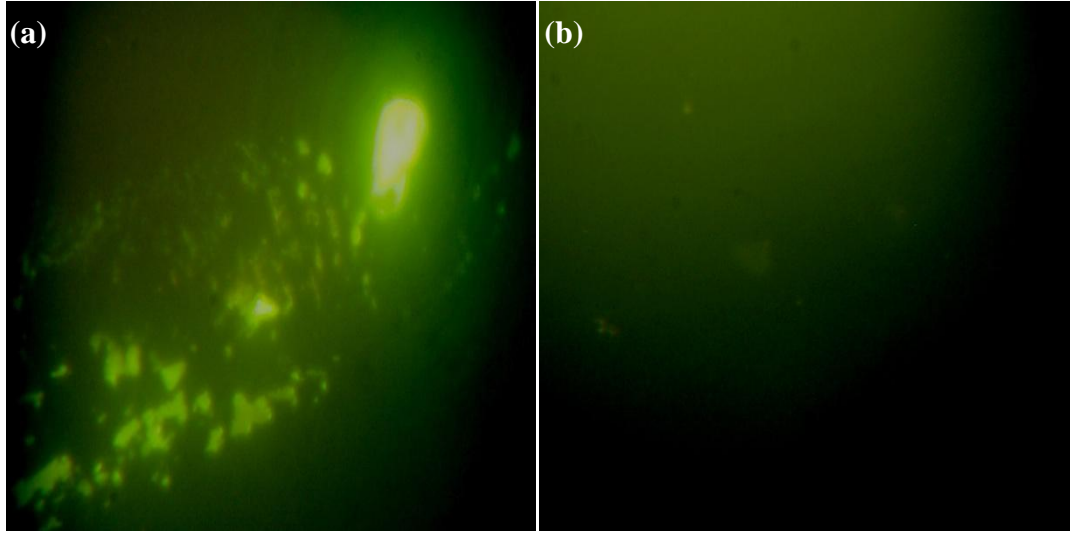
**Şekil 6.9** PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu sonrasında ölçülen İç Açıya karşılık Şiddet grafiği. ↔ işareti ile gösterilen hibridizasyon sonucu açının değişimi.

## 6.4 Optik Tabanlı DNA Biyosensörüne ait Yüzeylerin Floresan Mikroskopunda İncelenmesi

Prizma çiftleyici cihazıyla yapılan ölçüm sonuçlarını desteklemek amacıyla PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan DNA tutuklanmasından sonra FLSN (floresan) bağlı Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonu yapılmış ve numuneler floresan mikroskopunda incelenmiştir (Şekil 6.7). Bu mikroskopta uygun

dalga boyundaki ışık hedef oligonükleotidlerin floresan işaretlerini uyarır. Yüzeyde hedef oligonükleotidler varsa ışıma görünür, eğer yoksa arka plan görünür.

Buna göre Şekil 6.10' da görüldüğü gibi Eşlenik olan DNA hibridizasyonu kısmında (Şekil 6.10a) yer yer çok floresan ışıma görülürken, Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonunda (Şekil 6.10b) hemen hemen hiçbir ışımının görülmemesi tutuklanma ve bunu takiben yapılan hibridizasyon işleminin başarılı olduğunu göstermektedir.



**Şekil 6.10** FLSN bağlı (a) Eşlenik olan DNA, (b) Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonundan sonraki Floresan mikroskopu resimleri.

Burada 100  $\mu\text{M}$  gibi yüksek konsantrasyonda Prob DNA kullanıldığı için homojen olmayan bir parlama dağılımı görülmektedir. Festag et al.' da yaptıkları çalışmalarda bunu gözlemlemiştir [Festag et al., 2005]. Yüksek konsantrasyonlarda (100  $\mu\text{M}$ ) daha düşük konsantrasyonlara (50  $\mu\text{M}$ ) göre homojen olmayan bir ışıma dağılımı elde etmişlerdir. Bu çalışmayı hibridizasyon etkisi olmadan FLSN bağlı Prob DNA ile de denemişler ve aynı sonuca ulaşmışlardır. Ayrıca çalışmalarında Prob DNA tutuklanması için iki farklı yüzey kimyasalı olarak APTES/PDC ve GOPS (3-glisidoksipropiltrimetoksisilan) kullanmışlardır. Tutuklanma yöntemleri

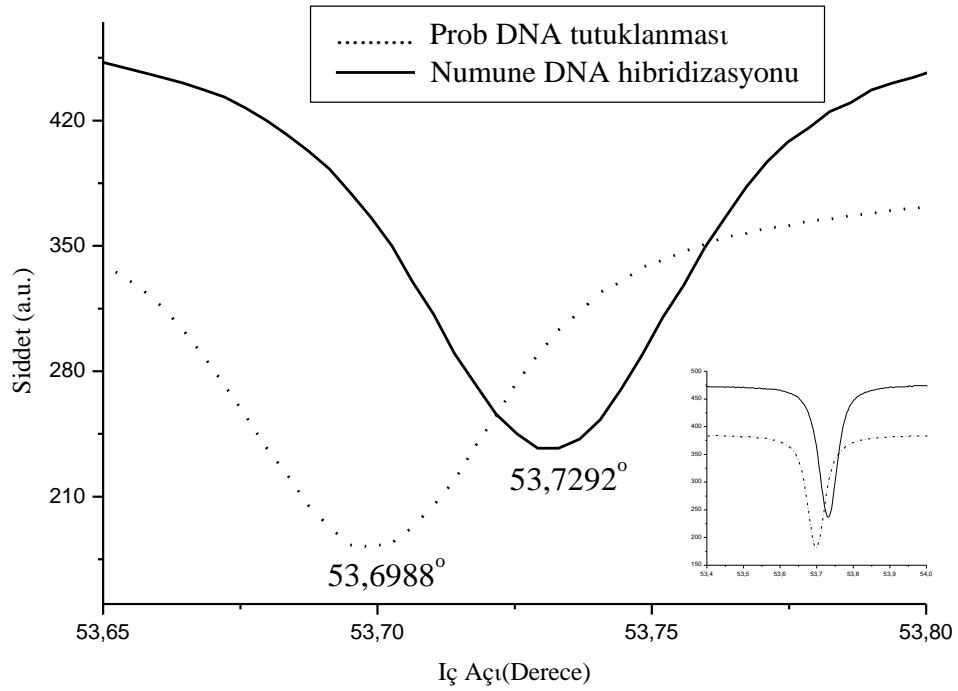
karşılaştırıldığında APTES/PDC bağlanmasıyla elde edilen resimlerde çok daha homojen bir DNA bağlanma dağılımı görmüşlerdir.

### 6.5 Evsel Atıksu Numunesinden İzole Edilen Bakteri DNA' sı ile Yapılan Prizma Çiftleyici Cihazı Ölçüm Sonuçları

PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan prob DNA tutuklanmasından önceki ölçülen değer 1,5827 iken prob DNA tutuklanmasından sonra ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,5835 olarak artmıştır. Sonrasında Hedef DNA olarak evsel atıksudan izole edilen bakteri DNA' sı (Numune DNA), Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan DNA hibridizasyonları yapılmıştır. Numune DNA hibridizasyonu sonucunda ölçülen ortalama kırılma indisi değeri 1,5841 ve Eşlenik olan DNA hibridizasyonu sonucunda ölçülen ortalama kırılma indisi değeri de 1,5857 olarak artarken, Eşlenik olmayan hibridizasyon da ise ortalama kırılma indisi değeri 1,5834 olarak ölçülmüştür. Ölçülen ortalama kırılma indisi değerleri ve standart sapmaları Tablo 6.3' de verilmiştir.

**Tablo 6.3** PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan DNA tutuklanması ve hibridizasyonu (Numune DNA, Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan DNA) için Prizma çiftleyici cihazı ortalama ölçüm sonuçları ve standart sapmaları.

	Prob DNA Öncesi	Prob DNA Sonrası	Numune DNA	Eşlenik olan DNA	Eşlenik olmayan DNA
Ortalama Kırılma İndisi Değerleri	<b>1,5827</b>	<b>1,5835</b>	<b>1,5841</b>	<b>1,5857</b>	<b>1,5834</b>
Standart Sapma	<b>0,00004</b>	<b>0,00004</b>	<b>0,00009</b>	<b>0,00005</b>	<b>0,00008</b>



**Şekil 6.11** PEG Katkılı İnce Filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Numune DNA hibridizasyonu sonrasında ölçülen İç Açığa karşılık Şiddet grafiği.

PEG katkılı ince filmler üzerine yapılan Prob DNA tutuklanması ve Numune DNA hibridizasyonu sonrası ölçülmüş olan ortalama kırılma indisi değerlerine karşılık gelen iç açığa karşı şiddet grafiği Şekil 6.11’ de verilmiştir. Kırılma indisi değerlerine karşılık gelen iç açı değerleri sırasıyla Prob DNA sonrası 53,6988°, numune DNA hibridizasyonu sonrası 53,7292°, eşlenik olan DNA hibridizasyonu sonrası 53,8128° ve eşlenik olmayan DNA sonrası ise 53,6950° olarak ölçülmüştür. Grafik ve ölçülen değerlerden açıkça görüldüğü gibi Numune DNA ve Eşlenik olan DNA kısımlarında artış olurken Eşlenik olmayan DNA kısmında ise bir değişim gözlenmemiştir. Bu sonuçlar sensörün doğru çalıştığını bir kez daha kanıtlamaktadır.

## 7. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce filmler istenilen özelliklerin sağlanabildiği düşük maliyetli bir yöntem olan sol-jel tekniği kullanılarak daldırarak kaplama cihazıyla kaplanmıştır. Hem prizma çiftleyici cihazı için uygun dalga kılavuzu özelliğine hem de DNA tutuklanması için uygun yüzeyde –OH gruplarına sahip filmler elde edilmiştir. Aynı zamanda DNA tutuklanma miktarını artırmak için de nanoboyutta homojen dağılmış porlara sahip yüzeyler sağlanmıştır. PEG 400 katkılı ince filmlerle daha poroz yüzeyler elde edilmiştir. Tüm bu özellikleriyle filmlerimiz biyosensör tasarımında kullanılabilir biyoalgılayıcı elementin (Prob DNA) tutuklanması için uygun yeni katı yüzeylerdir.

Film yüzeyine Prob DNA tutuklanması için kovalent bağlanma yöntemi seçilmiştir. Kovalent bağlanma diğer yöntemlere göre daha güçlü ve kararlı bir yöntemdir. Ayrıca kovalent bağlanma için APTES/PDC kimyasalları seçilmiştir. Bu da daha homojen bir bağlanma sağlamaktadır. Bu çalışmaya ilaveten film yüzeyinde microarray (desen, pattern) oluşturularak sol-jel içerisine hapsetmeyle (encapsulation) veya kovalent bağlamayla DNA tutuklanması gerçekleştirilebilir. Bu yöntemle de birden fazla çeşitte biyoalgılayıcı element tutuklanması ve böylece çoklu algılama yapılabilir.

Çevre izlemesi için Prob DNA olarak su kirliliğinin indikatör parametresi olan E.coli bakterisinin patojen bir türü olan E.coli O157:H7 seçilmiştir. Prob DNA konsantrasyonu olarak 100 µM tayin edilmiştir. Fakat daha düşük konsantrasyonlarda çalışarak daha homojen bir dağılım elde edilebilir. Bu çalışmada amacımız yeni bir optik dönüştürücü (prizma çiftleyici) ve yeni bir tutuklanma katı yüzeyiyle (SiO<sub>2</sub>-TiO<sub>2</sub> İnce filmler) çevre izlemesi için optik bir biyosensörün üretimi ve geliştirilmesidir. Başarıyla gerçekleştirilen bu çalışmanın ilerisinde yapılacak bir çalışmayla farklı tutuklanma konsantrasyonlarının ölçüme etkisi gösterilebilir.

Optik dönüştürücü olarak prizma çiftleyici cihazı kullanılmıştır. Prizma çiftleyici filmlerin kırılma indisini yüksek hassasiyette ölçen cihazlardır. Prizma çiftleyici cihazının biyosensörlerde dönüştürücü olarak kullanılması daha öncede bahsedildiği gibi yeni bir çalışmadır. Böylece doğrudan (işaretsiz) ölçüm yapabilen yeni bir optik biyosensör geliştirilmiştir. Prizma çiftleyici cihazının ileride küçültülebilir, taşınabilir (portable), yerinde ve doğrudan (işaretsiz) ölçümlere olanak tanınması da bu cihazın ilgi çeken yönlerindedir.

Çalışmamızda filmler üzerine Prob DNA tutuklanması ve sonrasında Hedef DNA (Eşlenik olan ve Eşlenik olmayan) hibridizasyonu sonucunda prizma çiftleyici cihazıyla ölçülen kırılma indisi değişimlerinden tutuklanmanın ve hibridizasyonun gerçekleşip gerçekleşmediği algılanmıştır. Bu ölçümlerden Prob DNA tutuklanmasının ve sonrasında Eşlenik olan DNA hibridizasyonunun başarıyla gerçekleştiği artan kırılma indisi değerlerinden ve aynı zamanda Eşlenik olmayan DNA tarafındaki hemen hiç değişmeyen kırılma indisi değerlerinden gösterilmiştir. Ayrıca evsel atıksu numunesinin filtreden süzülerek filtrede kalan bakterilerin DNA izolasyon kitiyle izole edilmesi sonucu elde edilen Numune DNA' da Hedef DNA olarak Prob DNA ile hibridize edilmiş ve Eşlenik olan DNA hibridizasyonun da olduğu gibi kırılma indisini artırdığı gözlenmiştir. Bu sonuçlar biyosensörümüzün çalıştığını kanıtlamaktadır.

## KAYNAKLAR

1. Rodriguez-Mozaz S. Alda M. J. L., Marco M.-P., Barcelo D., “Biosensors for environmental monitoring a global perspective”, *Talanta*, 65, p. 291-297 2005.
2. Sadik O.A., Mulchandani A., “Chemical and Biological Sensors: Meeting the Challenges of Environmental Monitoring”, *Chemical and Biological Sensors for Environmental Monitoring*, Sadik O.A., Mulchandani A., Ed., ACS Symposium Series 762, Chapter 1, p. 1-6, 2000.
3. Alocilja, E.C. and Radke, S.M., “Market analysis of biosensors for food safety”, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 841-846, 2003.
4. Lazcka O., Campo F.J.D., Muniz F.X., “Pathogen detection: A perspective of traditional methods and biosensors”, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, p. 1205-1217, 2007.
5. Fraden J., “Data Acquisition”, “Position, Displacement and Level” *Handbook of Modern Sensors, Physics, Design, and Applications*, Springer, 2004.
6. Biosensors, Lecture 17, <http://ocw.mit.edu/NR/rdonlyres/Materials-Science-and-Engineering/3-051JSpring-2006/09FC4F88-E15A-4B89-B28A-0CDD596FA246/0/lecture17.pdf>.
7. Rogers K. R., Mulchandani A., Zhou W. “Biosensor and Chemical Sensor Technology”, *Process Monitoring and Control*. American Chemical Society, Chapter 1, Washington, DC, 1995, pp: 2.
8. Goodsell D.S., “Biomolecular Design and Biotechnology”, *Bionanotechnology Lessons from Nature*, Wiley-Liss, Chapter 3, 2004, pp. 54-291.
9. Liu B.L., Saltman M.A., *Immunosensor Technology – Historical Perspective and Future Outlook*, *Laboratory Medicine*, 27, 1996, pp: 109-115.

10. Weiner H., "Enzymes: Classification, Kinetics, and Control", Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Devlin, T. M., Ed., Wiley: Hoboken, Chapter 10, NJ, 2006, pp: 366.
11. Dilsiz N., "Nükleik Asitlerin Yapısı", Moleküler Biyoloji, Palme Yayıncılık, Ankara, 2004.
12. Vilee C.A., Solomon E.P., Martin C.E., Martin D.W., Berg L.R., Davis P.W., "Genetics", Biology, Saunders College Publishing, 1989.
13. Temizkan G. "Genetik Materyal olarak Nükleik Asitlerin Yapı ve Özellikleri", Genetik, II. Moleküler Genetik, İ.Ü. Fen Fakültesi Basımevi, İstanbul, 1999.
14. Bal E.B.B., Karataş M., "Nükleik Asitler", Moleküler Biyoloji, Yıldırım A., Bardakçı F., Karataş M., Tanyolaç B., Ed., Bölüm 2, Nobel Yayın Dağıtım, 2007.
15. Alberts B., Johnson A., Alexander L., Julian R. and Martin R., Molecular Biology of the Cell, New York and London: Garland Science, 2002.
16. İnanc B., "Belirli Mikoplazma Türlerinin Tanısına Yönelik Optik Biyosensör Tasarımı", GYTE Biyoloji Bölümü Yüksek Lisans Tezi, 2008.
17. Brett A.M.O., "DNA-based Biosensors", Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques, Gorton L., Ed., Chapter 4, Elsevier, 2005.
18. Caruana D.J., "Hybridization at Oligonucleotide Sensitive Electrodes", Biosensors, Cooper J., Cass T., Ed., Chapter 2, Oxford University Press, 2004.
19. Büyükaksoy A., "P53 Geninin Nokta Mutasyonunu Sentetik Oligonükleotit Kullanarak Tespit Edebilen Optik Tabanlı DNA Biyosensörünün Geliştirilmesi", GYTE Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümü Yüksek Lisans Tezi, 2009.
20. Lemeshko S.V., Powdrill Y., Belosludtsev Y.Y., Hogan M., "Oligonucleotides Form a Duplex with Non- Helical Properties on a Positively Charged

- Surfaces”, *Nucleic Acids Research*, 29, p. 3051-3058, Oxford University Press, 2001.
21. Chan V., McKenzie S.E., Surrey S., Fortina P., Graves D.J., “Effect of Hydrophobicity and Electronics on Adsorption and Surface Diffusion of DNA Oligonucleotides at Liquid Solid Interfaces”, *Journal of Colloid and Interface Science*, 203, p. 197-207, Academic Press, 1998.
  22. Potansiyometri Esaslı Biyosensörler,  
[www.scribd.com/doc/9380782/biyosensörler-2](http://www.scribd.com/doc/9380782/biyosensörler-2).
  23. Amperometric Biosensors,  
[www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html](http://www.lsbu.ac.uk/biology/enztech/amperometric.html).
  24. Eggins B.R., “Introduction to Sensors”, *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, Ltd., 2002.
  25. Fan X., White I.M., Shopova S.I., Zhu H., Suter J.D., Sun Y., “Sensitive Optical Biosensors for Unlabeled Targets: A Review”, *Analytica Chimica Acta*, , 620, pp: 8–26, 2008.
  26. Lechuga L.M., “Optical Biosensors”, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Gorton L., Ed., Chapter 5, Elsevier, 2005.
  27. Homola J., Yee S.S., Gauglitz G., “Surface Plasmon Resonance Sensors: Review”, *Sensors and Actuators B*, 54, pp: 3–15, 1999.
  28. Lawrence C.R., Geddes N.J., “Surface Plasmon Resonance (SPR) for Biosensing”, *Handbook of Biosensors and Electronic Noses Medicine, Food, and Environment*, Kress-Rogers E., Ed., CRS press, p. 149-159, 1997.
  29. Liu X., Song D., Zhang Q., Tian Y., Zhang H., “An Optical Surface Plasmon Resonance Biosensor for Determination of Tetanus Toxin”, *Talanta*, 63, pp: 773-779, 2004.
  30. Prism Coupler, [http://en.wikipedia.org/wiki/Prism\\_coupler](http://en.wikipedia.org/wiki/Prism_coupler).

31. Metricon Corporation, Metricon Model 2010 Prism Coupler Thin Film Thickness/Refractive Index Measurement System Operation and Maintenance Guide- Windows Program, 2003 (<http://www.metricon.com>).
32. Rong G., Saarinen J.J., Sipe J.E., Weiss S.M., “High Sensitivity Sensor Based on Porous Silicon Waveguide”, Material Research Society Symposium Proceedings, San Francisco, USA, 2006.
33. De Tommasi E., De Stefano L., Rea I., Di Sarno V., Rotiroli L., Arcari P., Lamberti A., Sanges C., Rendina I., “Porous Silicon Based Resonant Mirrors for Biochemical Sensing”, *Sensors*, 8, pp: 6549-6556, 2008.
34. Shriver-Lake L.C., “Silane-modified Surfaces for Biomaterial Immobilization”, *Immobilized Biomolecules in Analysis A Practical Approach*, Cass T. and Ligler F.S., Ed., Oxford University Press, 1998.
35. Andreescu D., Andreescu S., Sadik O.A., “New Materials for Biosensors, Biochips and Molecular Bioelectronics”, *Biosensors and Modern Biospecific Analytical Techniques*, Gorton L., Ed., Chapter 7, Elsevier, 2005.
36. Brinker C.J., Scherer G.W., *Sol-Gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, p. 1-12, 787- 797, Academic Press, New York, 1990.
37. Sol-gel chemistry, <http://www.psrc.usm.edu/mauritz/solgel.html>.
38. Rickus J.L., Dunn B., Zink J.I., “Optically Based Sol-gel Biosensor Materials”, *Optical Biosensors: Present and Future*, 14, pp: 427-456, 2002.
39. Jeronimo P.C.A., Araujo A.N., Conceição M., Montenegro B.S.M., “Optical sensors and biosensors based on sol-gel films”, *Talanta*, 72, pp. 13-27, 2007.
40. Gill I., Ballesteros A., “Bioencapsulation within Synthetic Polymers (Part-1): Sol-gel Encapsulated Biologicals”, *Trends in Biotechnology*, 18, pp: 282–296, 2000.
41. Jin W., Brennan J.D., “Properties and Applications of Proteins Encapsulated Within Sol-Gel Derived Materials”, *Analytica Chimica Acta*,

- 461, pp: 1–36, 2002.
42. Avnir D., Braun S., Lev O., Ottolenghi M., “Enzymes and Other Proteins Entrapped in Sol-Gel Materials”, *Chemistry of Materials*, 6, pp: 1605, 1994.
  43. Dave B.C., Dunn B., Valentine J.S., Zink J.I., “Sol-Gel Encapsulation Methods for Biosensors”, *Analytical Chemistry*, 66, pp: 1120A-1127A, 1994.
  44. Peralta-Perez M.R., Saucedo-Castaneda G., Gutierrez-Rojas M., “SiO<sub>2</sub> Xerogels: A Suitable Inert Support for Microbial Growth”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 20, pp: 105-110, 2001.
  45. Coiffier A., Coradin T., Roux C., Bouvet O.M.M., Livage J., “Sol- Gel Encapsulation of Bacteria: a Comparison between Alkoxide and Aqueous Routes”, *Journal of Materials Chemistry*, 11, pp: 2039-2044, 2001.
  46. Nassif N., Bouvet O., Rager M.N., Roux C., Coradin T., Livage J., “Living Bacteria in Silica Gels”, *Nature Materials*, 1, pp: 42-44, 2002.
  47. Fennouh S., Guyon S., Jourdat C., Livage J., Roux C., “Encapsulation of Bacteria in Silica Gels”, *Comptes rendus de l’Academie des sciences Paris IIc.*, pp: 625-630, 1999.
  48. Sglavo V.M., Carturan G., Dal Monte R., Muraca M., “SiO<sub>2</sub> Entrapment of Animal Cells”, *Journal of Material Science*, 34, pp: 3587-3590, 1999.
  49. Carturan G., Dal Monte R., Pressi G., Secondin S., Verza P., “Production of Valuable Drugs from Plant Cells Immobilized by Hybrid Sol-Gel SiO<sub>2</sub>”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 13, pp: 273-276, 1998.
  50. Numata M., Sugiyasu K., Hasegawa T., Shinkai S., “Sol-Gel Reaction Using DNA as a Template: An Attempt Toward Transcription of DNA into Inorganic Materials”, *Angewandte Chemie International Edition*, 43, pp: 3279-3283, 2004.

51. Halkman A.K., Noveir M.R., Doğan H.B., “Escherichia coli O157:H7 Serotipi”, Ankara Üniversitesi Ziraat Fakültesi Gıda Mühendisliği Bölümü, Ankara, 2001.
52. Basic Information about E.coli O157:H7 in Drinking Water, <http://www.epa.gov/safewater/contaminants/ecoli.html#two>.
53. Kato K., “Reactions of Alkoxides Toward Nanostructured or Multicomponent Oxide Films”, Sol–Gel Science and Technology, Saka S., Ed., 1, Chapter 2., 2005, pp: 14-58.
54. Wang H., Zhong W., Xu P., Du Q., “Polyimide/Silica/Titania Nanohybrids via a Novel Nonhydrolytic Sol–Gel Route”, Composites: Part A-Applied Science and Manufacturing, 36, pp: 909–914, 2005.
55. Tian X., Chen Q., Song L., Wang Y., Li H., “Formation of Alkali Resistant PDMS–TiO<sub>2</sub>–SiO<sub>2</sub> Hybrid Coatings”, Materials Letters, 61, pp: 4432–4434, 2007.
56. Song C.F., Lü M.K., Yang P., Xu D., Yuan D.R., “Structure and photoluminescence properties of sol–gel TiO<sub>2</sub>–SiO<sub>2</sub> films”, Thin Solid Film, 413, pp: 155-159, 2002.
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., Mascini M., “Direct immobilisation of DNA probes for the development of affinity biosensors”, Bioelectrochemistry, 66, p. 129-138, 2005.
58. Festag G., Steinbrück A., Wolff A., Csaki A., Möller R., Fritzsche W., “Optimization of Gold Nanoparticle-Based DNA Detection for Microarrays”, Journal of Fluorescence. 15, p. 161–170, 2005.
59. Rong G., Najmaie A., Sipe J.E., Weiss S.M., “Porous Silicon Waveguides for DNA Detection”, 3rd IEEE International Conference on Group IV Photonics, Ottawa, Canada, p. 13–15, 2006.

## **ÖZGEÇMİŞ**

1978 yılında Kütahya’ da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Kütahya’da tamamladı. Lisans eğitimini 2001 yılında Anadolu Üniversitesi Seramik Mühendisliğinde, Yüksek Lisans eğitimini de 2004 yılında Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Malzeme Bilimi ve Mühendisliği Bölümünde bitirdi. Halen Gebze Yüksek Teknoloji Enstitüsü Çevre Mühendisliği Bölümünde Uzman olarak çalışmaktadır.