

**DNA'YI TANIMA BÖLGELERİNE SAHİP
MOLEKÜLER BASKILANMIŞ POLİMER
TEKNİĞİNE DAYALI
BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ**

Sibel EMİR DİLTEMİZ
Doktora Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı
Ağustos-2006

**Bu tez çalışması Anadolu Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu
Başkanlığı tarafından desteklenmiştir.
Proje no:05 10 36**

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

Sibel EMİR DİLTEMİZ'in "DNA'yı Tanıma Bölgelerine Sahip Moleküler Baskılanmış Polimer Tekniğine Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi" başlıklı **Kimya** Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 03-08-2006 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	:Doç.Dr. Rıdvan SAY
Üye	:Prof.Dr. Tefvik GEDİKBEY
Üye	:Prof.Dr. Adil DENİZLİ
Üye	:Doç.Dr. Arzu ERSÖZ
Üye	:Yard.Doç.Dr. Deniz HÜR

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET**Doktora Tezi****DNA'YI TANIMA BÖLGELERİNE SAHİP MOLEKÜLER BASKILANMIŞ
POLİMER TEKNİĞİNE DAYALI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ****Sibel EMİR DİLTEMİZ****Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı****Danışman: Doç.Dr. Rıdvan SAY
2006, 141 sayfa**

Bu çalışmada, nükleotid belleklere sahip kendi organize olabilen Yüzey Plazmon Rezonans (SPR) çiplerin ve Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) elektrotların DNA tayininde kullanılması, tasarlanılan moleküler baskılanmış polimerik (MIP) filmlerin moleküler tanımlama açısından değerlendirilmesi ile guanozin belleklerle donatılan nanokabuklara sahip CdS kuvantum nokta nanosensörlerin hazırlanması ve DNA tanıma bölgeleri açısından değerlendirilmesi araştırılmıştır. Çalışmanın birinci aşamasında, molekül belleklerin oluşturulması basamağında kullanılmak üzere metakroilamidosisitein (MAC), metakroilamidohistidin (MAH), MAC-Hg(II) ve MAH-Pt(II) monomer sistemlerinin sentezi ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın ikinci bölümünde, MAH-Pt(II)-Guanozin, MAC-Hg(II)-Adenin ve MAH-Pt(II)-Guanin ön organize monomer sistemleri kullanılarak DNA'nın bağlanma bölgelerini tanıyan belleklerin SPR çip ve QCM elektrot yüzeyinde oluşturulması çalışmaları yapılmıştır. Çalışmanın üçüncü bölümünde ise guanozin belleklere sahip CdS kuvantum nokta nanosensörlerin DNA tanıma bölgeleri açısından etkinliği ve guanozin, guanin, ss-DNA, ds-DNA tayininde kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Molekül Baskılanmış Polimerler (MIP), Yüzey Plazmon Rezonans (SPR), Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM), Kuvantum Nokta Nanokristaller, Guanozin bazlı sentetik reseptörler, CdS nanokristaller

ABSTRACT**PhD Dissertation****INVESTIGATION OF THE BIOSENSOR BASED ON MOLECULAR
IMPRINTING POLYMER TECHNIQUE CONTAINING DNA RECOGNITION
SITES****Sibel EMİR DİLTEMİZ****Anadolu University
Graduate School of Sciences
Chemistry Program****Supervisor: Assoc.Prof.Dr. Rıdvan SAY
2006, 141 pages**

In this work, the usage of self organized surface plasmon rezonance (SPR) chips and quartz crystal microbalance (QCM) electrode containing nucleotide memories for DNA assay, evaluating molecular imprinted polymeric films (MIP) for molecular recognition, preparation of CdS quantum dots having nanoshells with guanozin memory and evaluation of these quantum dots for DNA recognition have been investigated. At first stage; synthesis and characterization of methacrylolcystein (MAC), methacrylolhistidine (MAH), [MAC-Hg(II)] and [MAH-Pt(II)] monomers have been done in order to use in the preparation of molecular memories. In the second part; the preparation of memories for the recognition of DNA binding site on the surface of SPR chips and QCM electrode using MAH-Pt(II)-Guanosine, MAC-Hg(II)-Adenine and MAH-Pt(II)-Guanine pre-organized monomers have been done. In the third stage; efficiency of CdS quantum dots having guanosine memory on DNA recognition sites and using these nanosensors in the determination of guanosine, guanine, ss-DNA and ds-DNA have been investigated.

Keywords: Molecularly Imprinted Polymers (MIP), Surface Plasmon Rezonance Spectroscopy (SPR), Quartz Crystal Microbalance (QCM), Quantum Dot Nanocrystals, Guanosine Synthetic Receptors, CdS nanocrystals

TEŞEKKÜR

Bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, teorik bilgi birikiminden pratik uygulamalara dek bütün süreçlerde bilgi ve tecrübesinden yararlandığım, bana büyük bir ilgi ve anlayışla yaklaşan Danışman Hocam Sayın Doç. Dr. Rıdvan SAY'a,

Çalışmalarım boyunca bölümümüz imkanlarından yararlanmamı sağlayan Kimya Bölüm Başkanımız Sayın Prof. Dr. Lale ZOR'a,

Deneysel çalışmalarım boyunca ilgi ve yardımıyla her zaman yanımda olan, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı Sayın Doç. Dr. Arzu ERSÖZ'e,

Çalışmalarım boyunca desteğini ve ilgisini eksik etmeyen Sayın Prof. Dr. Tevfik GEDİKBEY'e,

Tez çalışmalarımda yardımlarını eksik etmeyen ve deneysel çalışmalarım katkıda bulunan Sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye,

Deneysel çalışmalarımındaki TEM analizlerindeki katkılarından dolayı Sayın Prof. Dr. Mehtap KUTLU ve Arzu İŞCAN'a, CP-MAS-¹³C-NMR analizlerindeki katkılarından dolayı Sayın Araş. Gör. Özgür ALVER'e

Tez çalışmam süresince hoşgörü, sabır ve yardımlarından dolayı, Ayça ATILIR, Yasemin ÇİMEN, Filiz YILMAZ, Sibel BÜYÜKTİRYAKİ, S. Funda EKTİ ve tüm arkadaşlarıma,

Manevi destekleriyle her zaman yanımda olan canım ANNEM ve BABAM'a

Hayatımın her aşamasında sevgi, emek ve desteğiyle daima yanımda olan hayat arkadaşım Seyit Fehmi DİLTEMİZ'e ve gösterdiği sabırdan dolayı KIZIM'a

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Sibel EMİR DİLTEMİZ

Ağustos-2006

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xiii
1.GİRİŞ	1
1.1.Nükleik asitler	4
1.1.1.Şekerler	5
1.1.2. Pürin ve Pirimidin bazları	6
1.1.3. Nükleozitler.....	7
1.1.4. Nükleotidler	8
1.1.5. Polinükleotidler.....	9
1.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP).....	12
1.2.1. Moleküler baskılanmış polimer hazırlama teknikleri	13
1.2.2. Farklı MIP hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları	17
1.2.3. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerler	19
1.2.4. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar	22
1.2.5. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çözücüler	24
1.2.6. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları	24
1.3. Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi (SPR)	25

1.3.1. SPR'in teorisi	25
1.3.2. Otto konfigürasyonu	33
1.3.3. Kretschmann konfigürasyonu	34
1.3.4. Ligand immobilizasyonu	35
1.3.5. Kovalent immobilizasyon	35
1.3.6. Kovalent olmayan immobilizasyon	35
1.3.7. SPR sensörlerin uygulama alanları	36
1.4. Kuvars Kristal Mikroterazi	36
1.4.1. Sensörler	36
1.4.2. Gravimetrik sensörler	37
1.4.3. Piezoelektrik etki	38
1.4.4. Sauerbrey eşitliği	41
1.4.5. Sıcaklığın rezonans frekansına etkisi	43
1.4.6. Kuvars kristal mikroterazi uygulamaları	43
1.5. Kuantum Nokta Nanopartiküller (Nanokristaller)	45
1.5.1. Nanopartiküllerin özellikleri	49
1.5.2. Kuantum nokta nanopartiküllerin sentezi	51
1.5.3. Kuantum nokta nanopartiküllerde optik algılama	61
1.5.4. Floresans esaslı kuantum nokta nanosensörler	62
1.5.5. Floresans rezonans enerji-transfer esaslı kuantum nokta nanosensörler	64
1.5.6. Yüzey plazmon rezonans uygulamaları	64
1.5.7. Fosforesans esaslı kuantum nokta nanosensörler	65
2. MATERYAL VE YÖNTEM	66
2.1. Materyal	66
2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	66
2.1.2. Kullanılan cihazlar	67
2.2. Yöntem	67
2.2.1. Metakrilamidosisstein (MAC) monomerinin sentezi	67
2.2.2. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi	67

2.2.3. Metakrilamidohistidin-Pt(II)-[MAH-Pt(II)] metal-şelat monomeri sentezi.....	68
2.2.4. Metakrilamidosisistein-Hg(II) [MAC-Hg(II)] metal-şelat monomeri sentezi.....	68
2.2.5. Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Guanozin [MAH-Pt(II)-Gz] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu	68
2.2.6. Metakrilamidosisistein-Hg(II)-Adenin [MAC-Hg(II)-Ad] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu	69
2.2.7. Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Guanin [MAH-Pt(II)-Gu] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu	69
2.2.8. Guanozin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması	69
2.2.9. Adenin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması	71
2.2.10. Guanin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması	73
2.2.11. Guanozin baskılanmış QCM elektrotun hazırlanması	75
2.2.12. Guanozin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri	75
2.2.13. Adenin baskılanmış QCM elektrotun hazırlanması	76
2.2.14. Adenin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri	76
2.2.15. Guanin baskılanmış QCM elektrotun hazırlanması	77
2.2.16. Guanin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri	77
2.2.17. Guanozin baskılanmış nanokabuklara sahip kuvantum nokta nanosensörlerin hazırlanması	78
2.2.18. Guanozin baskılanmış CdS nanokristallerin luminesans ölçümleri	80
3. BULGULAR	81
3.1. Hazırlanan Monomerlerin Karakterizasyonu	81
3.1.1. MAC ve MAC-Hg(II) monomerlerinin karakterizasyonu	81
3.1.2. MAH ve MAH-Pt(II) monomerlerinin karakterizasyonu	85

3.1.3. CdS nanosensörlerin ¹³ C-NMR ve TEM karakterizasyonları	90
3.2. Guanozin, Adenin ve Guanin Baskılı Polimerler İle SPR Ölçümleri	96
3.2.1. Guanozin baskılı SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi	96
3.2.2. Adenin baskılı SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi	100
3.2.3. Guanin bellekli SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi	103
3.3. Guanozin, Adenin ve Guanin Baskılı Polimerler İle QCM Ölçümleri	106
3.3.1. Ligand etkileşimi aracılığıyla guanozin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü	106
3.3.2. Guanozin baskılanmış QCM elektrotun seçiciliği	109
3.3.3. Guanozin baskılanmış QCM elektrotun analitik performansı	110
3.3.4. Ligand etkileşimi aracılığıyla adenin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü	111
3.3.5. Adenin baskılanmış QCM elektrotun seçiciliği	113
3.3.6. Adenin baskılanmış QCM elektrotun analitik performansı	114
3.3.7. Ligand etkileşimi aracılığıyla guanin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü	114
3.3.8. Guanin baskılanmış QCM elektrotun seçiciliği	116
3.3.9. Guanin baskılanmış QCM elektrotun analitik performansı	117
3.4. Moleküler Baskılı Nanokabuk Sensörlerin Etkinliği	118
4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER	126
KAYNAKLAR	130

ŞEKİLLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Riboz ve deoksiriboz şekerleri	6
1.2. Pürin ve pürimidin bazlarının yapıları	7
1.3. Çeşitli nükleozitler	8
1.4. DNA ve RNA'daki nükleotitler	9
1.5. DNA çift sarmal yapısı.....	10
1.6. DNA çift sarmalı bağlanmalar	11
1.7. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları	14
1.8. Kovalent ve kovalent olmayan moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü.....	15
1.9. AIBN'in termal bozunma reaksiyonu	16
1.10. Radikal polimerizasyonunda oksijen ile başlatıcı radikal reaksiyonları.....	16
1.11. Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri.....	19
1.12. Kovalent olmayan molekül baskılanmış polimer hazırlamada kullanılan metakrilik asit (MAA) yapısı	21
1.13. Yüzey plazmonlarının titreşimleri sonucu elektromanyetik dalga oluşumu	27
1.14. Optik ortam arayüzeyine iletken film yerleştirildiğinde oluşan yüzey plazmon rezonansı	28
1.15. Prizma esaslı, Grating esaslı ve Optik dalga yönlendirici esaslı SPR sistemleri	30
1.16. Yüzey plazmon rezonans spektroskopisi	31
1.17. SPR çip yüzeyinde oluşan etkileşimler ve elde edilen sensogram.....	32
1.18. Yüzey plazma dalgasının Otto konfigürasyonu	33
1.19. Yüzey plazma dalgasının Kretschmann konfigürasyonu.....	34
1.20. Sensörlerin genel gösterimi.....	37
1.21. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi	39

1.22. AT-kesim kuvars kristal düzlemi	40
1.23. Kuvars kristal mikroterazinin basitleştirilmiş bir modeli.....	41
1.24. Kuvars kristal elektrot şekli	45
1.25. Kuantum nokta nonopartiküllerin büyüklüğünün diğer materyallerle kıyaslanması.....	46
1.26. Organik florofor grubu ile kuantum nokta nonopartiküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumları	48
1.27. Farklı büyüklükteki nanopartiküllerin farklı dalga boylarında ışığı yayması	49
1.28. Polimerik nanopartikül oluşum aşamaları.....	52
1.29. Zaman ve derişime bağılı olarak çekirdekleşme, büyüme ve agregasyon.....	53
1.30. Farklı oranlardaki $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ile hazırlanan nanopartiküllerin büyüklükleri ve büyüklük dağılımı	54
1.31. Farklı zamanlarda hazırlanan CdS-çitosan kompozitinin UV-vis spektrumu ve zamanla partikül büyüklüğünün değişimi	56
1.32. Farklı derişimlerdeki Cd^{2+} ile hazırlanan CdS-çitosan kompozitinin UV-vis spektrumu ve değişen Cd^{2+} derişimiyle partikül büyüklüğünün değişimi	57
1.33. Organometalik yolla CdS sentezi.....	59
2.1. SPR sensör yüzeyindeki guanozin bellek oluşumu.....	70
2.2. SPR sensör yüzeyindeki adenin bellek oluşumu.....	72
2.3. SPR sensör yüzeyindeki guanin bellek oluşumu	74
2.4. Guanozin baskılı CdS nanokristallerin şematik gösterimi	79
3.1. Metakrilamidosisitein monomerinin molekül formülü	81
3.2. MAC monomerinin NMR spektrumu	82
3.3. MAC monomerinin FT-IR spektrumu	83
3.4. MAC-Hg(II) monomerinin yapısı	83
3.5. MAC ve MAC-Hg(II) metal şelat monomerine ait FTIR spektrumları.....	84
3.6. MAC ve MAC-Hg(II) metal şelat monomerine ait Raman spektrumları	85

3.7. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü	85
3.8. MAH monomerinin ¹ H-NMR spektrumu	86
3.9. MAH-Pt(II) monomerinin FT-IR spektrumu	87
3.10. MAH-Pt matiks 2,5-dihidroksibenzoik asit olduğunda MALDI-TOF-MS kütle spektrumu.....	88
3.11. MAH-Pt matiks α-Cyano-4-hidroksicinnamic acid olduğunda MALDI-TOF-MS kütle spektrumu.....	89
3.12. Metakrilamidosisiteïn ile aktive edilmiş CdS nanopartiküllerin ve guanozin baskılı nanosensörlerin kalıp uzaklaştırılmadan önce ve sonra alınan ¹³ C CP-MAS NMR spektrumları.....	91
3.13. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin TEM görüntüsü	93
3.14. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce TEM görüntüsü	94
3.15. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırıldıktan sonra TEM görüntüsü.....	95
3.16. Guanozin baskılanmış ve baskılanmamış filmlere substratların adsorpsiyon izotermeleri.....	97
3.17. Guanozin bellekli SPR sensörün adenozin ve diğer substaratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri.....	98
3.18. Adenin baskılanmış ve baskılanmamış filmlere substratların izotermeleri	100
3.19. Adenin bellekli SPR sensörün adenin ve diğer substaratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri.....	102
3.20. Guanin Baskılanmış ve Baskılanmamış Filmlere Substratların İzotermeleri.....	104
3.21. Guanin bellekli SPR sensörün adenin ve diğer substaratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri.....	105
3.22. Guanozin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri.....	107
3.23. Guanozin baskılı polimerin Scatchard eğrisi	108
3.24. Guanozin ve adenozin için QCM sensör verileri	110
3.25. Guanozin sensör için kalibrasyon grafiği.....	111
3.26. Adenin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri	112

3.27. Adenin baskılı polimerin Scatchard eğrisi	112
3.28. Adenin ve adenzin için QCM sensör verileri.....	113
3.29. Adenin sensör için kalibrasyon grafiği	114
3.30. Guanin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri	115
3.31. Guanin baskılı polimerin Scatchard eğrisi	116
3.32. Guanin ve guanozin için QCM sensör verileri.....	117
3.33. Guanin sensör için kalibrasyon grafiği	118
3.34. Nanokristallerin 600 nm'deki floresans şiddetindeki değişim.....	119
3.35. Guanozin baskılı CdS nanosensörün guanozin ve diğer substratlara ilişkin floresans şiddetine bağlı adsorpsiyon izotermi.....	120
3.36. CdS nanokristallerin Langmuir adsorpsiyon analizi.....	122
3.37. CdS nanokristallere guanozin, guanin, ss-DNA, ds-DNA ve adenozinin Scatchard analizleri	122

ÇİZELGELER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
1.1. Pürin ve pürimidin bazları.....	6
1.2. RNA ve DNA arasındaki farklılıklar	9
1.3. Molekül baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler	20
1.4. Molekül baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar.....	22
1.5. SPR parametreleri ve bunlara karşılık gelen değerler.....	33
1.6. AT-kesimli ($35^{\circ} 10'$) kuvars kristal rezonatörün sıcaklık etkisiyle frekans kayma değerleri	43
1.7. Kuantum nokta nanokristaller kullanılarak yapılmış tayinler.....	63
3.1. Guanozin baskılı polimerin adenezine göreceli afinite sabitleri.....	99
3.2. Adenin baskılı polimerin guanozine göreceli afinite sabitleri	102
3.3. Guanin baskılı polimerin adenine göreceli afinite sabitleri	106
3.4. Guanozin baskılı nanokristallerin Langmuir ve Scatchard analizlerinin karşılaştırılması	124

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

Ad	: Adenin
AIBN	: 2,2'-azobisisobütironitril
Az	: Adenozin
DNA	: Deoksiribonükleik asit
ds-DNA	: Çift zincir deoksiribonükleik asit
EDMA	: Etilenglikoldimetakrilat
Gu	: Guanin
Gz	: Guanozin
MAC	: Metakrilamidosistein
MAC-Hg(II)	: Metakrilamidosistein-Hg(II)
MAC-Hg(II)-Ad	: Metakrilamidosistein -Hg(II)-Adenin
MAH	: Metakrilamidohistidin
MAH-Pt(II)	: Metakrilamidohistidin-Pt(II)
MAH-Pt(II)-Gu	: Metakrilamidohistidin -Pt(II)-Guanin
MAH-Pt(II)-Gz	: Metakrilamidohistidin -Pt(II)-Guanozin
MIP	: Molekül baskılanmış polimerler
N,N'-MBAA	: N,N'-metilbisakrilamid
QCM	: Kuvars kristal mikroterazi
RNA	: Rübönükleik asit
SPR	: Yüzey plazmon rezonans
ss-DNA	: Tek zincir deoksiribonükleik asit

1. GİRİŞ

Son yıllarda biyoteknoloji, biyokimya, tıp ve eczacılık alanlarındaki gelişmeler, özellikle genetik mühendisliğinde sağlanan ilerlemeler, biyomoleküllerin (enzimler, proteinler, hormonlar, nükleik asitler, vb) sentetik ortamlarda, büyük kapasitelerle endüstriyel üretimini gündeme getirmiştir. Modern biyoteknolojik yöntemlerle üretilen veya biyolojik çevrelerinden (kan, vücut sıvısı, vb) ayrılarak elde edilen biyomoleküllerin çoğu sağlıkla ilgili alanlarda kullanıldığından ürünlerin yeterli saflıkta olması gerekmektedir. Bu da doğal olarak araştırmacıların ve endüstrinin biyomoleküllerin ayrılma ve saflaştırma yöntemleri ile daha yoğun bir şekilde ilgilenmelerine yol açmıştır. Biyomoleküllerin saflaştırılmasında ürün saflığının yanı sıra üzerinde durulması gereken en önemli husus şüphesiz ürünün biyolojik aktivitesini uygulanan işlemlerle kaybetmemesidir. Ürünün çok saf olması ve biyolojik aktivitesinin korunması zorunluluklarına ilave olarak biyomolekülün kompleks bir ortamdan ayrılması, biyomolekül saflaştırılmasında kullanılacak yöntemleri ve koşulları kısıtlamaktadır (Turkova 1992).

Geçen yirmi yıl içerisinde sensör teknolojisi alanında oldukça fazla sayıda çalışma gerçekleştirilmiştir. Biyosensörler yüksek seçicilikleri ve spesifiklikleri nedeniyle oldukça ilgi çekmektedirler. Kimyasal sensörler, bir çok engel yapıcı türler varlığında hedef molekülün tanınması imkanını sağlayarak geleneksel teknolojilere alternatif olan kuvvetli ve ucuz bir yöntemdir. Yöntem bir çok farklı hedef türler için geliştirilmiştir. Örneğin anestetikler, toksikler, sinir gazları, çeşitli metabolik moleküller (glukoz, üre, hormon, steroid), ağır metaller ve iyonlar, proteinler ve mikroorganizmalar (bakteri, virüs, parazit) için geliştirilmiş sensörler bulunmaktadır. Bununla birlikte biyosensörler kolay bozulan biyolojik tanıma elementlerine (enzim veya antibadiler gibi) dayandığı için, kararlılıklarının az olması ve cihazların depolanması gibi sorunlar ortaya çıkmıştır. Bu nedenle de biyosensörler beklenen ticari başarıya ulaşamamıştır.

Bir alternatif sağlamak amacıyla ortaya çıkan yeni bir teknoloji "Moleküler Baskılama" olarak adlandırılmıştır. Bu teknikte seçici moleküler tanıma özelliklerine sahip olan oldukça kararlı sentetik polimerler

hazırlanmaktadır. Hazırlanan bu polimer matrikslerindeki tanıma yerleri, analitin fonksiyonel gruplarının biçim ve konumlarını tamamlayıcı niteliktedir. Bu polimerlerin bazıları monoklonal antibadiler ve reseptörler gibi doğal tanıma sistemleriyle karşılaştırılabilir ölçüde yüksek seçicilik ve afiniteye sahiptirler, bu da onları analitik kimya için oldukça uygun bir kimyasal sensör üyesi yapmaktadır.

Deoksiribonükleik asit (DNA), genetik bilginin bir nesilden diğerine aktarılmasında önemli rol oynadığı bilinen, yaşam molekülü olarak düşünülür. DNA tayini moleküler biyoloji, klinik tanımlama, tarım, adli tıp ve patojenlerin belirlenmesinde oldukça geniş uygulama alanlarına sahiptir. DNA biyosensörlerin geliştirilmesi bu cihazların analizlerde hızlı ve etkili cevap verebilme yeteneklerinden dolayı oldukça günceldir. Spesifik gen dizilimlerinin belirlenmesi için kullanılan geleneksel yöntemler hibridizasyon, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve çeşitli kimyasal yöntemler temeline dayanır. Bu pahalı, zaman alıcı teknikler uzmanlık ve oldukça zaman alan örnek hazırlama süreçleri gerektirmektedir. Bu gibi zorlukların üstesinden gelebilmek için pek çok araştırmacı fiziksel bir transduser (optik, piezoelektrik ya da elektrokimyasal) ile birleştirilmiş uygun destek üzerine DNA probe immobilizasyonu temeline dayanan DNA biyosensör hazırlamışlardır. DNA biyosensör hazırlamak için uygun destek üzerine çift zincir veya yek zincir DNA'nın immobilizasyonu gerçekleştirilir. Grafit (Wang ve Kawde 2001), cam karbon elektrot (La-Scalea ve ark. 2002), iletken polimerler (Cha ve ark. 2002; Lassalle ve ark. 2001; Youssoufi ve Makrouf 2002; Garnier ve ark. 1999; Malhotra ve ark. 2006) ve cam substratlar gibi çeşitli destekler DNA'nın immobilizasyonu için kullanılmıştır.

Moleküler baskılanmış polimerlerin DNA ve benzeri biyolojik aktif moleküllerin izlenmesi ve tayininde kullanılması amacıyla elipsometri (Andersson ve ark. 1988), doğrusal dikroizm (Steinke ve ark. 1995), fiber optik floresans (Jenkins ve ark. 1999), yüzey plasmon rezonans (SPR) (Vlatakis ve ark. 1993), kuvarz kristal mikroterazi (QCM) (Lin ve ark. 2004) gibi yöntemlerle birlikte hibrit optik sensör geliştirilmesine dayanan çalışmalara literatürde son zamanlarda sık sık rastlanmaktadır.

MIP'lerin, biyolojik aktif moleküllerin seçici ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılması temelinde; proteinlerin, amino asitlerin rasemik ayrılmasına ve peptid ayrılmasına yönelik çalışmalar bulunmaktadır. Bu yöntem ile L-fenil alanin ve L-valin gibi aminoasitler ve peptidler, etiladenin gibi nükleotid baz analogları, efedrin, psödefrin gibi B. adrenerjik uyarıcılar ile timolol, propranolol gibi B. Adrenerjik blokerler, kolesterol, kortikosteroidler, testosteron gibi hormonlar için baskılanmış polimer temelli afinite taşıyıcıları hazırlanmıştır. Sonuç olarak bu moleküler baskılanmış ve hedef molekül tanıma yeteneği olan taşıyıcı polimerlerin saflaştırılması istenilen hedef moleküle mükemmel bir seçicilik gösterdiği ve başarıyla uygulanabildiği kanıtlanmıştır (Haupt ve Mosbach 2000).

Moleküler baskılanmış polimer ile kuvarz kristal mikrobalsans (QCM)'nin birleştirilmesiyle yapılan sensör dizaynı ilk olarak Mosbach ve ark.(1997) tarafından bildirilmiştir. Bu tip QCM sensörleri altın elektrotlar üzerinde baskılanmış polimer tabakası içerirler. QCM direkt moleküler tanıma tayinlerinde oldukça kullanışlı bir nicel tekniktir. QCM aparatları elektrot üzerindeki kütle değişimine göre frekans değişimi gösterirler. Bu nedenle bu teknik moleküler baskılı polimerle yapılan tanıma işlemini, sensör sinyaline dönüştürmek için oldukça uygundur. Baskılanmış polimerlerle birleştirilmiş QCM sensörleri biyomimetik ve kimyasal alanlarda uygulanmaktadır.

Chun Zhou ve ark. (2001) kuvarz kristal mikrobalsansa dayalı mikrogravimetrik bir DNA sensörü geliştirmişler, oligonükleotid immobilizasyon yöntemleri ve genetik teşhislerdeki uygulamaların karşılaştırmasını yapmışlardır. Genetik β -talasemi mutasyonlarındaki bölgeleri tamamlayıcı bir 18-mer DNA probu QCM elektrodu üzerine kovalent bağ veya elektrostatik adsorbsiyon yoluyla immobilize etmişlerdir. DNA sensörlerinin kinetiğini in-situ frekans değişimleri yoluyla çalışmışlardır. Hibridizasyonda kullanılan hedef nükleik asit derişimini ve tampon çözeltinin iyonik etkisini de çalışmışlardır. Üretilen DNA biyosensör bir dizi gerçek örnek tayininde kullanılmıştır .

MIP ve SPR teknolojilerinin birlikte kullanıldığı çalışmalara bakıldığında ise çok az yayına (5' i geçmeyen) ve Temmuz 2003 tarihinde onaylanan 500.000 \$ lık NSF projesine rastlanmaktadır. Bu çalışmalardan Taniwaki ve ark'nın (2003)

yapmış olduğu çalışma biyomakro-moleküllerin baskılandığı tek çalışma olup, SPR spektroskopisiyle polisulfon ile SPR'nin altın çip yüzeyinde MIP yüzey oluşturularak oligopeptid moleküler tanıma bölgeleri elde edilmiş ve etkileşimli analiz gerçekleştirilmiştir.

Kuantum nokta nanokristaller çok geniş uygulama alanlarına sahiptir. Bu uygulamaların çoğu fotoniklerle ilintilidir. Bunun yanında nanokristaller biyolojik araştırmalarda da önemli bir anahtar olmuştur. Işık yayan diyodlar, lazerler, güneş hücreleri ve elektronik uygulamalarda yaygın olarak kullanılmaktadırlar. Kuantum nokta nanokristallerin en çok kullanım bulunduğu alanlardan biri de tümör gibi hastalıkların teşhisine yönelik çalışmalardır (Gao ve ark. 2005).

MIP ve kuantum nokta nanokristallerin kombinasyonu ile moleküllerin seçici tanımlanmasına yönelik literatürde çok az çalışma bulunmaktadır (Kharitonov ve ark. 1999; Lin ve ark. 2004; Mattoussi ve ark. 2004). Lin ve ark. (2004) yapmış oldukları çalışmada 4-vinilpiridin ile aktive edilmiş CdSe/ZnS nanokristalleri birleştirerek, fonksiyonalize edilmiş nanokristalleri monomerler, çapraz bağlayıcılar ve kalıp moleküllere ilave etmiş ve nanokristalleri MIP içerisine polimerizasyon sırasında almıştır. Hazırladıkları moleküler baskılı kuantum nokta nanokristalleri kafein tayininde kullanmışlardır. Literatürde baskılı kuantum nokta nanokristaller ile pek çok molekül için çalışma yapılmasına rağmen DNA tayinine yönelik çalışma bulunmamaktadır.

Sağlığa dayalı teknolojilerden en önemlilerinden olan teşhis kimyasallarının ve teknolojilerinin geliştirilmesinde en önemli konulardan birisi de DNA tayini ve etkileşimlerinin incelenmesidir. Bu çalışmada; DNA'nın duyarlı tayini için ultra-ince, uniform ve DNA'ya seçici ligand değişimine dayanan ve yeni nesil nanoteknolojilerin kullanıldığı moleküler baskılanmış polimer filmleri ile modifiye edilmiş biyosensör geliştirilmiştir.

1.1. Nükleik Asitler

Nükleik asitler vücut ağırlığının yalnızca %2' sini oluşturmalarına karşın genetik bilginin depolanması, tanımlanması ve iletilmesi gibi çok önemli görevleri üstlenmiş moleküllerdir.

Kimyasal olarak birbirinden farklı iki değişik nükleik asit vardır: Deoksiribonükleik asit (DNA) ve rübonükleik asit (RNA). DNA hücrenin kromozomlarında, mitokondrilerinde ve bitkilerin kloroplastlarında bulunur. Hücrelerde ayrıca, plazmit adı verilen kromozom yapısında olmayan sitoplazmik DNA'lara da rastlanır. Organizmanın yaşamını sürdürebilmesi için hücrelerin çoğalması gereklidir. Döllenmiş bir yumurtada bulunan DNA, o organizmanın gelişimini yönlendirecek bilgiyi içerir. Hücrelerin bölünerek çoğalması sırasında DNA tam olarak tekrarlanır ve bölünen hücrenin özelliğine göre, seçici olarak belirli bilginin ifade edilmesi söz konusudur (Champe ve ark.1998; Gözükara 2000).

Her iki nükleik asit de nükleotidlerin polimerize olması ile meydana gelmektedir. Makro moleküler yapıda şeker ve fosfat birimleri fosfodiester bağı ile birbirine bağlanarak molekülün ana omurgasını oluşturur. Azotlu bazlar ise iki omurgayı bir arada tutmaktadır. Kısacası nükleik asitler birçok yapısal ünitenin bir düzen dahilinde bir araya gelmesi ile ortaya çıkmaktadır (Champe ve ark.1998; Murray ve ark. 2000).

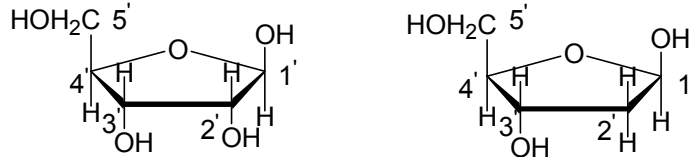
Bunlar;

- Şekerler
- Purin ve pürimidin bazları
- Nükleozitler
- Nükleotidler
- Polinükleotidler (Nükleik asitler)

1.1.1. Şekerler

Şekerler nükleik asitlerin en önemli ana elemanlarından biridir. Hem RNA hem de DNA'da pentozlar nükleik asitlerin ana omurgalarını oluşturur. RNA'da riboz, DNA'da ise 2-deoksiriboz şekerleri bulunur (Şekil 1.1). Nükleik asit bünyesindeki şeker ünitelerinin atomları azotlu bazların atomları ile karışmaması için 1', 2',.....5' gibi üs işaretleri ile işaretlenmiş durumdadır. Nükleik asit şekerlerinin 3' karbon atomuna bağlı OH grubu kendinden sonra gelen nükleik asit

şekerinin 5' karbon atomuna bağlı fosfat grubu ile reaksiyona girerek ester bağı oluşturur. Şeker üniteleri arasındaki fosfodiester bağları nükleik asitlerin lineer yapıdaki omurgasını oluşturur.



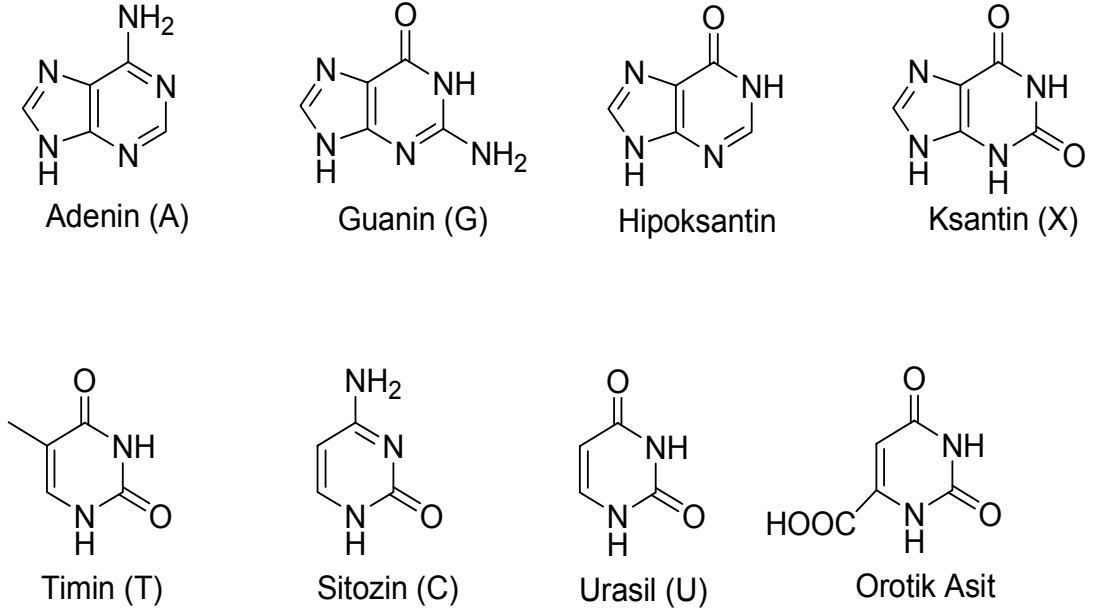
Şekil 1.1. Riboz ve deoksiriboz şekerleri

1.1.2. Pürin ve pürimidin bazları

Azotlu bazlar olarak da bilinen pürin ve pürimidinler nükleik asitlerin yapısına katılan önemli organik bileşiklerdir. Pürinler biri altı diğeri beş atomdan oluşan iki halkalı yapının kaynaşmasından ortaya çıkmıştır. Pürimidinler ise yalnızca altı üyeli bir tek halkadan ibarettir. Şekil 1.2'de görüldüğü gibi dört adet pürin, dört adet de pürimidin bazları mevcuttur. Çizelge 1.1'de pürin ve pürimidin bazlarının kimyasal isimleri verilmektedir.

Çizelge 1.1. Pürin ve pürimidin bazları

<u>Pürinler</u>	<u>Pürimidinler</u>
Adenin: 6-amino pürin	Urasil: 2,4-dioksi pürimidin
Guanin: 2-amino-6-oksi pürin	Timin: 2,4-dioksi-5-metil pürimidin
Hipoksantin: 6-oksi pürin	Sitozin: 2-oksi-4-amino pürimidin
Ksantin: 2,6-dioksi pürin	Orotik asit: 2,4-dioksi-6-karboksi pürimidin

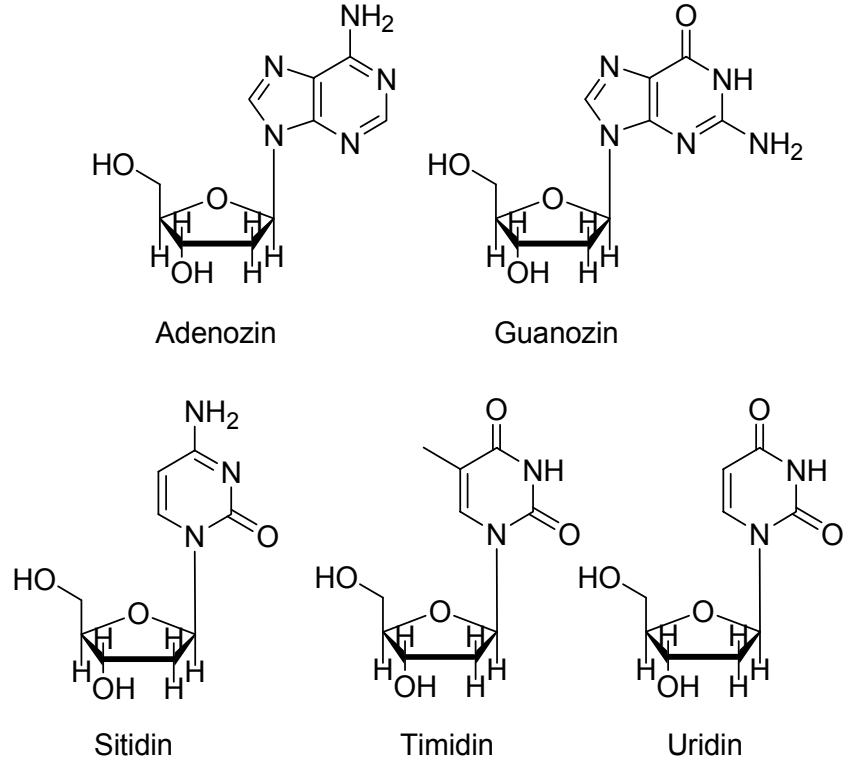


Şekil 1.2. Pürin ve pürimidin bazlarının yapıları

Adenin, guanin ve sitozin hem DNA hem de RNA'nın yapısında bulunmaktadır. Urasil ise yalnızca RNA'da bulunur. Timin normal olarak DNA'da bulunmasına rağmen bazen urasil gibi tRNA yapısına katılır (Lehninger ve ark. 2000).

1.1.3. Nükleozitler

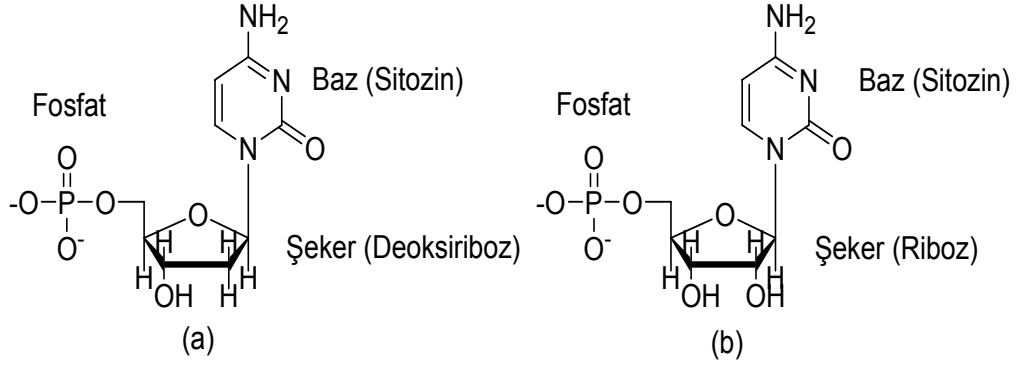
Bir pürin veya pürimidine riboz veya 2-deoksiriboz şekerlerinden birisi eklenirse nükleozit adı verilen bileşikler meydana gelir (Şekil 1.3). Nükleozitlerde şekerin birinci karbon atomu pürin bazlarının dokuzuncu; pürimidin bazlarının ise birinci azot atomlarına bağlı durumdadır (Lehninger ve ark. 2000; Mathews ve Van Holde 1996).



Şekil 1.3. Çeşitli nükleozitler

1.1.4. Nükleotidler

Nükleozitlerin riboz veya deoksiriboz şekerlerine bir veya daha çok fosfat grubunun eklenmesi ile nükleotidler ortaya çıkar. Genellikle fosfat grubu şekerin 5' karbonuna ester bağı ile bağı durumdadır. Eğer birden fazla fosfat grubu söz konusu olursa bunlar birbirine yüksek enerjili asit anhidrit bağı ile bağlanırlar. Bu durumda fosfat grubunun yerini ifade etmek üzere nükleotit isminin önüne karbon atom numarasını yazmaya gerek yoktur. Eğer 5' karbon atomundan farklı pozisyonda bağlanma söz konusu olursa nükleotit isminden önce bağlanma noktasının yeri belirtilir (Şekil 1.4) (Minniti 1998).



Şekil 1.4. DNA ve RNA'daki nükleotitler (a) Deoksiribonükleotit; (b) Ribonükleotit.

1.1.5. Polinükleotitler

Nükleotitler 3'-5' fosfodiester bağları ile polimerize olarak polinükleotitleri oluştururlar. Ribonükleotitlerin polimerizasyonu RNA oluşumuna yol açarken deoksiribonükleotitlerin polimerizasyonu sonucu da DNA oluşur. DNA ve RNA arasındaki önemli farklar Çizelge 1.2'de özetlenmiştir.

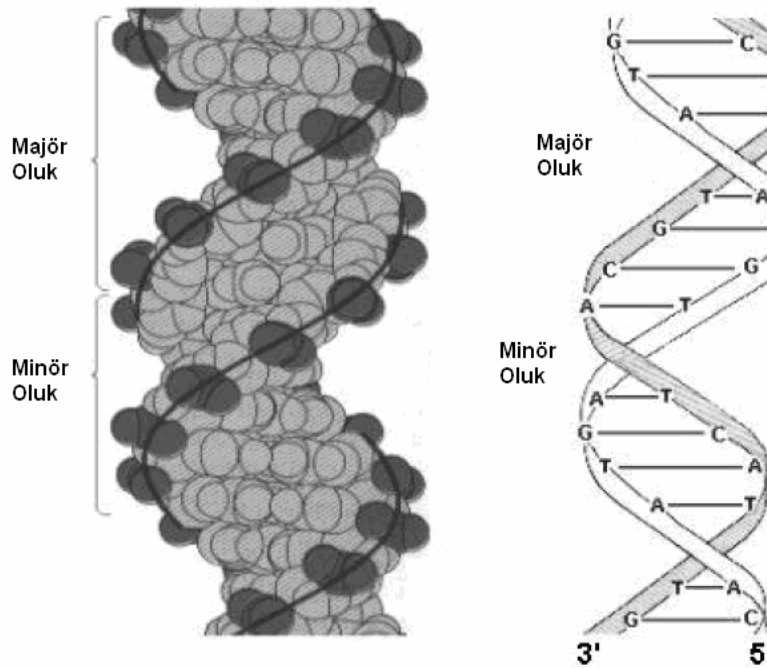
Çizelge 1.2. RNA ve DNA arasındaki farklılıklar

	RNA	DNA
Şeker Birimleri	Riboz	Deoksi-riboz
Azotlu Bazlar	A,G,C,U	A,G,C,T
Sarmal Yapı	Tek sarmal	Çift sarmal
Türler	tRNA, mRNA, rRNA	Nükleer, mitokondrial ve plazmid DNA'ları

DNA çok sayıda deoksiribonükleotit molekülünün, birbirine 3' - 5' fosfodiester bağı ile bağlanması sonucu ortaya çıkan bir biyopolimerdir. Fosfodiester bağı ardışık nükleotit şekerlerinden birisinin 5'-hidroksil grubunun, diğerinin 3' hidroksil grubuna fosfat köprüsü aracılığı ile bağlanmasıyla oluşur. Sonuçta uzun ve düz bir zincir yapısı ortaya çıkar. DNA zincirinin ana çatısını bu deoksiriboz-fosfat iskeleti oluşturur. Bu iskelet boyunca yerleşmiş olan baz

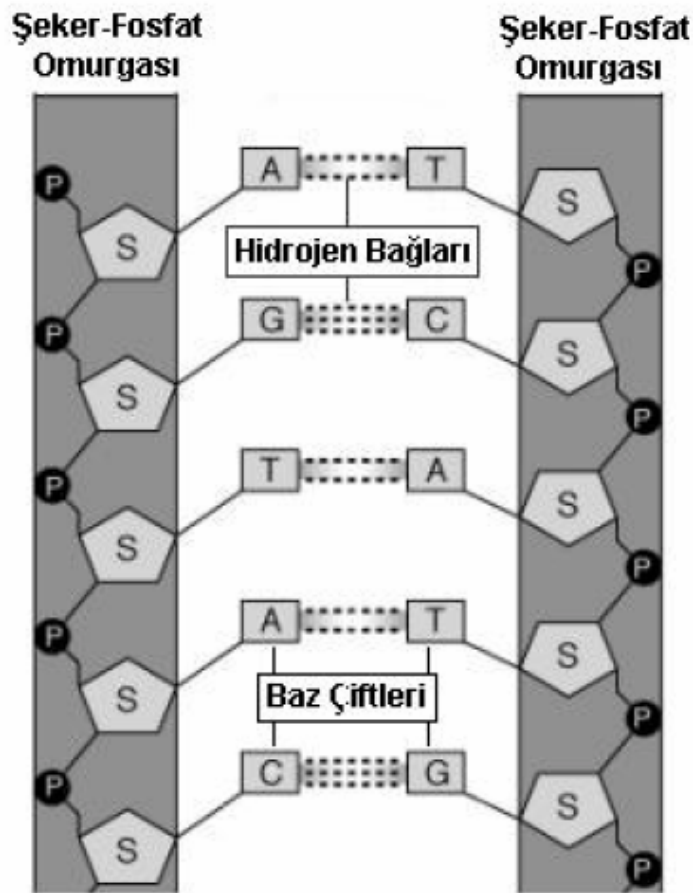
dizeleri geleneksel olarak zincirin 5' ucundan 3' ucuna doğru yazılır. DNA ve RNA'da nükleotitler arasında bulunan fosfodiester bağları ya kimyasal hidroliz ya da enzimatik yolla açılabilir. Hidroliz yapan enzimlerin genel adı nükleazlardır. DNA'da deoksiribonükleazlar, RNA'da ise ribonükleazlar hidrolizi gerçekleştirir. Nükleik asit zincirinin iç kısımlarındaki nükleotitleri hidrolize ederek sertleştiren nükleazlara endonükleazlar; zincirin her iki ucundaki nükleotitleri hidrolize edenlere ise ekzonükleazlar denir (Champe ve ark.1998; Lehninger ve ark. 2000; Aktipis 1992).

Tek sarmallı DNA içeren birkaç virüs dışında, DNA çift sarmalıdır (Şekil 1.5). Sarmalı oluşturan iki zincir ortak bir eksen etrafında dönerek, çift heliks yapıyı oluştururlar. Bu yapıda zincirler birbirine antiparalel konumda bulunurlar. Sarmalın 5' ucu diğer sarmalın 3' ucu ile eşleşir. DNA heliksini en sık rastlanan şekli, klasik "B" şeklindedir. Burada zincirlerin hidrofobik deoksiriboz fosfat ana iskeleti molekülün dış kısmında bulunur. Hidrofobik bazlar ise içe doğru, heliks eksenine dik olarak yerleşmişlerdir. Heliksdeki bu yerleşim düzeni sarmallar arasında bir tane geniş (majör), bir tane de dar (minör) oluk ortaya çıkarır (Hantz ve ark. 2001).



Şekil 1.5. DNA çift sarmal yapısı

DNA molekülünün iki zinciri, pürin ve pürimidin bazları arasında yer alan hidrojen bağları tarafından bir arada tutulmaktadır (Şekil 1.6). Çift zincirli helikte bazlar heliksin iç kısmında, fosfat ve şeker omurgası ise dış kısmında yer aldığı için heliksin iç kısmı hidrofobik, dış kısmı ise hidrofilik özelliktedir. Pürin ve pürimidin nükleotitleri arasındaki eşleşmeler A karşısında T; G karşısında C bulunduğu için son derece spesifiktir. Bu nedenle çift heliks yapısında yer alan bir zincirdeki baz dizisi verildiğinde; ikinci zincirdeki baz dizisi belirlenebilir (Ravanat ve ark. 1999).



Şekil 1.6. DNA çift sarmalı bağlanmalar

DNA'nın içinde bulunduğu ortamın pH'sı değiştirilirse veya ortamın ısısı arttırılırsa bazlar arasındaki hidrojen bağları etkilenerek, çift sarmal yapı açılabilir. Şeker üniteleri arasındaki fosfodiester bağları ise hafif değişkenliklerden etkilenmezler. Heliks yapısının açıldığı ısıya, DNA'nın erime derecesi denir. DNA

zincirinin açılarak çift heliks yapısının tümüyle bozunmasına "denatürasyon" denir. Denatürasyon, DNA çözeltisinin 260 nm'deki absorbansı ile ölçülebilir. 260 nm dalga boyunda tek sarmal DNA, çift sarmal DNA'ya oranla daha fazla absorbans oluşturur. G ve C arasında üç (G=C); A ve T arasında iki (A=T) hidrojen bağı bulunduğundan yüksek derişimde G ve C taşıyan DNA, A ve T yönünden zengin DNA'ya göre daha yüksek sıcaklıkta denatüre olur. Ilımlı koşullarda birbirinden ayrılan DNA çift zinciri, koşullar düzelince tekrar eski haline dönüşebilir, bu işlem "renatürasyon" olarak isimlendirilir (Champe ve ark.1998; Gözükara 2000; Lehninger ve ark. 2000).

1.2. Moleküler Baskılanmış Polimerler (MIP)

Moleküler etkileşim kavramı oldukça eski bir kavram olup ilk kez 1894'de Fischer'in enzim-substrat etkileşimini ortaya koyan ünlü "anahtar-kilit" modelini ortaya atmasıyla birlikte konuyla ilgili modern fikirler ortaya çıkmaya başlamıştır. Bu tanıma göre enzim molekülünün yüzeyinde substrat molekülünün şeklini tamamlayan ve bu şekle uygun yapılar bulunmaktadır. Böylece substrat bir anahtar gibi enzimin aktif bölgeleriyle etkileşir. Moleküler etkileşim kavramının en yeni ve büyük çapta ilgi gören uygulamalarından biride moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama (bellekleme) yöntemi farklı matrikslerden iyonlar, organik moleküller ve biyomoleküllerin seçiciliği yüksek olarak ayrılması için akıllı polimer elde edilmesi ve bunun farklı uygulamalarda kullanılmasını yaygınlaştıran yeni bir malzeme geliştirme yöntemidir.

Moleküler baskılamada, hedef molekül çevresi ile etkileşen bir kalıp olarak davranır, çapraz bağı monomerler hedef molekül çevresinde düzenlenir ve kalıp benzeri bir tabaka oluşturmak üzere birlikte polimerleşirler. Temel olarak monomerler kovalent veya non-kovalent etkileşimler yoluyla yuva molekül ile bir kompleks oluşturur. Polimerizasyondan sonra yuva molekül uzaklaştırılır ve bağlanma bölgeleri yuva moleküle büyüklük, şekil ve fonksiyonel grupların yerleşimi olarak tamamlayıcıdır. Böylece esas olarak yuva molekülü seçici olarak tekrar bağlayabilen polimer üzerine bir moleküler 'bellek' baskılanmıştır. Moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerin en önemli iki özelliğine

yani tanıma yeteneği ve spesifik hedef molekülleri bağlama yeteneğine sahiptirler. Fakat moleküler baskılanmış polimerler biyolojik reseptörlerden şu açılardan farklıdırlar.

- Moleküler baskılanmış polimerler çok büyük, katı ve çözünmezdirler.
- Buna karşın bunların doğal karşılıkları olan biyolojik reseptörler daha küçük, esnek ve çoğu durumlarda çözünürdürler.
- Büyüklüklerine bağlı olarak moleküler baskılanmış polimerler binlerce veya milyonlarca bağlanma bölgesine sahiptirler.
- Buna karşın biyolojik reseptörler çok az veya sadece bir tane bağlanma bölgesine sahiptirler.
- İlave olarak moleküler baskılanmış polimerlerdeki bağlama bölgelerinin popülasyonu heterojendir.

Ayrıca baskılama için kullanılan pek çok polimerin karmaşık yapısı, heterojen gözenek büyüklüğü dağılımı ve bağlama bölgelerinin katı materyal boyunca bulunması genellikle kütle aktarımını yavaşlatır. Her zaman problem olmamasına karşın bu özellikler moleküler baskılanmış polimerlerin genel uygulamalarda doğal reseptörlerin yerini almalarını önlerler.

Moleküler baskılanmış polimerler yüksek mekanik dayanıklılıkları, ısıya ve basınca olan dirençleri, fiziksel sağlamlıkları, asitler, bazlar metal iyonları ve organik çözücüler gibi zorlayıcı şartların varlığında yüksek kararlılıkları sebebiyle oldukça dayanıklıdırlar. Birkaç yıl boyunca performansında değişim olmaksızın saklanabilir. Ayrıca MIP'ler yapay afinite ortamı olarak düşünülebilirler.

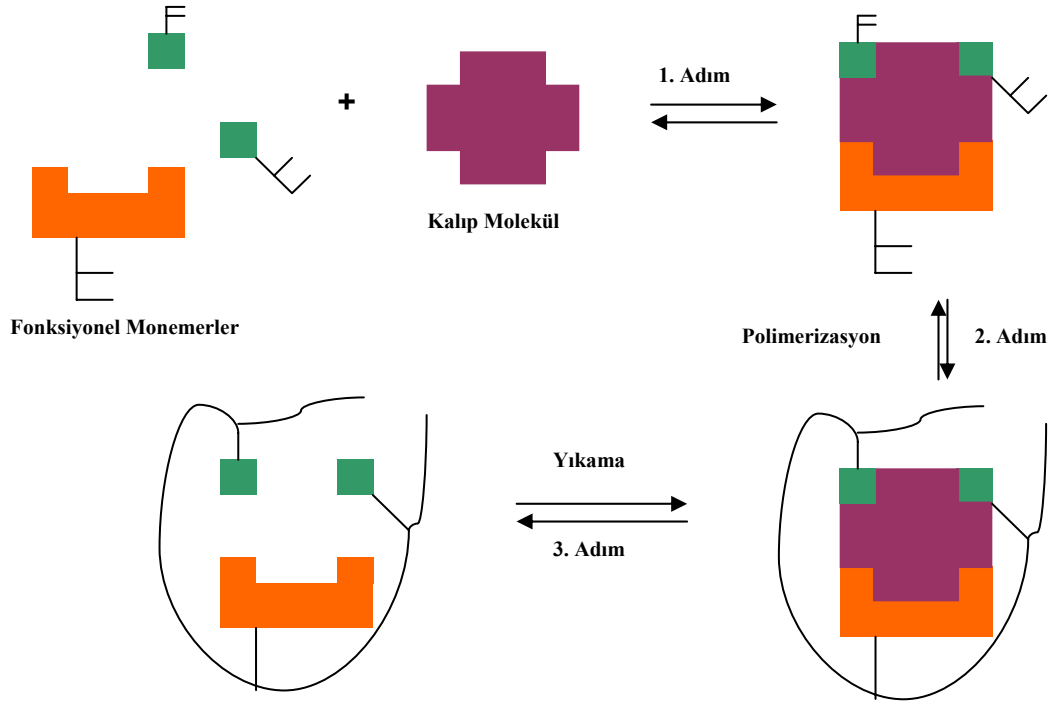
1.2.1. Moleküler baskılanmış polimer hazırlama teknikleri

Moleküler baskılanmış polimer hazırlama yöntemi genellikle üç basamaktan oluşur:

- Fonksiyonel monomerler ve kalıp molekül arasında bir bağlanma gerçekleştirilir.

- Çapraz bağlayıcı ajanlarla oluşturulan fonksiyonel monomer-kalıp kompleksi polimerleştirilir.
- Uygun bir yıkama ajanı ile kalıp molekülün polimerden uzaklaştırılması sağlanır.

Şekil 1.7’de MIP hazırlama aşamaları gösterilmiştir.

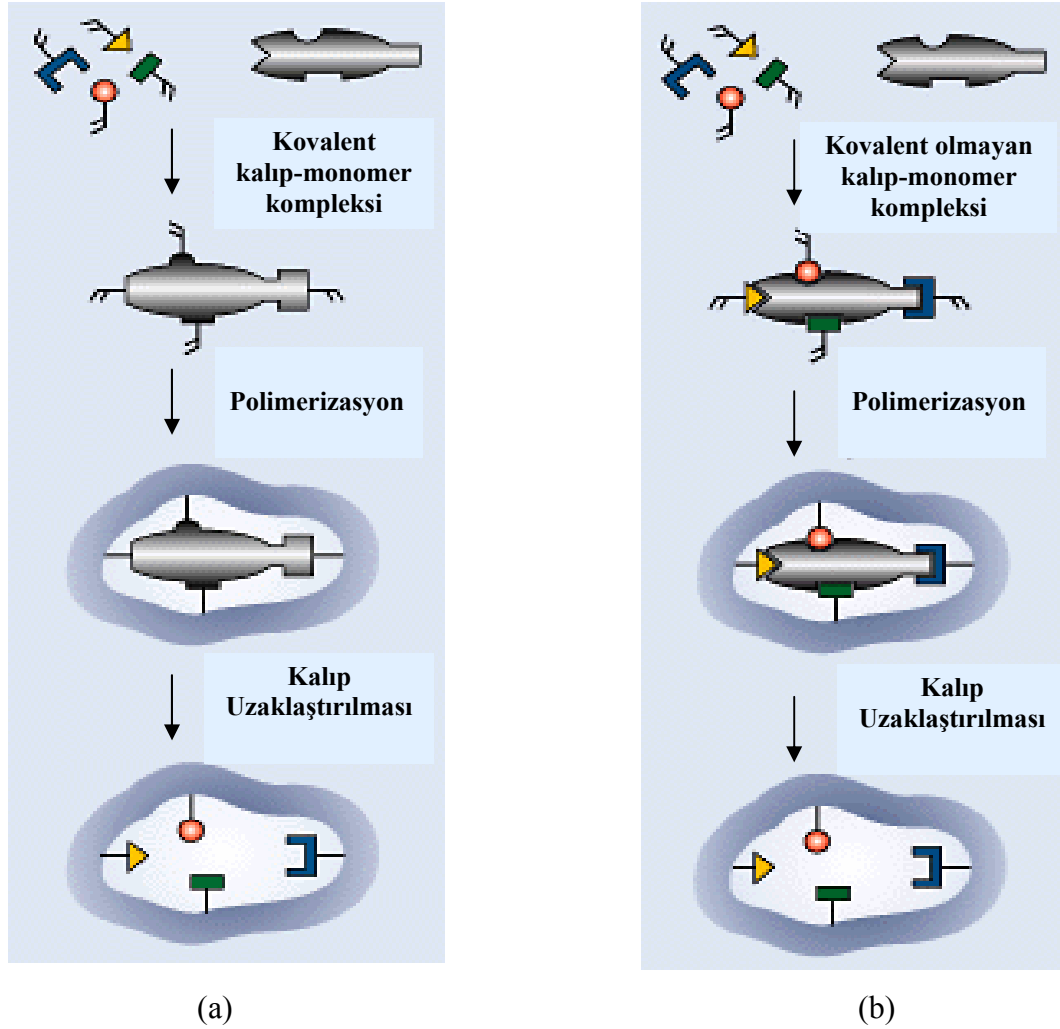


Şekil 1.7. Moleküler baskılı polimer hazırlama aşamaları

Moleküler baskılı polimerleri hazırlamak için kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşime göre iki farklı yaklaşım kullanılır. Bunlardan biri Wulff ve ark. (1977) tarafından geliştirilen ön-organizasyon yöntemidir. Bu yöntemde kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler birbirlerine kovalent bağlanma ile bağlanırlar ve polimerizasyon boyunca bu kompleks yapı kararlılığını korur (Şekil 1.8a).

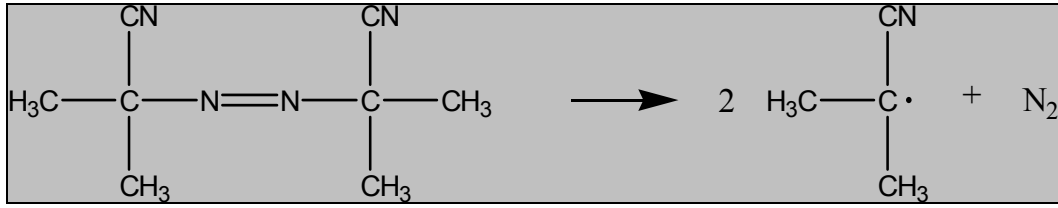
Diğer yaklaşım Mosbach ve ark. (1981) tarafından geliştirilmiş olan kovalent bağlanma yerine kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasında hidrojen bağları, hidrofobik etkileşimler, van der Waals etkileşimleri ve iyonik

gruplar arasında gerçekleşen Coulomb etkileşimleri gibi etkileşimleri içine alan kovalent olmayan yaklaşımdır (Şekil 1.8b) (Vlatakis ve ark. 1993).



Şekil 1.8. (a) Kovalent ve (b) kovalent olmayan moleküler baskılama yönteminin şematik görünümü

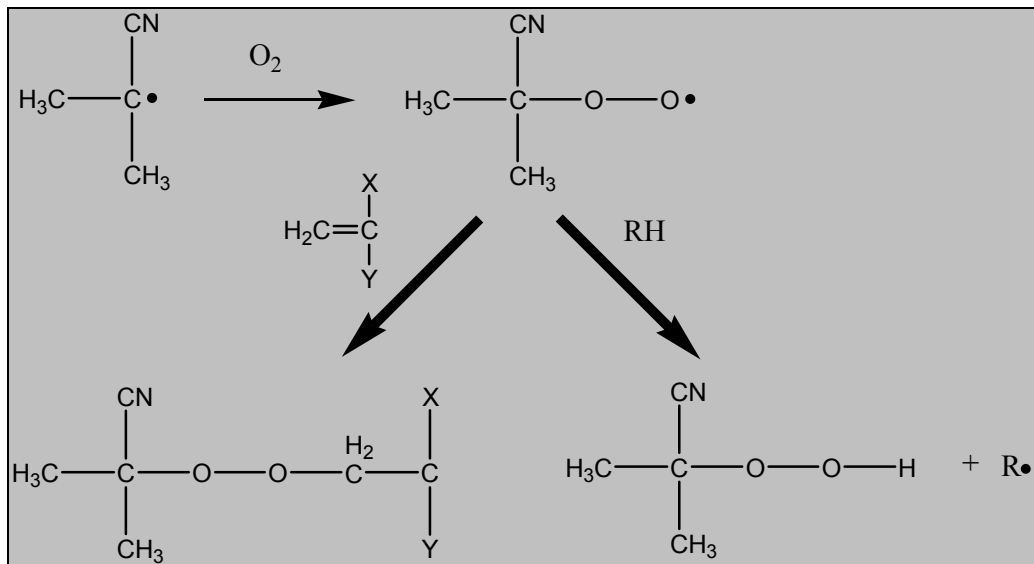
Serbest radikal polimerizasyonu, çok yönlü uygulamaları ve deneysel kolaylığının yanında ekonomik bir yöntem olduğu için MIP'lerin hazırlanmasında en çok kullanılan tekniktir. Günümüzde endüstride en çok bu teknik tercih edilir (Komiya ve ark. 2002). Polimerizasyon 2,2'-azobis(izobutironitril) (AIBN) gibi bir radikal başlatıcının termal bozulmasıyla başlatılabilir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. AIBN'in termal bozunma reaksiyonu

Serbest radikaller elde etmenin bir diğer yolu da foto başlatıcılar kullanmaktır. Özellikle yüksek sıcaklıklarda kalıp ve fonksiyonel monomerler arasında kararsız non-kovalent bağlanmalar olması durumunda kullanılırlar. Fotokimyasal polimerizasyon başlatıcılarının kullanıldığı polimerizasyon işlemlerinde, polimerizasyon UV ışığının yoğunluğuna, ışık kaynağından uzaklığa ve radikal ürünün içine ulaştığı mesafeye bağlıdır.

Serbest radikal polimerizasyonunda oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması son derece önemlidir. Çünkü oksijen serbest radikale peroksi radikal formunda bağlanır. Bunun sonucunda da ya bu peroksi radikal başlatıcı bir başka başlatıcı molekülü ile etkileşir ya da ortamda bulunan polimer, monomer ve diğer bileşenlerle reaksiyona girer (Şekil 1.10). Ortamdaki oksijeni uzaklaştırmak için azot veya argon gazı kullanılabilir.



Şekil 1.10. Radikal polimerizasyonunda oksijen ile başlatıcı radikal reaksiyonları

Bu zamana kadar yapılan pek çok moleküler baskılanmış polimer çalışması radikal polimerizasyonu ile hazırlanan organik polimerleri açıklamaya yöneliktir.

Organik polimerlerin hazırlanmasında kullanılan monomerler:

- Bazik (vinilpiridin)
- Asidik gruplar (metakrilik asit)
- Yüklü gruplar (3-akrilamidopropiltrimetilamonyum klorür)
- Hidrofobik (sitiren)
- Hidrojen bağı gösteren (akrilamit) vb sayılabilir.

Moleküler baskılanmış polimer hazırlamak için kullanılan yöntemlerin başlıcaları:

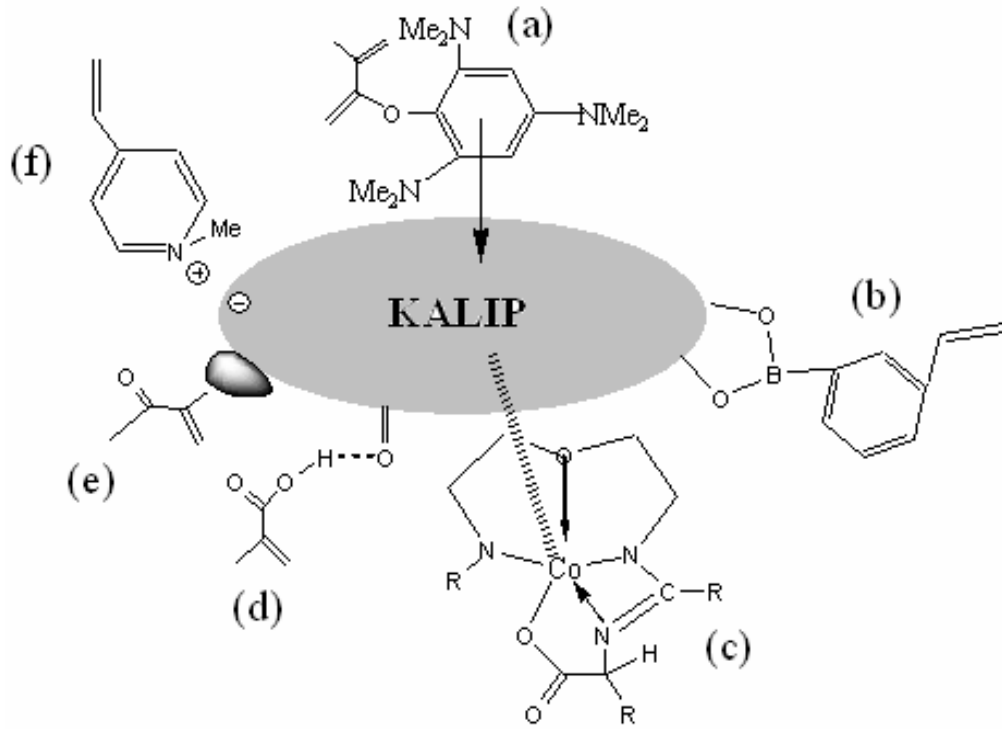
- Yığın polimerizasyonu
- Süspansiyon polimerizasyonu
- Kimyasal grafting
- Yumuşak litografi
- Moleküllerin kendilerini yönlendirmesi yaklaşımı
- Elektropolimerizasyondur.

1.2.2. Farklı MIP hazırlama yöntemlerinin avantaj ve dezavantajları

Kovalent ve kovalent olmayan baskılama yöntemlerinin her ikisinde avantaj ve dezavantajlara sahiptir (Haupt ve ark. 2002). Günümüzde pek çok araştırmacı baskılanmış polimer hazırlamak için kovalent olmayan yaklaşımı kullanmaktadır (Kriz ve ark. 1997; Zhong ve ark. 2001). Kovalent olmayan yaklaşım polimerizasyon öncesinde non-kovalent etkileşimlerle kalıp molekül etrafında fonksiyonel monomerlerin düzenlenmesine imkan tanıdığından basit ve sorunsuzdur. Kalıp molekülün kovalent modifikasyonuna gerek yoktur ve kalıp-monomer kompleksi oluşturmak için farklı bağlanma etkileşimleri kullanılabilir. Kovalent olmayan bağlanma kinetiği kovalent bağlanmayla kıyaslandığında enzim-substrat bağlanmalarına benzer (Sellergren 1988). Baskılanmış polimerler,

kalıp molekülün yapısı ve reaktivitesi hakkında spesifik bilgi gerektirmeksizin hazırlanabilir. Bununla birlikte kovalent olmayan baskılamada kalıp molekül ve fonksiyonel monomerler arasındaki etkileşimler spesifik değildir. Kovalent olmayan polimerlerde bağlanma bölgelerinin dağılımı heterojendir ve bu da non-spesifik bağlanmalara ve kalıp molekülün zayıf moleküler tanınmasına neden olur (Katz ve Davis 1999; Dong ve ark. 2002). Eğer hazırlanan polimer kromatografi çalışmalarında kullanılacaksa pik genişlemesi meydana gelebilir (Malik ve ark. 1994; Yoshizako ve ark. 1998).

Kovalent yaklaşımda baskılama işlemi öncesinde kararlı kalıp-monomer kompleksi oluşturulduğu için bağlanma bölgelerinin homojen dağılımı sağlanır (Ikegami ve ark. (2004). Bununla birlikte dezavantajlarının çokluğu nedeniyle kovalent yaklaşımın kullanımı daha sınırlıdır. Kovalent yaklaşımda polimer ağ örgüsü içindeki monomer-kalıp molekül arasındaki kovalent bağları kırıp kalıbın polimerden uzaklaştırılması işlemi oldukça zordur (Kriz ve ark. 1997; Sellergren 1988). Ayrıca polimeri kullanarak kalıp tanıma basamağında kalıp ile polimer arasında kovalent bağ oluşumu genellikle yavaş bir basamakta gerçekleştiği için ve kromatografik ayırmalarda polimer sabit fazı ve analit arasında hızlı bir etkileşim gerçekleştiğinden zayıf kromatografik sonuçlar elde edilir (Steinke ve ark. 1995; Caro ve ark. 2002). MIP hazırlama yönteminde kullanılan farklı kalıp-monomer etkileşimleri Şekil 1.11’de görülmektedir.

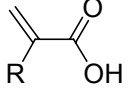
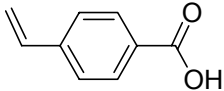
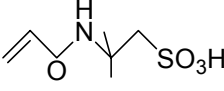
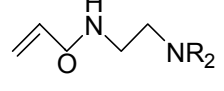
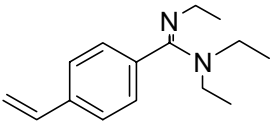
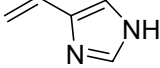


Şekil 1.11. Moleküler baskılanmış polimerlerde kalıp-fonksiyonel monomer etkileşimleri: (a) π - π etkileşimi, (b) kovalent etkileşim, (c) metal-ligand etkileşimi, (d) hidrojen bağı ile etkileşim, (e) hidrofobik ya da van der Waals etkileşimi, (f) iyonik etkileşim

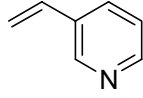
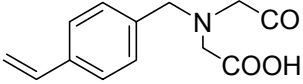
1.2.3. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan fonksiyonel monomerler

Moleküler baskılı polimerlerde kalıp molekül ile fonksiyonel monomerler arasındaki geri-bağlanma basamağı çok önemli olduğu için fonksiyonel monomerlerin seçimi kritiktir. Fonksiyonel monomer için anahtar eleman, etkileşimin gerçekleşmesi için uygun bağlanma bölgelerinin sayısıdır. MIP'lerin sentezinde en çok kullanılan fonksiyonel monomerlerin listesi Çizelge 1.3'de verilmiştir.

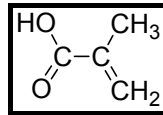
Çizelge 1.3. Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler (Dmitrienko ve ark. 2004)

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısal Formülü
Akrilik asitler (R=H, CH ₃ , CF ₃ , CH ₂ COOH)	
Vinilbenzoik asitler	
Akrilamidosülfonik asitler	
Aminometakril amidler	
N,N'-Dietil-4-vinilbenzamin	
Vinilimidazoller	

Çizelge 1.3. (Devam) Moleküler baskılı polimer sentezinde kullanılan bazı fonksiyonel monomerler (Dmitrienko ve ark. 2004)

Fonksiyonel Monomer	Monomerin Yapısal Formülü
Vinilpiridinler	
4-(Vinilbenzil)iminodiasetik asit	

Kovalent olmayan moleküler baskılamada hidrojen bağı oluşturma özelliğine sahip olması nedeniyle metakrilik asit yapısında da bulunan karboksilik asit grupları kullanılır (Lanza ve Sellergren 1999; Takeuchi ve ark. 1999). Şekil 1.12'de metakrilik asit yapısı görülmektedir.



Şekil 1.12. Kovalent olmayan moleküler baskılanmış polimer hazırlamada kullanılan metakrilik asit (MAA) yapısı

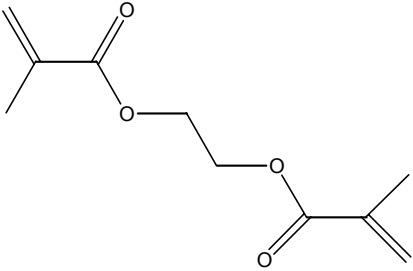
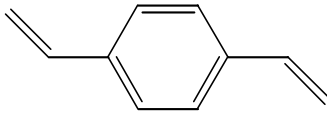
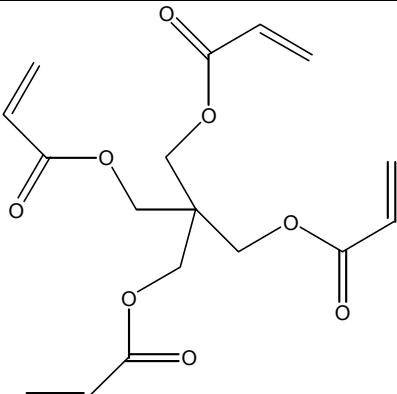
Metakrilik asit hidrojen bağı oluştururken donör ve akseptör olarak davranabilmektedir ve bu özelliği geri-bağlanma çalışmalarında pek çok analitin tutulması için avantaj sağlamaktadır (Andersson ve ark. 1994; Sellergren 2000). MAA temel fonksiyonel gruplarla güçlü etkileşimler yapabilmesine karşın, polar çözücülerde hidrojen bağı oluşturma yeteneği çok güçlü değildir. Bu nedenle asetonitril gibi kloroformdan daha polar çözücülerde gerçekleştirilen moleküler baskılamalarda fonksiyonel monomer olarak MAA yerine akrilamid monomerleri

tercih edilir. Akrilamid, MAA'dan daha az asidik olmasına karşın daha polardır ve kalıpla polar ortamda güçlü hidrojen bağı oluşturur.

1.2.4. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çapraz bağlayıcılar

MIP hazırlarken bir diğer önemli nokta çapraz bağlayıcının seçimidir. Çapraz bağlayıcı, kalıbın polimerden uzaklaştırılmasından sonra kararlı ve analiti hafızasında tutan polimer ağ örgüsü oluşturmak için kullanılır (Idziak ve ark. 2001). Çizelge 1.4'de yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcıların listesi verilmiştir. Etilen glikol dimetakrilat (EDMA) en çok kullanılan çapraz bağlayıcıdır.

Çizelge 1.4. Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Moleküler Yapısı
Etilen glikol dimetakrilat (EDMA)	
p-Divinilbenzen	
Pentaeritrol tetraakrilat	

Çizelge 1.4. (Devam) Moleküler baskılı polimer hazırlarken kullanılan başlıca çapraz bağlayıcılar

Çapraz Bağlayıcı	Çapraz Bağlayıcının Moleküler Yapısı
Pentaeritrol triakrilat	
N,N'-1,4-fenilendiakrilamid	
N,O-bisakriloil-L-fenilalaninol	
N,N'-metilendiakrilamid	
Trimetilolpropan trimetakrilat (TRIM)	

MIP'lerde polimer ağ-örgüsü içinde analite seçici oyuk oluşumu uygun çapraz bağlayıcı ve çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranına bağlıdır. Farklı çapraz bağlayıcı / fonksiyonel monomer derişim oranları moleküler baskılı polimerlerdeki farklı sayıda bağlanma bölgelerinin oluşumuna neden olur ve bu da seçiciliği etkiler (Dickert and Hayden 1999).

1.2.5. Moleküler baskılı polimer hazırlamada kullanılan çözücüler

Genellikle MIP'ler çözücü bazlı ortamlarda hazırlanır ve kullanılır. Bu nedenle MIP'lerin sentezinde önemli bir nokta da çözücü seçimidir. Çözücü polimerizasyon bileşenlerini çözmesine, tüm bileşenlerin tek fazda bulunmasına ilaveten gözenek oluşumunu ve sıcaklık dağılımını sağlar. Genellikle sentez için polar olmayan organik çözücülerin kullanıldığı MIP'ler polar organik çözücülerin kullanıldığı MIP'lerden daha iyi seçiciliğe sahiptir (Yu ve Mosbach 1997). Hazırlanan polimerin analite seçiciliği için oluşan kavitenin analite tam uygun boyutta olması yani ne çok dar ne de çok gevşek olması çözücü seçimine bağlıdır. Ayrıca MIP'ler farklı çözücülerde farklı şişme özellikleri gösteririler. Şişme fonksiyonel grupların üç boyutlu yapısını değiştirdiği için ve bu MIP'in seçiciliğinin değişmesine yol açtığından analit tanıma basamağında daha zayıf bağlanmalar oluşmaktadır.

1.2.6. Moleküler baskılanmış polimerlerin uygulama alanları

Moleküler baskılanmış polimerler farmakolojik, analitik ve biyolojik seçici moleküler tanıma alanlarında sıklıkla kullanılmaktadırlar (Zhong ve ark. 2001). Sıvı kromatografi, kapiler elektroforez, kapiler elektrokromatografi ve katı faz ekstraksiyon gibi analitik tekniklerde MIP'lerin kullanımına yönelik çalışmalar sürekli artmaktadır (Andersson 2000; Haupt 2001). Bir diğer uygulama alanı ise sensörlerde tanıma elemanı olarak kullanımlarıdır (Spégel ve ark. 2002). Moleküler baskılamayla hazırlanan polimerler amino asit türevleri, ilaçlar ve şeker türevlerinin şiral ayrımı için, antibadi-reseptör benzeri olarak steroidler, proteinler ve protein analogları için, organik reaksiyonlarda enzim benzeri olarak

ve iyon seçici absorbanlar olarak başarıyla kullanılmaktadır (Yu ve Mosbach 1997). MIP bazlı şiral-sabit faz ayırmalarında saf enantiyomerik kalıp molekül kullanılarak kovalent ya da non-kovalent baskılama tekniği ile seçiciliği oldukça yüksek polimerler elde edilebilir. Daha sonra polimer ezilip parçalanır ve kolono uygun boyut için elenerek kromatografik kolona doldurulur (Ikegami ve ark. 2004).

1.3. Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi (SPR)

Yüzey plazmon rezonans (SPR) olgusu Waxwell eşitliğinin türetilmesinden beri bilinmektedir, ancak Ritchie ve ark.'nın (1968) yayınladıkları makaleye kadar SPR ile yapılmış deneysel bir çalışma yayınlanmamıştır. İzleyen yıllarda, Kretschmann günümüzde de Kretschmann konfigürasyonu olarak bilinen ve ticari SPR sistemlerinin pek çoğunda kullanılan konfigürasyonu kullanarak ince gümüş filmlerin sıcaklığa bağlı plazma rezonans emisyonlarını (Kretschmann 1969) ve ince filmlerin optik sabitlerini (Kretschmann 1969) içeren bir çalışma bildirmiştir. SPR'nin biyosensör olarak kullanımı ilk kez 1983'te Liedberg tarafından bildirilmiştir. Günümüzde ise SPR sistemleri biyomoleküler etkileşim çalışmalarında kinetik ve denge sabitlerinin belirlenmesi için oldukça yaygın bir şekilde kullanılmaktadır.

1.3.1. SPR'nin teorisi

Bir metalin içindeki elektronlar, eşitlik 1.1'de verilen plazma frekansındaki (ω_p) plazma olarak düşünülebilir.

$$\omega_p = \sqrt{\frac{4\pi Nq^2}{m\epsilon_0}} \quad (1.1)$$

Bu eşitlikte

q : elektron yükü,

N : elektron yoğunluğu,

M : elektronun kütlesi

ϵ_0 : serbest uzayın geçirgenliğidir.

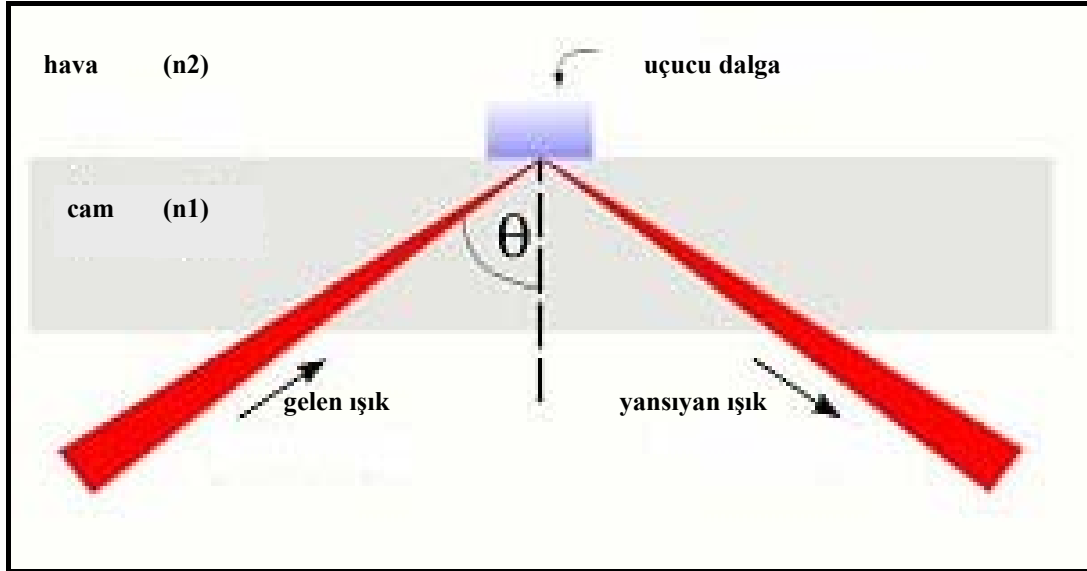
Tersine, frekansın fonksiyonu olarak metaldeki elektron bulutunun plazma dielektrik sabiti 1.2 eşitliği ile açıklanabilir.

$$\epsilon_p(\omega) = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2} \quad (1.2)$$

Plazma frekansının altında, kırılma indisi komplekstir ve düz dalgalar metalin içinde üssel olarak sönümlenir. Bununla birlikte plazma frekansının üstünde kırılma indisi büyük ölçüde reel ve pozitif olur ve elektromanyetik dalga metalin içine doğru ilerleyebilir. Metaller için plazma frekansı tipik olarak UV bölgesinde gerçekleşir ve bu olgu metallerin morötesi saydamlığı olarak isimlendirilir (Jackson 1972). Bir yüzey plazması, bir metal ve dielektrik arayüzünde gerçekleşen ortak yük-yoğunluk titreşimidir. Metaldeki iletken elektronlar metal kristal kafesi boyunca serbestçe hareket edebilirler ve bazı zamanlarda kinetik enerjilerinden dolayı metalin yüzeyinden ayrılabilirler. Bir elektron yüzeyden uzaklaştığında, değişen yük dağılımından kaynaklanan geri toplama kuvveti elektronu kafesin içine geri çeker. Yüzeydeki elektronların yüzeyin normal düzlemi ile yaptıkları ortalama hareket, harmonik osilatöre benzer şekilde ölçülebilen belirli bir frekanstadır.

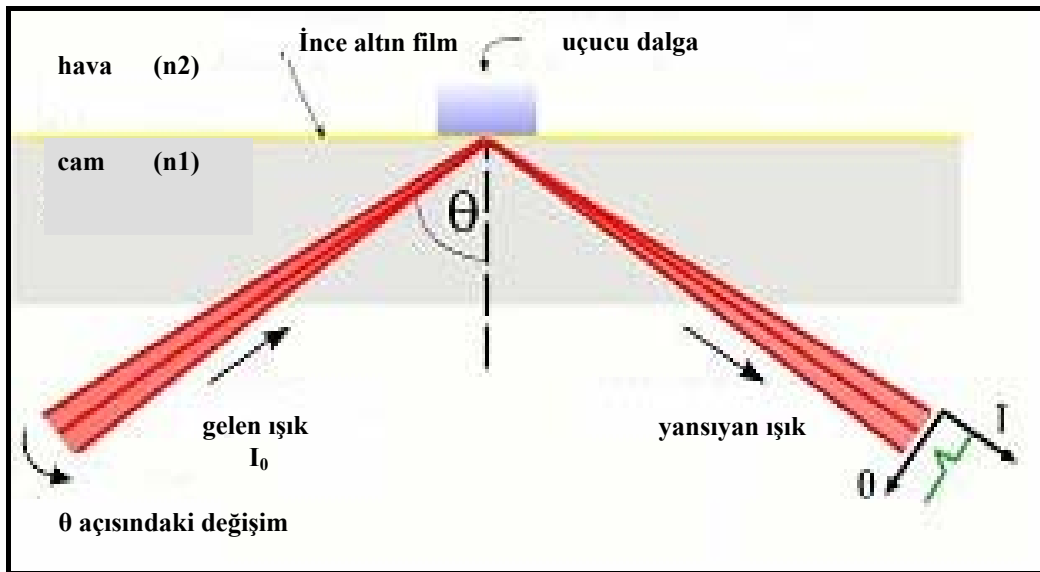
Yüzey plazmon rezonans ışık ile metal yüzeyinin etkileşiminden meydana gelen optik-elektriksel bir olgudur. Belirli şartlar altında ışık fotonları tarafından taşınan enerji, metal yüzeyinde bulunan ve "Plazmon" adı verilen elektron paketçiklerine transfer edilir. Enerji transferi ışığın spesifik bir rezonans dalga boyunda meydana gelir. Bu rezonans dalga boyu fotonlar tarafından kuantlaşmış enerjinin plazmonların kuantlaşmış enerji seviyesine eşit olduğu dalga boyudur.

Yüzey plazmonlarının titreşimleri sonucu elektromanyetik dalgalar oluşur ve optik olarak uyarılma özellikleri vardır (Şekil 1.13) (Homola ve ark. 1999).



Şekil 1.13. Yüzey plazmonlarının titreşimleri sonucu elektromanyetik dalganın oluşumu

Yüzey plazmon rezonansı iki optik ortamın ara yüzeyine ince iletken bir film yerleştirildiğinde meydana gelir. Spesifik bir geliş açısında metal yüzeyindeki elektronlar (yüzey plazmonları) frekanslarının eşleşmeleri nedeniyle gelen ışık ile rezonans durumuna gelecektir. Bu rezonans durumunda enerji absorblanacağı için yansıyan ışının (I) yoğunluğunda bir azalma meydana gelir. Bu durum Şekil 1.14'de gösterilmektedir (Homola ve ark. 1999).



Şekil 1.14. Optik ortam arayüzüne iletken film yerleştirildiğinde oluşan yüzey plazmon rezonansı

Rezonans dalga boyunun belirlenmesinde 3 faktör etkilidir:

- i- Metalin cinsi
- ii- Metal yüzeyinin yapısı
- iii- Metal yüzeyi ile etkileşim halinde bulunan ortam

SPR için uygun bir metal, ışık ile uygun dalga boyunda rezonansa girebilecek iletim bandı elektronlarına sahip olmalıdır. Genelde en çok kullanılan metaller altın, gümüş, bakır, alüminyum, sodyum ve indiyumdur. Metal seçimi sırasında iki kritik kısıtlama söz konusudur.

i) Metal yüzeyi oldukça saf olmalıdır; atmosferik nedenlerle oluşabilecek oksitler, sülfidler ve diğer film tabakaları rezonansı engeller.

ii) Metal analiz edilecek maddelerle uyumlu olmalıdır.

Seçilebilecek metallere arasında en yaygın kullanılanı altındır. Altın metali, yakın IR spektrum bölgesinde oldukça güçlü ve kolay ölçülebilen rezonans sinyali verir. Ayrıca oksidasyona ve diğer atmosferik kirlenmelere karşı oldukça dirençlidir. Üzerinde çeşitli türde bağlı molekülleri barındıracak kadar reaktiftir (Caide ve Sen-Fang 2000).

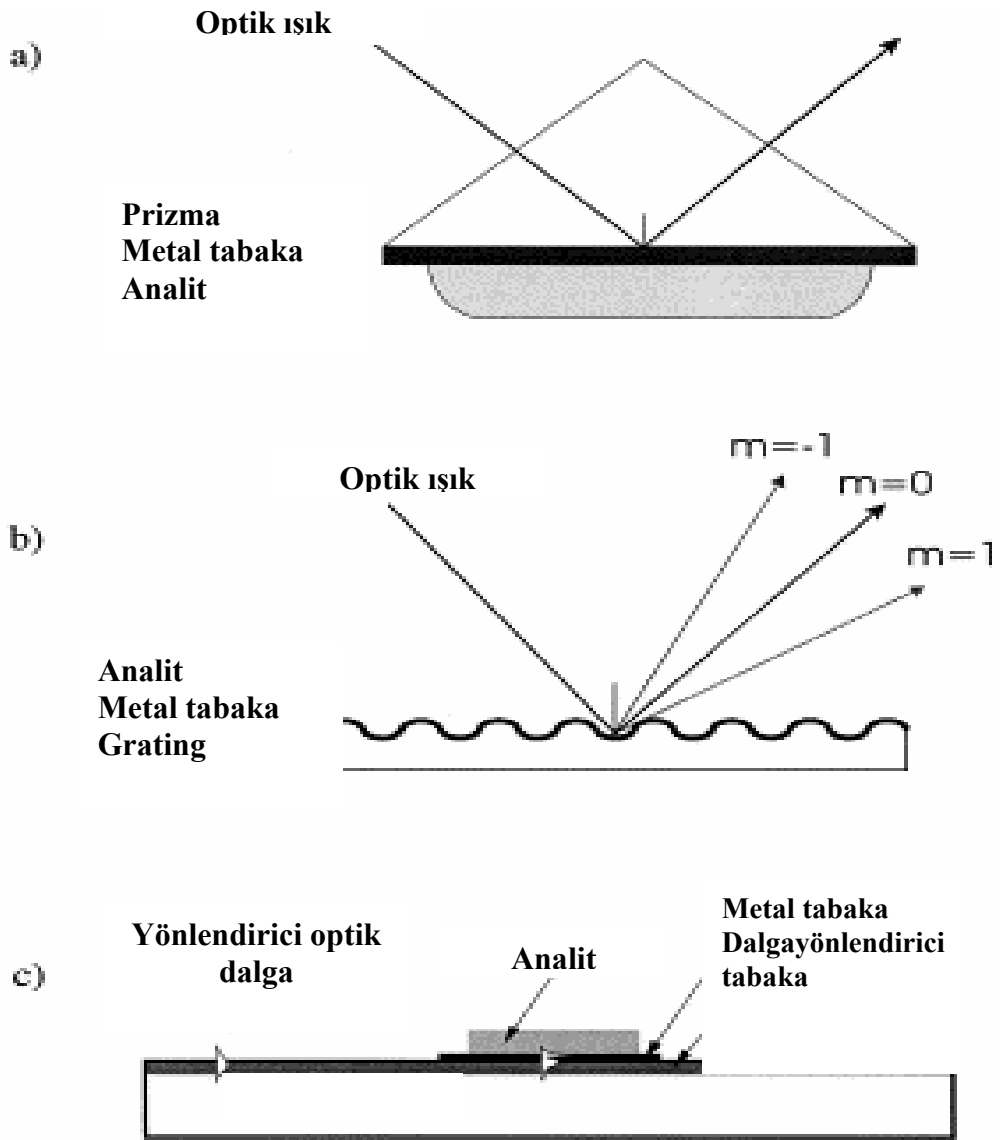
Diğer metallere altın kadar kullanışlı değildir. İndiyum çok pahalı olduğu için, Na oldukça reaktif olduğu için, Ag ise oksidasyona karşı dirençli olmadığı için pek tercih edilmezler.

Rezonans kriterini yerine getirecek ve fotonların momentumunu değiştirecek üç genel SPR cihazı vardır. Bunlar;

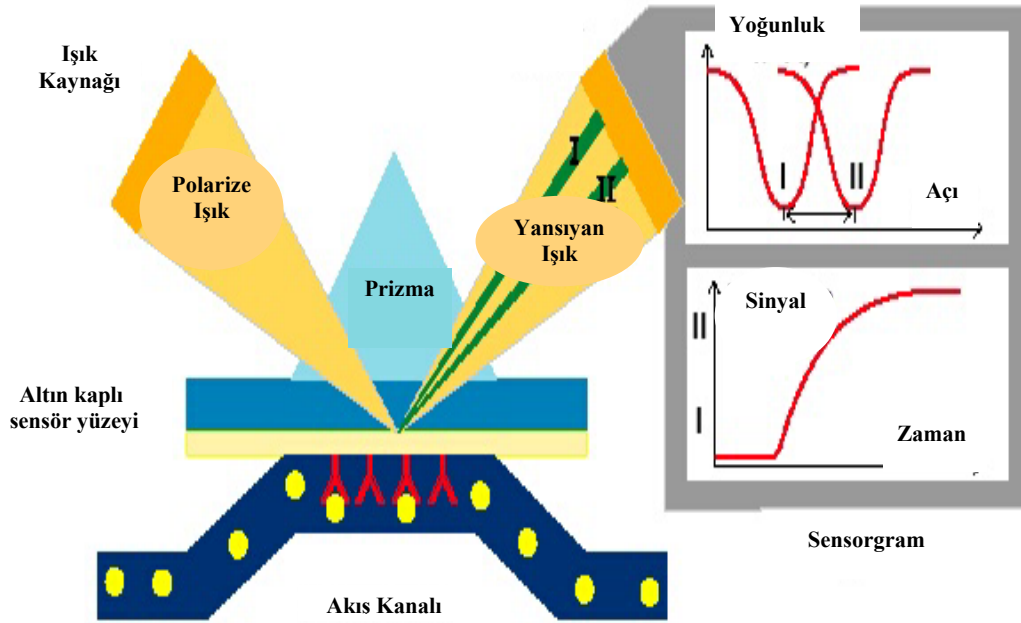
1. Prizma esaslı SPR sistemi
2. Grating esaslı SPR sistemi
3. Optik dalga yönlendirici esaslı SPR sistemi

Şekil 1.15’de görülen her üç sistem de yüzey plazmon rezonansını meydana getirmek için kullanılır. En sık kullanılan sistem prizma esaslı sistemdir. Kretschmann prizması olarak bilinen bu prizma, ışığın bir kısmının iletken filme eşleşmesi, bir kısmının ise kırılarak optik foto-detektöre ulaşması için kullanılır (Karlsen ve ark 1995).

Eğer prizma son derece yüksek kırma indisine sahip bir materyal ile kaplanırsa, yüzeye gönderilen ışığın neredeyse tamamı yansır. Buna karşılık ışığın çoğunluğu prizma içinde geri yansır, bir kısmı da geri yansımadan yüzeyden diğer ortama geçer. Doğrudan yansımadan geçen bu ışığa "uçucu dalga (evanescent wave)" adı verilir. İşte yüzeyden geçen bu uçucu dalga ile serbest metal elektronlarının rezonansa gelmesi söz konusudur. Genellikle prizmayı bir materyal ile kaplamak yerine, prizmanın ince bir metal tabakasına sahip bir sensör çipe monte edilmesi tercih edilir (Şekil 1.16).

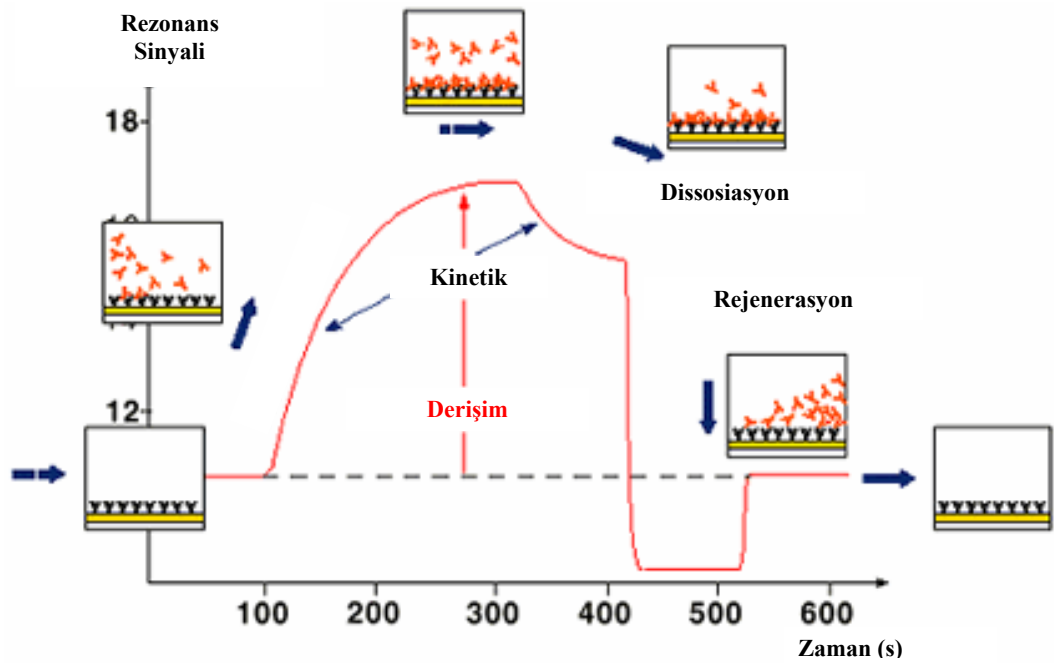


Şekil 1.15. (a) Prizma esaslı, (b) Grating esaslı ve (c) Optik dalga yönlendirici esaslı SPR sistemleri



Şekil 1.16. Yüzey plazmon rezonans spektroskopisi

Sensörde altın yüzeyine analiti tanıyacak, analite özgü antibody, protein, enzim vb. gibi spesifik moleküller bağlanır. Sensör, analit molekülleri içeren örnek ile karşılaştığı zaman, sensör yüzeyindeki analiti tanıyıcı reseptör moleküller, spesifik etkileşimler yoluyla analit moleküllerini kendisine bağlar. Meydana gelen bağlanma miktarı örnek içindeki analit derişimi ile doğru orantılıdır. Burada reseptör molekül ile hedef molekül arasındaki etkileşim sonucu oluşan bağlanma, sensör yüzeyindeki ortamın bileşimini değiştirir. Bu değişiklik yüzey plazmon rezonans dalga boyunda ve rezonans açısında bir kaymaya neden olur. İşte SPR sensörlerde amaç rezonans açısındaki bu kayma miktarını tespit etmektir. Rezonans açısındaki kaymanın büyüklüğü yine bağlanma miktarı ile doğru orantılıdır. SPR analizleri esnasında, analit moleküllerini içeren çözelti belirli bir akış hızıyla akış kanalına enjekte edilir. Daha sonra polarize olmuş ışık sensör yüzeyine gönderilir ve moleküler bağlanma olayları sonucu meydana gelen rezonans açısındaki değişimler tespit edilir ve etkileşimlere ait sensogram elde edilir.



Şekil 1.17. SPR çip yüzeyinde oluşan etkileşimler ve elde edilen sensogram

Şekil 1.17’de verilen örnek sensogramda örnek enjeksiyonu süresince analit molekülleri metal yüzeyine tutturulmuş ligand moleküllerine bağlanır ve bu bağlanma esnasında sinyalde bir artış meydana gelir. Enjeksiyon sonunda, bağlanmış analit molekülleri akış kanalından geçen bir tamponla yer değiştirerek sensör yüzeyinden ayrılmaya başlarlar ve bu durum sinyalde azalmaya neden olur. Rezonans sinyali rezonans birimi (RU) olarak ifade edilir. $1000 \text{ RU} = 1 \text{ mm}^2$ ’lik sensör yüzeyinde 1 ng ’lık derişim değişimi demektir. Bu ilişki yardımıyla SPR çalışmalarında kantitatif sonuçlar elde edilebilir.

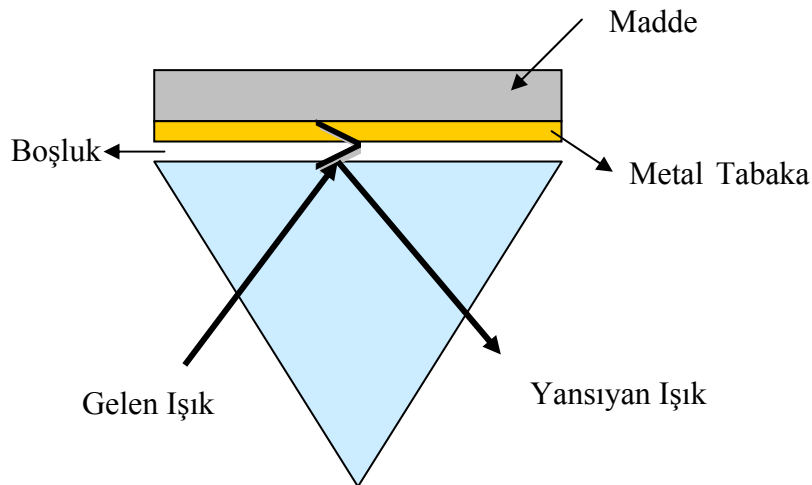
Çizelge 1.5’de SPR parametreleri ve bunlara karşılık gelen değerler verilmiştir.

Çizelge 1.5. SPR parametreleri ve bunlara karşılık gelen değerler

SPR PARAMETRELERİ	KARŞILIK DEĞERLER
SPR açısı kayması	120 miliderece
Yüzeğe bağlı moleköl derişim Değişimi	1 ng / mm ²
Ortamın kırma indisii değişimi	0.001

1.3.2. Otto konfigürasyonu

1968 yılında Andreas Otto, düz bir yüzey üzerinde optik olarak uyarılan plazma dalgası için ilk tekniği geliştirmiştir (Otto 1968). Bu konfigürasyon genel olarak Otto konfigürasyonu veya Otto geometrisi olarak adlandırılır ve Şekil 1.18'de gösterildiği gibi prizmanın içindeki gelen ışık sütununun toplam iç yansımalarını oluşturmak için bir prizma kullanılır. Prizma, metalden hava veya vakum gibi düşük indisli bir malzeme ile ince bir boşluk halinde ayrı tutulur. Prizma hava arayüzünde sönmölenen dalga, hava metal arayüzünde yüzey plazma dalgasını uyararak için hava boşluğu boyunca hava boşluğuna nüfuz eder.

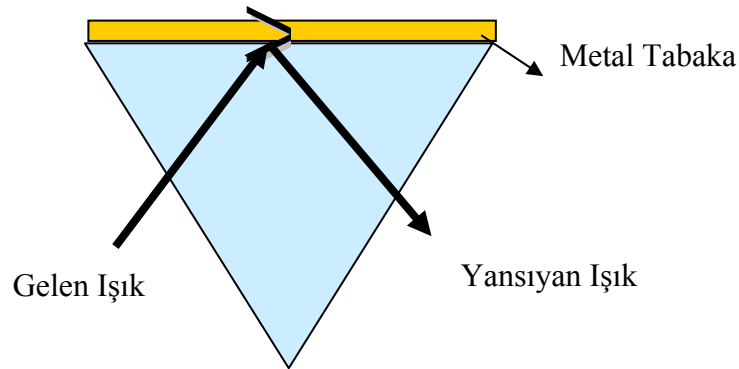


Şekil 1.18. Yüzey plazma dalgasının Otto konfigürasyonu

Aralığın boyutu arttıkça, prizmadan metal yüzeyine eşleşme azalır ve dolayısıyla rezonans derinliği de azalır. Bununla birlikte eğer aralık çok küçük olursa plazma dalgası ışığı prizmanın içine geri yayar ve bu da minimum rezonansda daha yüksek yansımaya neden olur. Görünür ışık için optimum aralık 500 nm civarındadır.

1.3.3. Kretschmann konfigürasyonu

Kretschmann, sönümlenen dalga yoluyla yüzey plazma dalgasına gelen ışıktan enerji transferi için ihtiyaç duyulan eşleşme aralığının metalin kendisi tarafından sağlanabileceğini anladığında, Otto konfigürasyonunda köklü bir değişiklik yapmıştır (Kretschmann ve Raether 1968; Kretschmann 1971). Şekil 1.19'da şematik olarak gösterildiği gibi Otto konfigürasyonundaki hava aralığı, Kretschmann konfigürasyonunda ince bir metal tabakası ile değiştirilmiştir. Prizma metal arayüzünde oluşturulan sönümlenen dalgalar, metal dielektrik arayüzünde yüzey plazma dalgasını uyarmak için metal filme nüfuz etmektedir. Kretschmann konfigürasyonunun belirgin avantajı, ölçüm yüzeyi prizmadan ve optiklerden uzaktır ve böylece sensör konfigürasyonları mümkündür.



Şekil 1.19. Yüzey plazma dalgasının Kretschmann konfigürasyonu

Kretschmann konfigürasyonu için metal film kalınlıkları, yüzey plazma dalgasına verimli bir optik eşleşme elde edebilmek için dikkatli seçilmelidir.

Metal filme nüfuz eden elektrik alanının enerjisi arayüze dik doğrultuda üssel olarak azaldığından, etkileşim gücü metal tabakanın kalınlığının bir fonksiyonudur. Bununla birlikte, eğer metal film çok ince olursa, etkileşim çok fazla güçlü olacak ve optik enerjinin bir kısmı yüzey plazma dalgası tarafından absorbe edileceğine tekrar yayılacaktır. Bu da minimum yüzey plazma rezonansında daha yüksek yansımaya neden olacaktır.

1.3.4. Ligand immobilizasyonu

SPR deneylerinde hedef molekülü tanıyacak ve tutacak reseptör molekülün yapısı bozulmadan sensör yüzeyine bağlanması gereklidir. Bu bağlanma iki şekilde gerçekleşir

- Kovalent immobilizasyon
- Kovalent olmayan immobilizasyon

1.3.5. Kovalent immobilizasyon

Metal yüzeyi ile ligand arasında güçlü bir etkileşim kurulur. Bu tür bağlanmanın en büyük avantajlarından birisi hemen hemen her protein için uygulanabilmesidir. Fakat iki önemli dezavantajı vardır. Birincisi kovalent immobilizasyon ile yüzeye bağlanan moleküllerin rejenerasyonu çok zordur. İkincisi bu tür bağlanma ile analitin reseptör moleküllere tutunması güçleşir.

1.3.6. Kovalent olmayan immobilizasyon

Hidrojen bağlanması, Wan Der Waals etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimleri gibi ikincil bağlanmalar ile de metal yüzeyine moleküllerin bağlanması sağlanabilir. Kovalent olmayan bağlanmanın avantajlarından en önemlisi, bu bağlanma ile proteinlerin çok nadiren yapılarının bozulmasıdır (Myszka 1999).

1.3.7. SPR sensörlerin uygulama alanları

- Biyomoleküler Etkileşimlerin Kinetiğinin Belirlenmesi
 - i. Protein-Protein Etkileşimi
 - ii. Protein-DNA Etkileşimi
 - iii. DNA-DNA Etkileşimi
 - iv. Enzim-Substrat Etkileşimi
 - v. Antibadi-Antibadi Etkileşimi
- Klinik Teşhisler
- Çevresel Analizler
- Tarımsal Pestisit ve Antibiyotik İncelemeleri

1.4. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)

1.4.1. Sensörler

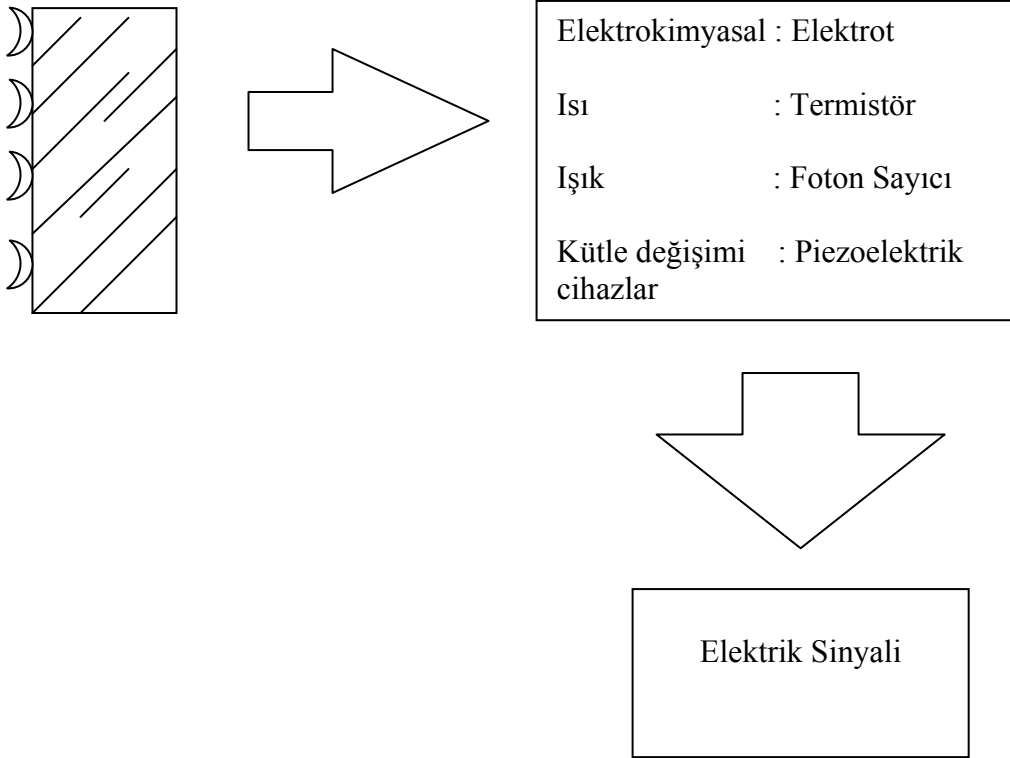
Endüstri, çevre mühendisliği ve ilaç alanındaki gelişmeler, her geçen gün yeni yöntemler ve yüksek hassasiyet gerektiren yöntemlere olan ihtiyacı arttırmaktadır. Bu yeni yöntemlerden birisi de yüksek seçiciliğe sahip sensörlerin kullanılmasıdır. Genel anlamda sensörler, kimya, biyoloji, fizik, mühendislik gibi pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanıp moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik cihazlar olarak tanımlanabilir. Sensörler analiz edilen madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren aktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulur (Wang 1997). Bir sensörün genel gösterimi Şekil 1.20’de verilmiştir.

Sensörlerin doğası, girdi miktarına yanıt olarak gelen sinyalleri üretmektir. Çıkış sinyali genellikle elektrikseldir, dijital voltaj pulslarını veya girdi miktarının değerini frekansı halinde gösteren olası titreşen voltajı içerir. Belirli bir analiz için kullanılan sensörlerin uygunluğuna katkıda bulunan faktörler sıcaklık ve basınç

gibi fiziksel parametreler ya da örnek matriksinden doğan kimyasal girişimler içerebilir. Sensörlerin hepsi idealden az ya da çok sapmaktadır. Ayrıca kabul edilebilir karakteristikler genellikle uygulama fonksiyonlarıdır. Bu nedenle, verilen matrikste bulunan belirli bir analiti saptamak için iyi bir performansa sahip sensör farklı koşullarda aynı analiti saptamak için uygun olmaz.

Aktif Yüzey

Transdüser



Şekil 1.20. Sensörlerin genel gösterimi

1.4.2. Gravimetrik sensörler

Gravimetrik sensörler, sensör yüzeyindeki nanogram seviyelerinde kütle değişimini ölçebilen son derece hassas yüzey sensörleridir. Kütle duyarlı bu sensörlerin çalışma prensibinin temeli asimetrik kristallerin sahip oldukları “piezoelektrik etki” özelliğine dayanmaktadır (Ralf ve ark. 2000).

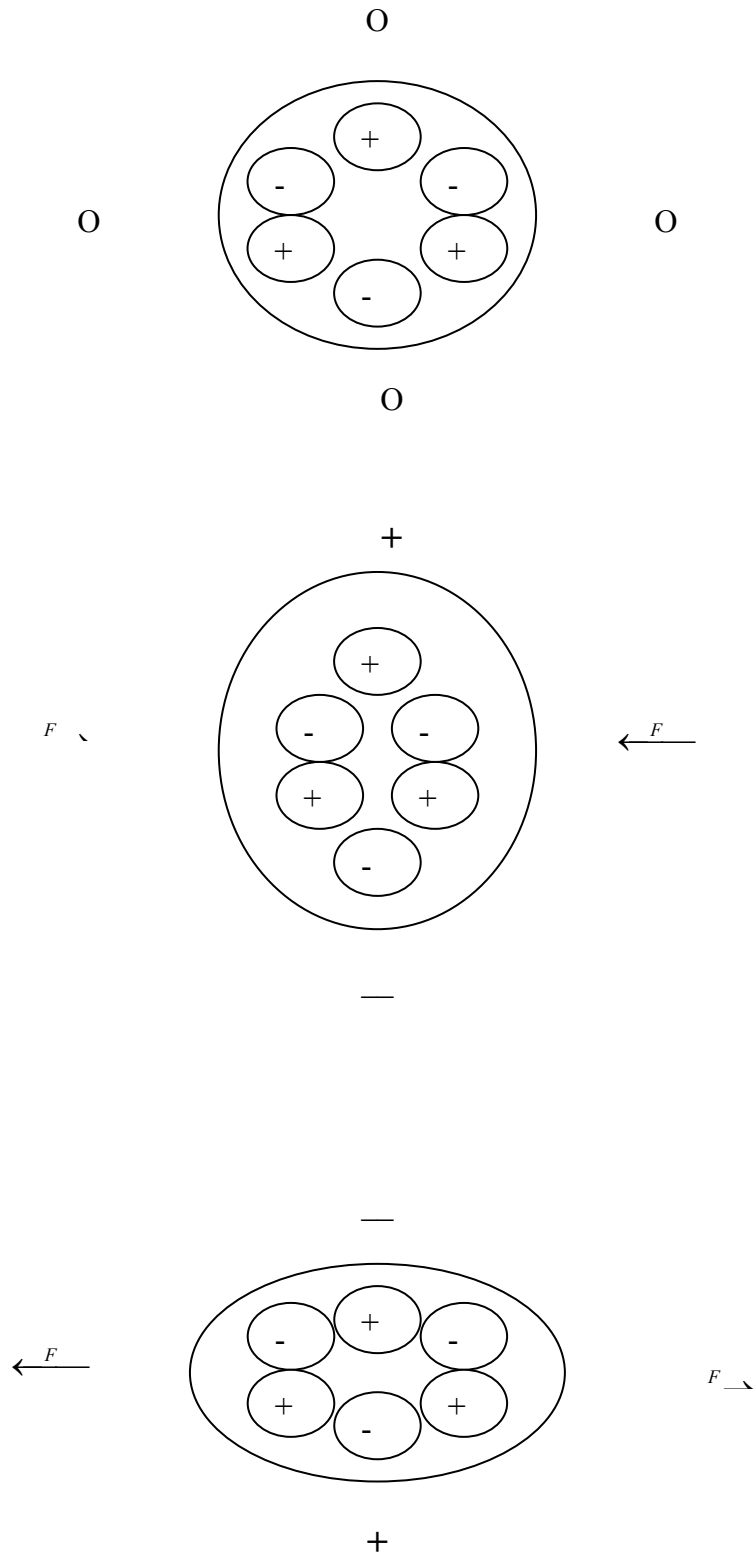
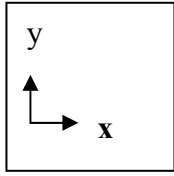
1.4.3. Piezoelektrik etki

Piezoelektrik etki, bir elektrik potansiyelinin uygulanmasıyla asimetric bir kristalin deformasyonudur ve bu özellik oldukça duyarlı kütle sensörlerinin yapılmasında kullanılır. Piezoelektrik etkiye sahip bir kristal mekanik olarak deforme olduğunda, yüzeyinde elektrikselsel bir potansiyel oluşur. Bunun tersine kristalin yüzeyine potansiyel uygulandığı zaman kristal deforme olur. Bu özelliğe sahip bir kristal uygun bir elektrik devresine bağlanırsa kristalin kütesine ve şekline bağlı olan sabit bir frekansta titreşim yapar (Yao 1997).

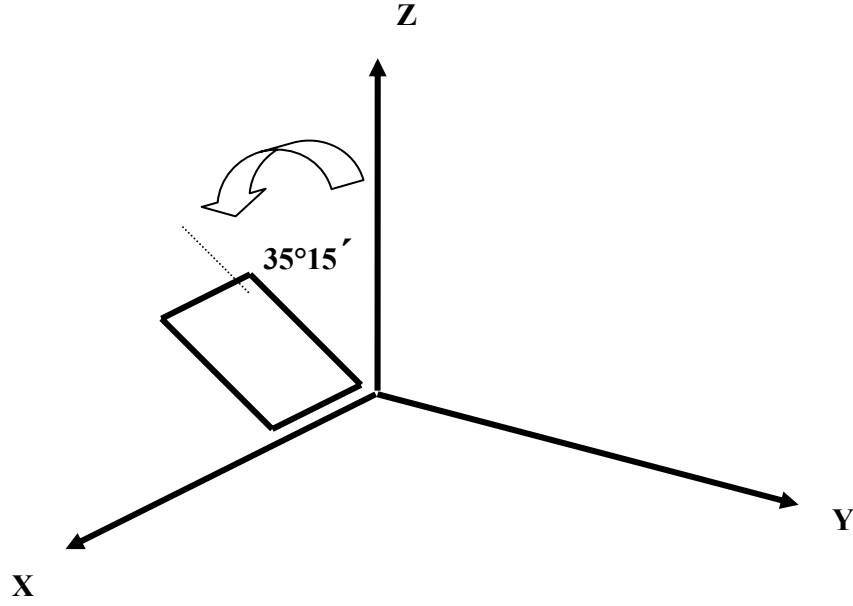
Şekil 1.21’de piezoelektrik etkiye sahip kuvars kristalinin x-ekseni doğrultusunda uygulanan itme veya çekme kuvvetleri ile deformasyonu ve y-ekseni doğrultusunda oluşan yük değişimi gösterilmiştir. Kuvars kristallerin bu özelliğinden pek çok doğru ve duyarlı analitik cihaz yapılmasında yararlanılmaktadır. Piezoelektrik sensörlerin en önemli uygulaması ise “Kuvars Kristal Mikroterazi” (QCM) dır.

Kuvars kristali, silikon ve oksijenden elde edilir ve SiO_2 kimyasal formülüne sahiptir. Kuvars sadece SiO_2 ’nin oluşturduğu bir mineral değildir. SiO_2 kumun ana bileşenlerinde de çok miktarda bulunmaktadır. Kuvars kristali doğada bulunabilmesine rağmen, yüksek fiyatı kuvars endüstrisinin gelişimini arttırmıştır. Piezoelektrik ve mikroelektroniklerin kombinasyonu ile cihaz tasarımları 1960’larda başlamıştır. Ticari olarak kullanılan başlıca piezoelektrik maddesi kristalin kuvarsıdır (silikon oksit). Üç boyutlu simetric bir eksene sahiptir ve merkezi bir simetriye sahip değildir. Gerilimden yoksun olması oksijen ve silikon atomlarının hareketine neden olur. Bu deformasyon, şarj merkezlerinin ve elektrik polarizasyonunun ayrılması ile sonuçlanır. Kuvars kristal elektrikselsel, mekanik ve kimyasal özellikleri nedeni ile ticari piezoelektrik malzemelerin en kullanışlısıdır (Lu ve Czanderna 1984).

Kuvars kristal, kimyasal doğasına, şekline, boyutuna ve kütesine bağlı olan doğal bir titreşim frekansına sahiptir. Kristalin kırılmasının rezonans frekansı üzerinde bir etkisi vardır (Heising 1946). AT-kesimli bir kristal, uzunluk yönü olarak (x-ekseni) 35 derece 15 dakika açısında kuvars bir kristalin kesilmesi ile oluşur. AT-kesim kuvars kristal düzlemi Şekil 1.22’de gösterilmiştir.



Şekil 1.21. Piezoelektrik etkinin şematik gösterimi



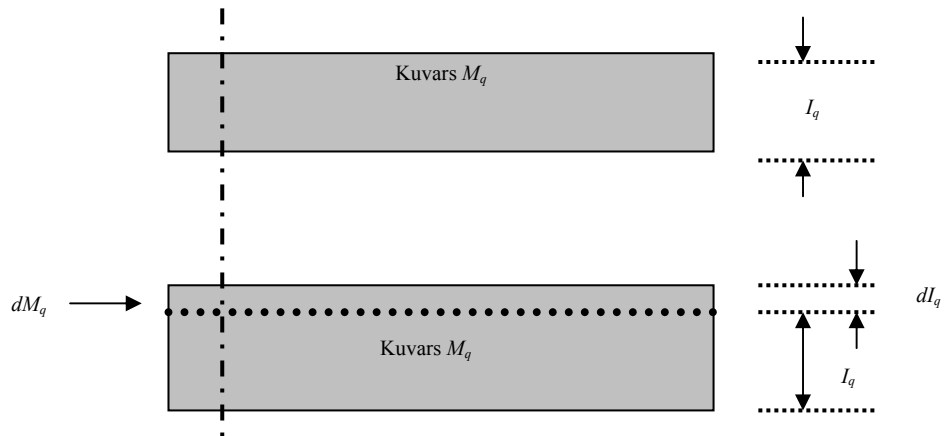
Şekil 1.22. AT-kesim kuvars kristal düzlemi

Kristallografik eksene bağlı olan kuvars kristal düzleminin yönlenimindeki küçük bir değişiklik, rezonans türünü değiştirmez. Bununla birlikte kristallografik yönlenim ve rezonans frekansı ısı ve gerilimin etkisine karşı aşırı duyarlıdır (Lu ve Czanderna 1984). Standart AT-kesimli kuvars kristalinin avantajı oda sıcaklığı civarındaki sıcaklıklarda neredeyse sıfır frekans değişimine sahip olmasıdır. Bu oda sıcaklığında işlem yapılabilmesi için rezonatör gerektiren uygulamalar için oldukça fazla tercih edilen bir özelliktir.

Kuvars kristali, karşılıklı olarak mekanik enerjiyi elektrik enerjisine dönüştürme yeteneğine sahiptir. Bir piezoelektrik kuvars kristal rezonatörü, kuvarsın tek kristalinden kesilmiş bir parçadır. Kuvars kristal birimine periyodik bir voltaj uygulandığında kuvars kristal varolan voltajın frekansında titreşim yaratabilir.

1.4.4. Sauerbrey eşitliği

Nicel kütle ölçümleri için piezoelektrik kuvars rezonatörlerinin uygulanması için, bağıl boşluk ve rezonans frekans ile eklenen kütle boşluğu arasındaki nicel ilişkinin geliştirilmesi gereklidir. 1959'dan önce, frekans boşluğunu kapsayan bu kütlelerin anlaşılması sadece nitel bir bazda olmuştur. Ama Sauerbrey (1959) kuvars kristal bir rezonatörün frekans boşluğunun eklenen kütle ile direkt orantılı olduğunu göstermiştir. Sauerbrey'in çalışması genel olarak bilimde büyük bir buluş ve çok küçük kütlelerin ölçülmesinde yeni bir nicel araç olarak kabul edilebilir. Kuvars plaka kütledeki bir artış, rezonans frekansında bir düşüğe neden olmaktadır.



Şekil 1.23. Kuvars kristal mikroterazinin basitleştirilmiş bir modeli

Şekil 1.23'de verilen kuvars kristal mikroterazinin basit şeklinde M_q kütlede ve I_q kalınlığındaki titreşimli kuvars kristalinin işleyiş prensibi görülmektedir. Temel durumda, kuvars bir kristal levhanın salınması için rezonans frekansı şu şekilde tanımlanır: (Lu ve Czanderna 1984)

$$f_q = \frac{V_q}{\lambda_q} = \frac{V_q}{2l_q} \quad (1.3)$$

Bu eşitlikte;

- f_q : rezonans frekansı
 V_q : dalga hızının kırılması
 λ_q : dalga boyudur ve $2l_q$ ye eşittir.

Kristal kalınlığındaki çok az bir değişim (dl_q), titreşim frekansında kaymaya (df_q) neden olur.

$$\frac{df_q}{f_q} = - \frac{dl_q}{l_q} \quad (1.4)$$

M_q kütleli kuvars kristal için dM_q kütle değişimi aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$\frac{df_q}{f_q} = - \frac{dM_q}{M_q} \quad (1.5)$$

Eşitlik (1.4) ve (1.5)'ün birleştirilmesiyle eşitlik (1.6) elde edilir.

$$\Delta f_q = - \left(\frac{2f_q^2}{\rho_q} \right) \frac{\Delta M_q}{A} \quad (1.6)$$

Burada;

- Δf_q : frekans değişimi
 f_q : değişiklikten önceki rezonatörün rezonans frekansı
 ΔM_q : kütle değişimi
 A : osilasyon altındaki kuvars düzlemin alanı
 ρ_q : kuvarsın yoğunluğudur.

1.4.5. Sıcaklığın rezonans frekansına etkisi

Sıcaklık değişimi birçok maddenin fiziksel sabitlerini etkilediğinden kuvars kristal mikroterazi cihazları üzerinde de önemli etkilere sahiptir. Üretim yönü ve kesimi farklı piezoelektrik malzemeler sıcaklık değişikliklerinde farklı özellik gösterirler (Thompson ve Stone 1997). Bu nedenle, sıcaklık sensörlerini baz alan ve pek çok kuvars kristallerinin geliştirilmesine olanak sağlayan, spesifik sıcaklık özelliklerine sahip kuvars kristal rezonans cihazları geliştirmek mümkündür. (Hauden ve ark. 1981; Neumeister ve ark. 1990; Viens ve Cheeke 1990).

Sıcaklığın rezonans frekansına olan etkisinin kristallografik yönlenime duyarlı olduğu bulunmuştur (Lu ve Czanderna 1984). Standart bir AT-kesimli kuvars kristali rezonatörü için rezonans frekansı oda sıcaklığındaki sıcaklık değişimlerine daha az duyarlıdır. Çizelge 1.6'da AT-kesimli ($35^\circ 15'$) kuvars kristal rezonatörünün frekans kaymasının sıcaklık değişimine bağımlılığı verilmiştir (Lu ve Czanderna 1984).

Çizelge 1.6. AT-kesimli ($35^\circ 10'$) kuvars kristal rezonatörün sıcaklık etkisiyle frekans kayma değerleri

T (°C)	$\Delta f/f$ (ppm)
20	0
30	0
60	4
80	18
100	45

1.4.6. Kuvars kristal mikroterazi uygulamaları

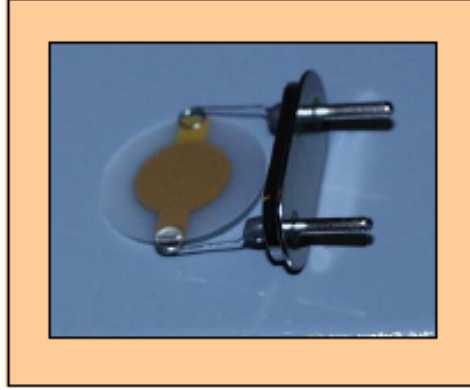
Kuvars kristal mikroterazi (QCM), kütleli değişiklikleri, bir elektrik sinyaline çevirebilen mükemmel bir yaklaşımdır. Çünkü oldukça hassastır ve

frekansın çıkış sinyaline dönüşümü kolaydır. QCM elektrokimyada çokça kullanılan piezoelektrik bir transdüserdir. İlk kullanımı 18. yüzyılın başlarına dayanır. Bu cihazlar bir elektrokimyasal işlem sırasında meydana gelen kütle değişimlerini, kolayca ölçülebilen bir sinyal olan, rezonans frekansında sapmaya dönüştürürler. Cihazların en önemli özelliği çalışmalarda bir elektrokimyasal reaksiyon süresince yüksek kütle hassasiyeti göstermesidir.

QCM özel bir biçimde kesilmiş kuvars kristaller içerir. Bu kuvars kristal piezoelektrik etkiye sahiptir. QCM aparatları genellikle kuvars elektrot, osilatör ve PC yüzeylerarası frekans sayıcıdır. Alternatif, yüksek akımlı bir elektrik alan uygulanmasıyla, QCM mekanik rezonans modunda salınım yapar. Kütle hassasiyeti kristalin toplam kütlesi üzerindeki osilasyon frekansına bağlı olarak ortaya çıkar. Çözelti ile temas eden rezonatör (ki bu genellikle kuvars kristaldir) oldukça kararlı sinyal veren bir elektronik devreye bağlıdır. Rezonatör üzerindeki herhangi bir değişiklik osilasyon frekansında ani bir değişime neden olur. Elektrot üzerindeki kütle birikiminin neden olduğu frekans değişimi Sauerbrey (1959) eşitliğinden elde edilir.

QCM sensörleri bir örnek ve bir referans olmak üzere iki adet kuvars kristal içerirler. Elektrik akımı uygulandığında her bir kristal yaklaşık 15 MHz'lik (kristal sıcaklığına bağlı olarak) bir rezonans frekansına sahip olur. Örnek kristal, referans elektrottan yaklaşık olarak 1kHz den aşağı frekansta yerleştirilmiştir. Kristaller optik olarak parlatılmış ve bir metal (genellikle altın veya gümüş) ile kaplanmıştır. Örnek kristali üzerinde madde birikirken rezonant frekansı da değişir ve Sauerbrey eşitliğinde de görüldüğü gibi bu frekans değişikliği direkt olarak, kütle değişimi ile orantılıdır. Yöntemin hassaslığı çok küçük sıcaklıklara bağımlı özel kesim kristaller ve referans kuvars kristallerin kullanımıyla sağlanmaktadır.

QCM'in yonteme adını veren en yaygın uygulaması, sensör elektrotları üzerindeki kütle birikimlerinin ölçümüdür. Kimyasal maddelerin veya biyomoleküllerin spesifik tayinleri için yapılan uygulamalarda kristal elektrotlar, moleküllerin bağlanması veya adsorbsiyonu için ince filmlerle kaplanır. QCM için kullanılan kuvars elektrot Şekil 1.24'te görülmektedir.



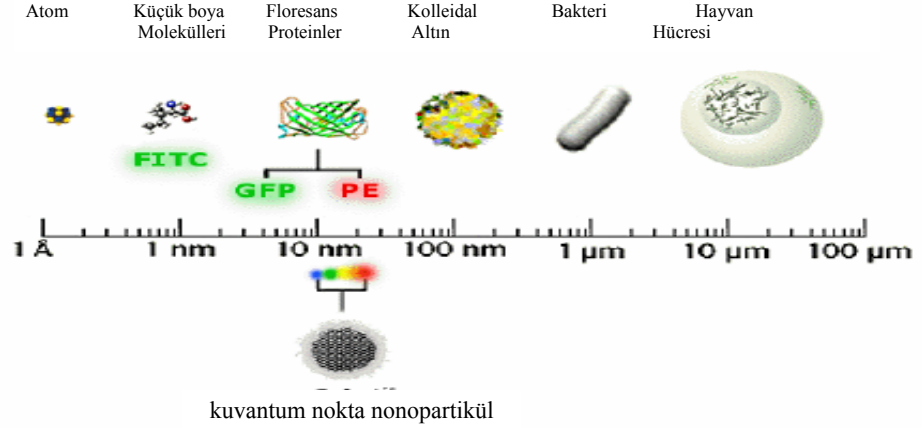
Şekil 1.24. Kuvars kristal elektrot şekli

QCM'in kimyadaki uygulamaları oldukça geniştir. Örneğin toksik gaz sensörü olarak, modifiye metal yüzeylerinde, antijen/antibadi etkileşimleriyle spesifik molekül tayinlerinde kullanımı son zamanlarda oldukça popüler hale gelmiştir. QCM uygulamaları içinde kütle, yoğunluk, elastiklik, viskozite ve kayralite tayinleri de yer alır. Genellikle sıvı ortamda gerçekleştirilen QCM sensör uygulamalarında, analiz edilecek sıvının yoğunluğu ve viskozitesi titreşen kristalin rezonant davranışını etkiler ve böylelikle sensör tarafından ölçüm gerçekleştirilmiş olur (Behling ve ark. 1998).

1.5. Kuantum Nokta Nanopartiküller (Nanokristaller)

Kuantum nokta nanopartiküller nanoyapıda malzemelerdir (Niemeyer 2001). Aynı zamanda nokta yapıları malzemeler, yarı iletken nanokristaller ya da nanokristaller olarak da bilinirler. Küresel yapıdadırlar ve yarıçapları 1-12 nm aralığındadır. Böylesine küçük yapılar (yığın malzemeler ile kıyaslandığında Bohr yarıçapından daha küçük veya yakın) kuantum kapama etkisi nedeniyle yığın katılardan farklı davranış gösterirler (Alivisatos 1996; Murphy ve Coffey 2002). Kuantum nokta nanopartiküller yüksek emisyon verimleri, boyutları ile ayarlanabilir emisyon profilleri ve dar spektral bantları ile önemli optoelektronik özelliklere sahiptirler (Murphy ve Coffey 2002; Weller 1993). Bu özellikleri nedeniyle bilim ve teknolojiye yeni uygulamalara yön vermektedirler.

Yarı iletken nanopartiküller birkaç nm büyüklüğündeki atomların birkaç yüz ve binlik kristalin kümelenmesi ile oluşur (Şekil 1.25). Bu kolloidal nanokristalik yarı iletkenler periyodik tablonun II-VI, III-V ya da IV-VI gruplarından oluşabilir.



Şekil 1.25. Kuantum nokta nanopartiküllerinin büyüklüğünün diğer materyallerle kıyaslanması (GFP: Yeşil floresans protein, PE: Phycoerythrin, FITC: Floresans izotiyosiyonat)

CdS'ün kolaylıkla sentezlenebilmesi (Herz 2003), yarı iletken nanopartiküllerin spesifik optik, elektronik, fiziksel ve kimyasal özellikleri nedeniyle yaygın kullanımını arttırmıştır. Genellikle floresans olmayan bu bileşikler, nanometre ölçeğinde sentezlendikleri zaman yoğun, uzun süren luminesans yayılımına sahip olurlar. Yarı iletken kuantum nokta nanopartiküller, değerlik ve iletkenlik bantları arasındaki enerji düzeyleri ile karakterize edilirler. Bu özellikler nanopartiküllerin yüksek yüzey/hacim oranına sahip olmasından, yüzey atomlarının oranının fazla olması ve kuantum sınırlama etkisinden kaynaklanmaktadır (Tong ve Zhu 2006; Martinez ve ark. 2005). Yarı iletkenlerin büyüklüklerinin ve bileşiminin değiştirilmesi ile optik ve elektronik özelliklerinin değiştirilmesi sağlanabilir. Elektronik band aralıkları nanopartiküllerin büyüklüğüne ve şekline bağlı olduğundan CdS nanopartikülleri farklı uygulamalarda kullanılabilir.

Yarıiletkenlerin yüzeyi matris materyalleri ile, organik çözücülerle ve su ile uyumlu hale getirilebilir. Polimerler, epoksiler, silikonlar, oksitler, sol-jeller,

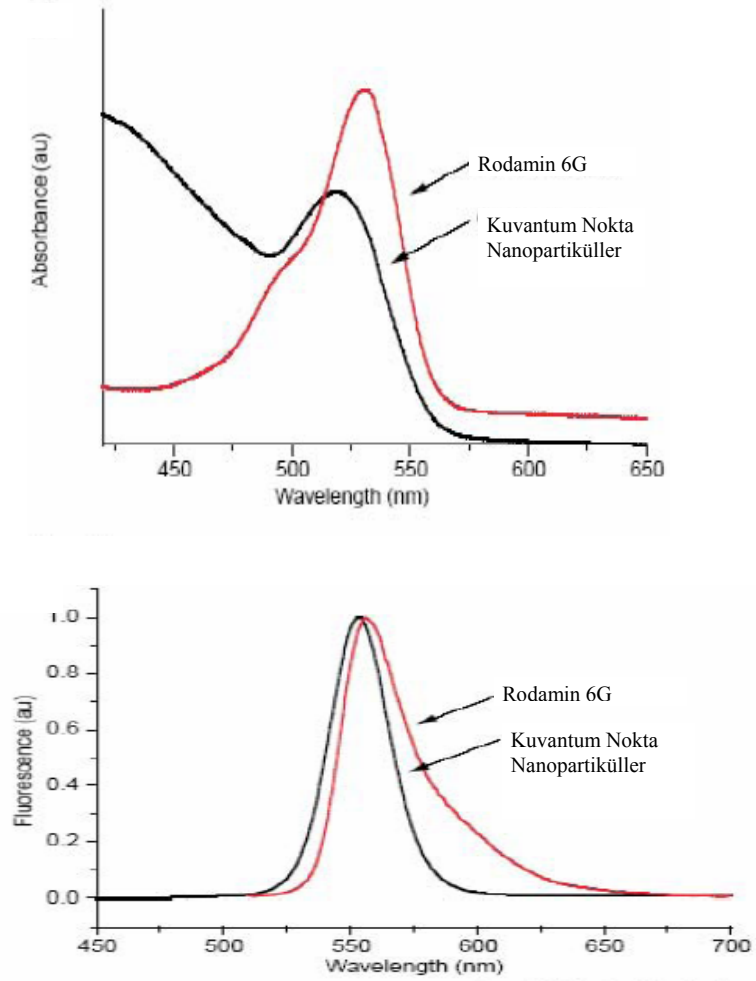
silika ve titanyum gibi matriks malzemeleri ile birleştirilmeleri sonucunda opto-elektronik alanda geniş kullanım alanına sahiptir. Diğer kullanım alanları ise fotovoltaiik aletlerde, elektrolüminesans davranışlarda, ışık yayan diyodlarda, güneş hücrelerinde, telekomünikasyonda, sensör ve optik olarak veri kaydedicilerde uygulama alanına sahiptir. (Zn, Mn)Se gibi seyreltik manyetik yarı iletken nanopartiküller spintronik aletlerde kullanılır (Tong ve Zhu 2006; Chu ve ark 2005).

Quantum dotların büyüklüğe bağı özelliğlerinin yanında aynı zamanda biyolojik makro moleküllerle boyutsal benzerlikleri nedeni ile son zamanlarda kuvantum nokta nonopartiküllerin biyolojik çalışmalarda kullanımı artmıştır. Yarıiletken nanopartiküllerin yüzey aktifliğinin fazla olması ve biyolojik moleküllerle etkileşimi sayesinde kuvantum nokta nonopartikül biyokonjugeleri hazırlanabilir (Li ve ark. 2003). CdS nanopartikülleri streptavidin, biyotin, antibodi, oligonükleotit gibi moleküllerle konjuge etmek olasıdır ve bu moleküllerin spesifik moleküler tanıma özellikleri sayesinde biyolojik analizlerde biyoorganik dedektör olarak kullanılabilir. Nanopartiküllerin bu uygulamaları sayesinde organik floroforların kullanımı azalmıştır. Kuvantum nokta nonopartiküller organik florofor grupları ile kıyaslandığında dar, ayarlanabilir ve simetrik emisyon spektrumu, geniş bandlı uyarılma, yüksek fotoağarma eşiğı ve kimyasal kararlılığının iyi olmasından dolayı avantajlıdır.

CdS nanopartiküllerle konjuge edilen antibodilerle proteinlerin etkileşimlerine bağı olarak proteinlerin kantitatif tayini çoklu olarak gerçekleştirilebilir. Son zamanlarda nanokristallerin protein moleküllerinin konjugasyonu üzerine çalışmalar yapılmış, bunun yanında oligonükleotitlerle ve nükleik asitlerle bağlanmasına yönelik uygulamalar da yaygın olarak çalışılmıştır. Bunun yanında CdS ve CdSe gibi nanopartiküllerinin yüzeyi immunoglobulin G (IgG) ve streptavidin ile konjuge edilmesi sonucunda canlı sisteminde kanserli hücrelerin görüntülemesinde ve teşhisinde kullanılmıştır (Merkoçi ve ark. 2005; Riegler ve Nann. 2004; Wang. 2005; Mattoussi ve ark. 2004; Arya ve ark 2005) ve elde edilen floresans spektrumları Şekil 1.26'da verilmiştir.

Kuvantum nokta nonopartiküllerin biyolojik moleküllerle bağlanması kovalent etkileşimle, elektrostatik etkileşimle, hidrojen bağı ve hidrofobik

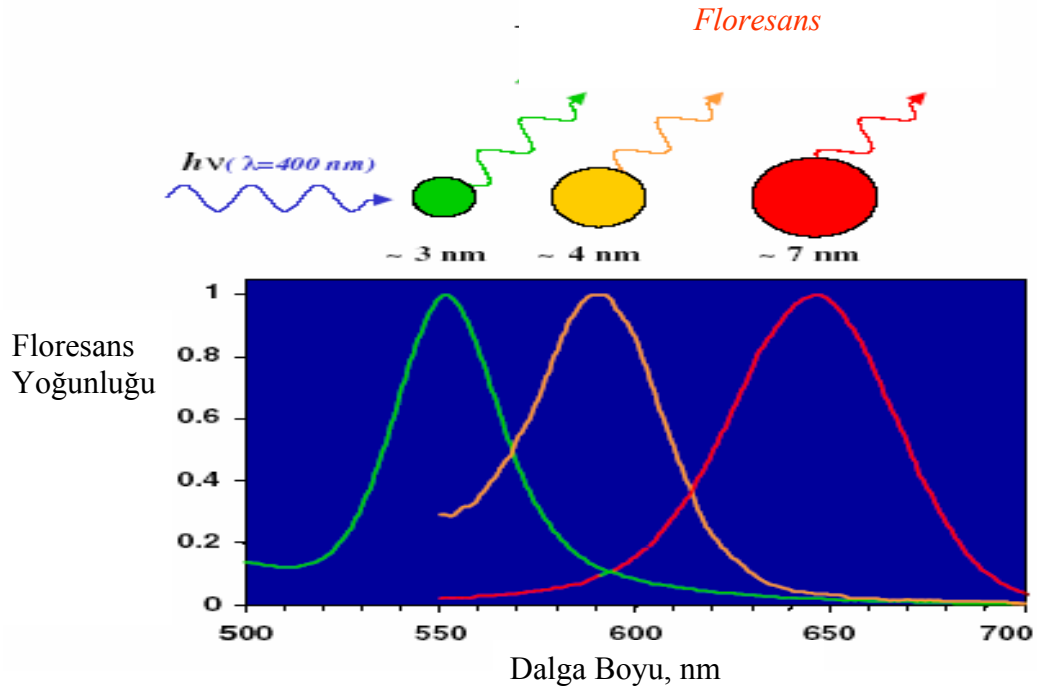
kuvvetlerle olabilir (Lin ve ark. 2003). Yarıiletken nanopartiküllerin yüzeylerinin çeşitli stabilize edici maddelerle kaplanması sonrasında Cu, Zn, Ag gibi çeşitli iyonların seçici olarak ayrımı gerçekleştirilebilmektedir (Chen ve Rosenzweig 2002; Chen ve Zhu 2005; Xie ve ark 2004).



Şekil 1.26. Organik florofor grubu ile kuantum nokta nanopartiküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumları

1.5.1. Nanopartiküllerin özellikleri

Yarıiletken kuvantum nokta nanopartiküller değerlik ve iletken elektron bandları arasındaki band aralığına bağlı olarak karakterize edilebilir. Nanopartiküllerin büyüklüğü azaldıkça yarıiletken nanokristallerin bant aralığı artar. Kuvantum nokta nanopartiküllerin büyüklüğü değiştiğinde bant aralığı ve kuvantum sınırlama enerjileri değiştiği için yayılan ışın rengi değişir (Şekil 1.27). Materyalin türüne ve büyüklüğüne bağlı olarak kuvantum nokta nanopartiküller gönderilen ışığı farklı dalga boylarında yayarlar. Örneğin 4-5 nm büyüklüğündeki CdSe UV ışığında tutulduğunda yüksek floresans özellik gösterir (José ve ark. 2006).



Şekil 1.27. Farklı büyüklükteki nanopartiküllerin farklı dalga boylarında ışığı yayması

Nanokristallerin başlıca özellikleri şöyledir;

- * Kararlılık: Nanokristaller çok kararlıdır. Basit inorganik bileşiklerden oluşan nanokristaller kimyasal olarak inerttir, dış kabukları fotokimyasal hasara karşı

dayanıklıdır. Nanokristallerin kolloidal süspansiyonları çok kararlıdır ve zamanla çökmezler.

- * Çevresel duyarlılık: Nanokristallerin ligandlar ile kaplanması ile çevresel şartlara bağlı olarak değişime duyarlıdır.
- * Emisyon spektrumu: Organik boyalara göre kıyaslandığında emisyon spektrumları daha dardır. Tekli nanokristallerin partikül boyutu 12 nm'den daha küçük olabilir. Nanokristallerin emisyon dalga boyu, büyüklüğüne bağlıdır, bu nedenle ayarlanabilir.
- * Uyarılma spektrumu: Uyarılma spektrumu çok geniştir. Bu nanokristaller için avantajlıdır, böylelikle nanokristaller emisyon pikinden daha düşük herhangi bir dalga boyunda uyarılabilirler. Farklı emisyon piklerine sahip nanokristallerin karışımı tek dalga boyuna sahip ışınla etkili bir şekilde uyarılabilir, bu şekilde eşzamanlı olarak tayini, görüntülemeyi ya da kantitatif tayini kolaylaştırır. Nanokristaller çok parlak floresans yayarlar. Uyarılma ve emisyon dalgaboyları arasındaki fark yüksektir, bu sayede uyarılma ve emisyon ışını daha kolay ayrılır ve saçılmadan dolayı gürültü azalır.
- * Floresans ömrü: Nanokristaller, organik boyalar (1-5 ns) ve hücrel otofloresanslara (2-3 ns) göre uzun floresans ömrüne sahiptirler (10 ns). Bu nedenle floresans ömür deneylerinde diğer floresans kaynaklarından ayırt edilebilir.
- * Yüzey kimyası: Nanokristaller farklı kaplama grupları ile kaplanması ile yüzey kimyası çalışmaları genişletilebilir. Belirli biyolojik moleküllerle spesifik olarak bağlanabilirler (Knight ve ark. 2004). Nanopartiküllerin özelliklerini kontrol edebilmek için nanopartiküllerin yüzeyi kontrol edilebilmeli ve modifiye edilebilmelidir. Bu yüzey modifikasyonu kimyasal yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Yüzey pasifleştirilmesi, partiküllerin organik ve inorganik materyallerle kaplanması ile gerçekleştirilebilir. Tiyopiridinler ve tiyolatlar gibi organik ligandlarla kaplanma sonucunda yüzey hataları azalır ve lüminesans etkinliğinde artma gözlenir. İyi bir yüzey modifikasyonu için ise CdS nanopartikülleri ile çekirdek/kabuk nanopartikülleri hazırlanabilir. Stabilize edici maddelerin kullanılması ile yüzey modifikasyonu gerçekleştirilmesi sonucunda partiküllerin büyümesi ve aglomerasyon önlenir.

Stabilizörler nanopartiküllerin kararlılığı, çözünürlüğü ve ışık emisyonu gibi kimyasal ve fiziksel özelliklerini etkiler. Stabilizörlerle yüzey modifikasyonu önemli bir şekilde kuvantum verimini artırır. Fosfin oksit, fosfatlar, çeşitli tiyol grupları, biyolojik moleküller yaygın olarak kullanılan stabilizörlerdir.

1.5.2. Kuantum nokta nanopartiküllerin sentezi

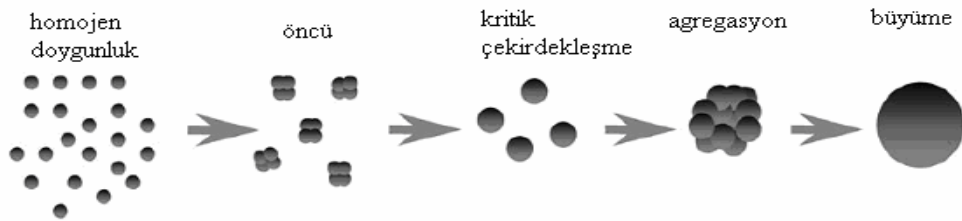
Yüksek kaliteli yarı iletken nanokristallerin sentezlerindeki ilerlemeler kuvantum nokta nanopartiküllerin uygulamalarındaki gelişmelerde kritik bir rol oynamıştır ve oynamaya devam etmektedir. Litografi temelli teknolojiler, kuvantum nokta nanopartiküllerin uygun substratlar üzerinde geliştirilmesinde yaygın olarak kullanılmıştır (Henini ve ark. 1997). Bununla birlikte, tek kristalli yapılarıyla, iyi kontrol edilen boyut ve boyut dağılımlarıyla kolloidal nanokristaller, karışım çözeltilerinde organometalik işaretleyiciden başlatılarak nispeten daha kolay nanokristal-büyütme teknikleriyle hazırlanabilirler (Alivisatos 1996; Murphy ve Coffey 2002).

İşaretleyicilerin bulunabilirliği ve kristalleşmenin basitliği nedeniyle CdS ve CdSe en çok çalışılan kolloidal kuvantum nokta yapılarıdır. Murray ve ark. (1993), yüksek sıcaklıklarda koordinasyon çözeltilerinin varlığında kuvantum nokta nanokristal işaretleyici olarak dimetilkadmiyum kullanarak yüksek kaliteli Cd-kalcojenit nanokristallerin sentezlendiğini rapor etmişlerdir.

Kullanılan en yaygın düzenleyici çözücüler; trioktilfosfin oksit (TOPO), trioktilfosfin (TOP) ve heksadesilamin (HDA)'dır. Bu gibi çözücüler, nanokristali kaplar ve onun yüzeyini stabilize ederler, organik medyadaki parçacık çözünürlüğünü belirler ve nanokristalin geri döndürülemez agregasyonunu önlerler. Bununla birlikte, bu hidrofobik kaplamalarla sarılmış kuvantum nokta nanokristaller sulu tayin koşullarıyla uyumlu değildir. Sonuç olarak kuvantum nokta nanokristallerin uygulama alanlarını genişletebilmek için, hidrofilik kaplama ajanları bulunmalıdır. Cd-kalcojenit nanokristaller için yaş kimya yolunun geliştirilmesinde dönüm noktası, sulu çözeltilerde stabilize edici ajan olarak tiyol'un kullanılması olmuştur (Rogach ve ark. 1999). Suda çözünebilir nano parçacıklar, sulu çözeltide tiyol kaplı kristalin nano parçacıkların, merkaptol-

alkoller (örn, 2-merkaptolanol veya 1-tiyogliserol) ve merkapto-asitler (e.g., tiyoglikolik asit veya tiyolaktik asit) kullanılarak sentezlenmesi ile hazırlanmıştır (Rogach ve ark. 1999). Floresans standardı olarak kullanımı için hazırlanacak nanopartiküller çok yakın büyüklükte ya da monodispers olmalıdır. Monodispers nanopartikül üretimi için aşırı doymuş çözeltiden nanokristallerin çekirdeklenmesini yavaş büyüme fazı takip eder. Tüm nanokristaller eş zamanlı olarak çekirdeklenmişse hepsi benzer büyüme hızına sahip olacaklardır ve oluşan nanokristallerin popülasyonu dar büyüklük dağılımı gösterecektir. Nanokristallerin büyüklüğü büyüme fazının süresine bağlı olarak değişir. Çekirdeklenme olayı başladığında büyüme başlar ve derişim çekirdeklenme eşiğinin altına düşer. Çekirdeklenme fazı boyunca çok az büyüme gerçekleşirse büyüklük dağılım oranı az olur ve monodispers nanokristaller elde edilir (Şekil 1.28).

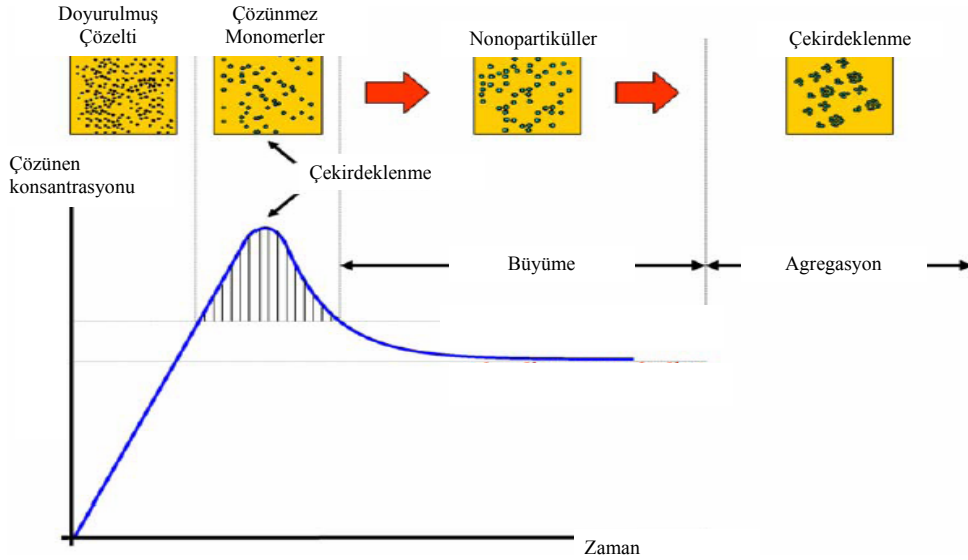
Partikül büyüklüğünü etkileyen etmenler; doğal olmayan partiküllerin varlığı (partiküllerin büyümesine neden olur), elektrostatik enerji bariyeri (koloidal partiküller yüklü olabilir, benzer yüklü partiküllerin birbirini itmesi ile koagülasyon önlenir) ve sterik itmedir (surfaktan eklenmesi ile kolloidler stabilize edilebilir, nanopartiküller için tercih edilen bir yöntemdir ve nanopartiküllerin optoelektronik özelliklerini etkiler).



Şekil 1.28. Polimerik nanopartikül oluşum aşamaları

Nanopartiküllerin büyüklük dağılımını geliştirmek için;

- Hızlı çekirdekleşmeyi yavaş büyüme takip etmelidir,
- Belirli bir reaksiyon ortamı sağlanmalıdır (sıcaklık eğilimi, reaksiyon ortamındaki kimyasal bileşim değişimi ayarlanarak),
- Homojen reaksiyon ortamı elde etmek için reaktiflerin hızlı karıştırılması gerekir,
- Karıştırma reaksiyon süresinden daha kısa zamanda olmalıdır ve
- Reaksiyon şişesinde termal homojenlik sağlanmalıdır.

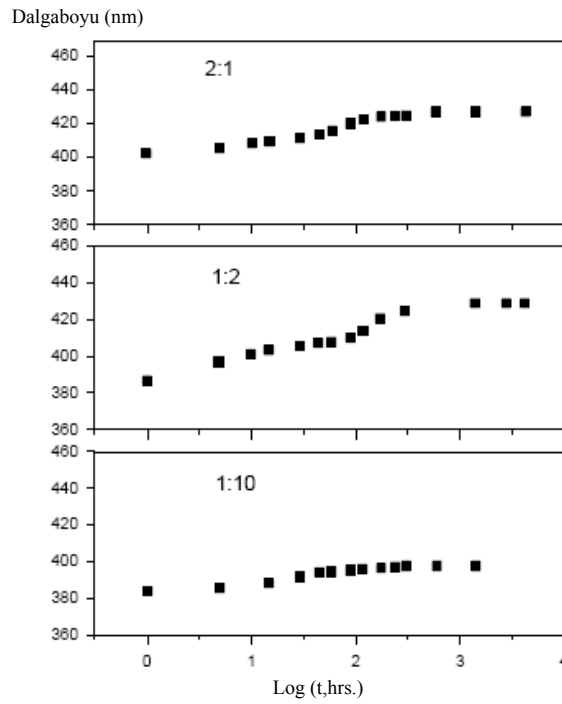


Sekil 1.29. Zaman ve derişime bağlı olarak çekirdekleşme, büyüme ve agregerasyon

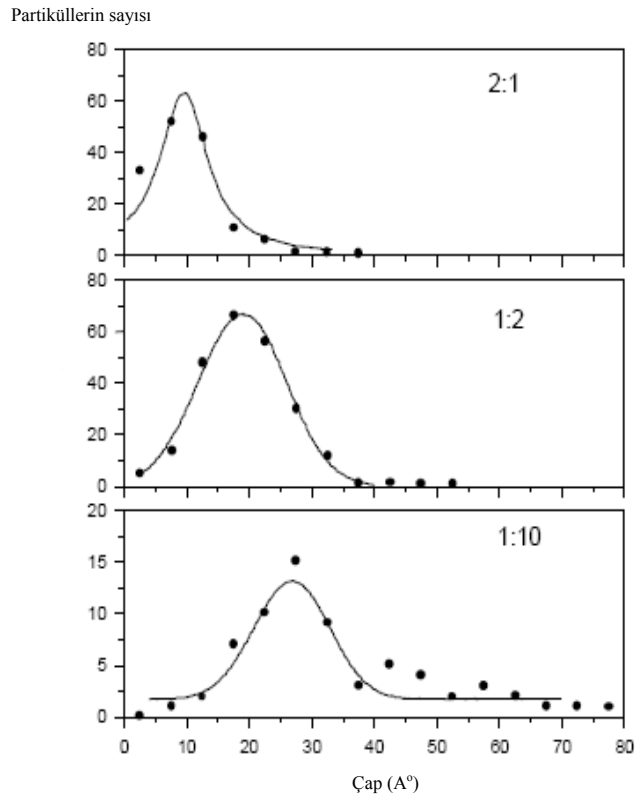
Çözücü nanopartikül büyürken nanokristallerin yüzeyini stabilize etmek için kullanılır ve nanopartikülün topaklanmasını önler, bunun için genellikle trioktilfosfin oksit (TOPO) ve hegzadesilamin kullanılır. Bu bileşikler nanokristallerin kaplanmasında önemli rol oynar ve nanokristallerin çözünürlük ve diğer özellikleri üzerine etkilidir. Nanokristali suda çözünür hale getirmek için merkaptokarboksilik asitler yerdeğiştirici kaplama grupları olarak kullanılabilir. Bu bileşikler çift fonksiyonludur, polar grubu ile nanokristali çözünür hale getirirken merkapto grubu ile nanokristal yüzeyine kuvvetli bir şekilde bağlanır.

Chan ve Nie'nin grubu merkptoasetik asit kullanarak nanokristali suda çözünür hale getirmiştir ve çapraz bağlayıcı ajanların kullanılması ile nanokristale protein moleküllerinin bağlanması gerçekleştirilmiştir.

Nanopartikül oluşum dinamiği türlerin çözücüde çözünmesine dayalı olarak çözücünün dielektrik sabitine, sıcaklık ve çözeltilerin derişimine bağlıdır. Seyreltik çözeltiler kullanıldığında partiküller arası çarpışma azalacağından aglomerasyon ve çökme gerçekleşmez. Büyüme işlemi katyonların ve anyonların bağlı derişimine bağlı olarak değişir. Partikülün büyüklüğü iki iyonun başlangıç derişimine bağlı olarak değişir. Cd'un iyonik çapı S'den daha küçük olduğu için Cd²⁺ iyonları daha hareketlidir ve zayıf şekilde kristalin örgüsüne bağlanır, bu nedenden dolayı kristalin yüzeyine bağlanma eğilimi yüksektir. Biriken Cd²⁺ iyonları yüzeydeki diğer Cd²⁺ iyonlarıyla çift dielektrik tabakası oluşturur ve kristallerin büyümesini durdurur (Şekil 1.30).

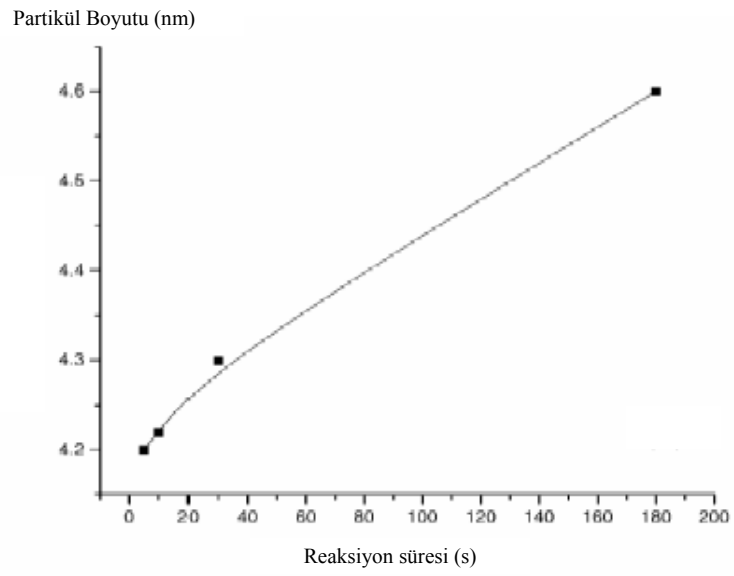
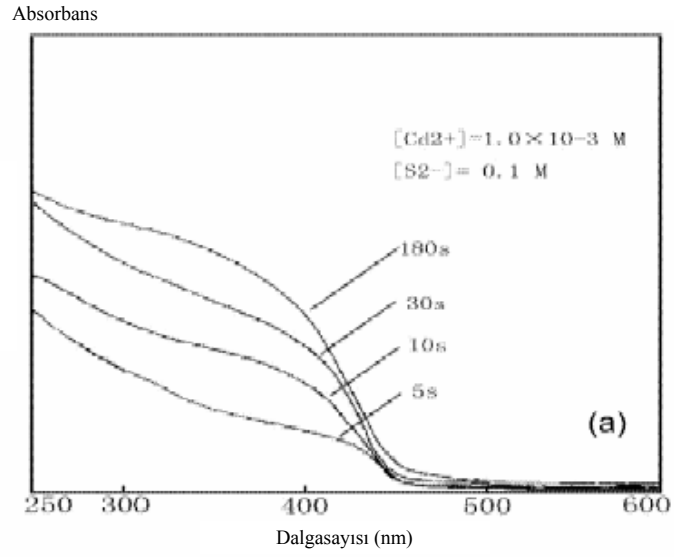


Şekil 1.30. Farklı oranlardaki Cd(NO₃)₂ ve (NH₄)₂S ile hazırlanan nanopartiküllerin büyüklükleri ve büyüklük dağılımı

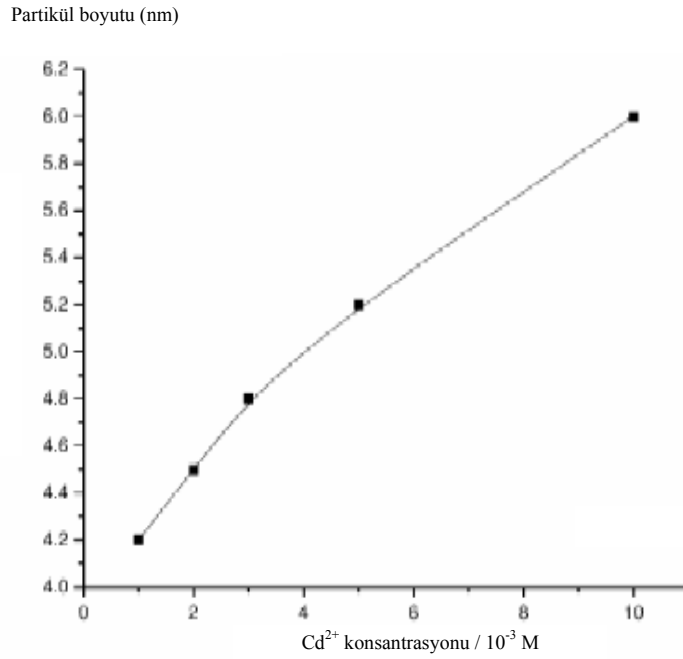
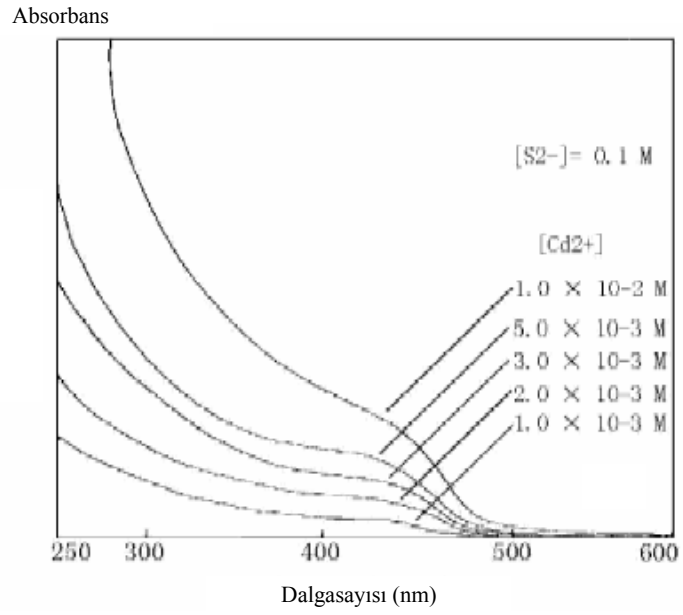


Şekil 1.30. (Devam) Farklı oranlardaki $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ve $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ ile hazırlanan nanopartiküllerin büyüklükleri ve büyüklük dağılımı

Şekil 1.31’de zamanla değişim ve $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2$ ile $(\text{NH}_4)_2\text{S}$ oranına bağlı olarak CdS büyüklük dağılımı verilmektedir (Pal ve ark 2000). Başka bir çalışmada S/Cd oranının artması ile nanopartikülün büyüklüğünde artış gözlenmiştir (Chen ve Zhu 2005). Li ve ark.’nın (2003) yaptığı çalışmada CdS kuantum nokta nanopartikül-çitosan kompozit filmi hazırlanırken reaksiyon zamanının ve Cd^{2+} derişiminin artışı ile nanopartikülün büyüklüğünde artma gözlenmiştir (Şekil 1.32).



Şekil 1.31. Farklı zamanlarda hazırlanan CdS-çitosan kompozitinin UV-vis spektrumu ve zamanla partikül büyüklüğünün değişimi



Şekil 1.32. Farklı derişimlerdeki Cd²⁺ ile hazırlanan CdS-çitosan kompozitinin UV-vis spektrumu ve değişen Cd²⁺ derişimiyle partikül büyüklüğünün değişimi

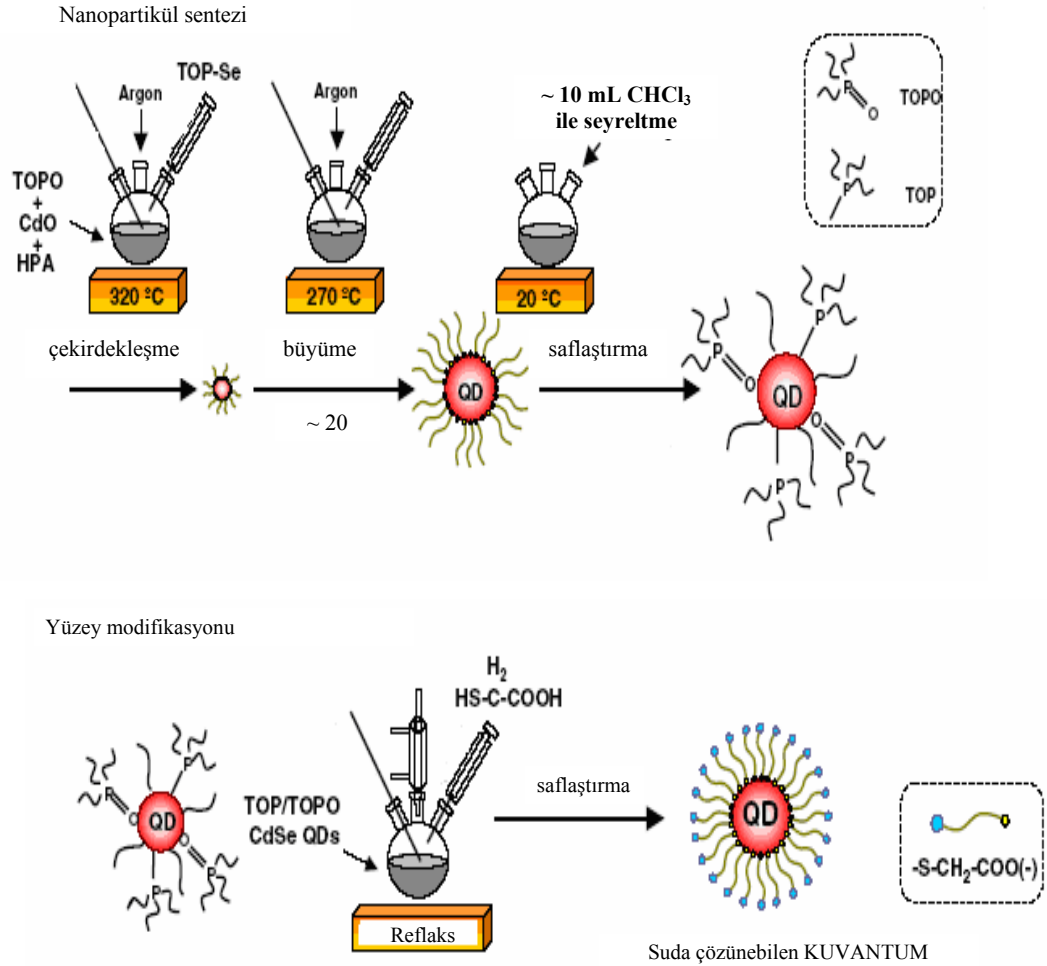
Winter ve ark.'nın (2005) yaptığı çalışmada Cd/S oranının artışı ile partikül büyüklüğünde azalma gözlenmiştir. Na₂S derişiminin artması ile CdS oluşumu için ve partikül büyümesi için daha fazla SH⁻ grubu sağlar. CdCl₂

derişiminin fazla olmasıyla kaplama ligandları ile yüzeysel reaksiyona girecek daha fazla Cd atomu sağlar. Ligand derişiminin artışı pH ayarlanmadığında partikülün büyüklüğünü etkilememiştir. pH 8.2'ye ayarlandığında ligand derişiminin artışıyla partikülün büyüklüğünde artış gözlenmiştir.

Ligand büyüdükçe partikülün büyüklüğünde de azalma olur ve pH ayarlanmadığında zincir uzunluğunun artışı ile kuvantum verim etkinliğinde azalma gözlenmiştir. pH Na_2S ile 8.2'ye ayarlandığında ise ligand zincir uzunluğunun artışı ile floresans şiddeti artar. Nanopartiküllerin pH'a bağlı büyüklük kayması ligand derişimine de bağlı olarak değişir (Winter ve ark. 2005).

Nanoboyutlu CdS sentezi için hidrotermal sentez, organik termoliz, mikroemülsiyon yöntemi, ultraviyole ve mikrodalga ışık ve lazer teknolojisi kullanılabilir (Yang ve ark. 2005). Organometalik yaklaşımın kullanılmasıyla yüksek oranda monodispers lüminesans nanokristaller sentezlenebilir. Organometalik termoliz yöntemi trioktilfosfin, trioktilfosfin oksit, hekzadesilamin gibi organik çözücüler içerisinde yüksek sıcaklıklarda gerçekleştirilir. Çözücüde çözülen dimetilkadmiyum gibi öncü kadmiyum kaynağı sıcak çözücüye hızla eklenir. Kuantum nokta nanopartikül hemen çekirdekleşmeye başlar, istenen büyüklükte nanopartikül elde etmek için ise eklenen öncü maddenin miktarı ve zaman ayarlanır. İyi kalitede ve verimli olarak nanopartikül elde etmek için hızlı karıştırma, yüksek sıcaklık ve nemin ve oksijenin uzaklaştırılması gerekir. Sıcaklığa, büyüme zamanına göre farklı büyüklüklerde nanopartikül elde edilir. Sıcaklığın ayarlanması ile dar büyüklük dağılımlı partikül elde edilir. Organometalik sentezle kaliteli nanopartiküller elde edilse de dimetilkadmiyum gibi organometalik öncünün pirolizi pahalı, karmaşık, zaman harcayıcı ve çevresel olarak zararlıdır. Elde edilen nanokristaller surfaktan maddelerle kaplı olduğundan hidrofobiktir. Surfaktan molekülleri kuvantum nokta nanopartiküllerin aglomerasyonunu önler. Sulu çözeltilerde ise tiyol grupları stabilize edici ajan olarak kullanılabilir, stabilizör olarak merkaptto alkol ve merkapttoasitlerin (merkaptto etanol, 1-tiyogliserol, tiyoglikolik asit) kullanılmasıyla suda çözünebilir nanopartiküller hazırlanabilir (José ve ark 2006; Merkoçi ve ark. 2005; Riegler ve Nann 2004).

Yapılan bir çalışmada, Peng ve ark.'ı (2001) yüksek kaliteli CdTe, CdSe ve CdS nano kristallerin sentezlenmesini işaretleyici olarak $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ yerine CdO kullanarak yaptıklarını belirtmişlerdir. $\text{Cd}(\text{CH}_3)_2$ bileşiği zehirli, kararsız, patlayıcı ve pahalıdır, kuvantum nokta yapıları sentezleme projelerinin uygulanmasında kullanılması büyük ölçekli sentezlemelerde uygun değildir. Bu yeni yaklaşımla sentezlenen nanokristaller (Peng ve ark. 2001) daha önce bildirilen çalışmalarla karşılaştırılabilir ve daha üstün bulunmuştur. Ayrıca, bildirilen sentez düzenlemesi (Şekil 1.33), tekrarlanabilir, ılımlı ve basit koşullara dayalı, endüstriyel uygulamalara ölçeklenme potansiyeline sahip görülmektedir.



Şekil 1.33. Organometalik yolla CdS sentezi

Misel yöntemi genellikle su/yağ emülsiyonunda gerçekleştirilir. Ters misel içindeki su fazı istenen nanokristalin tuzunu içerir. Nanokristaller karşı iyonun eklenmesi ile misel içerisinde çöktürülür. Biyoanalitik uygulamalar için bu yöntem uygulanabilir. Bu yöntemin avantajı basit olmasıdır. Dezavantajı ise nanopartikül monodispers olarak elde edilemez, bunun sonucunda geniş spektral çizgi oluşur (Riegler ve Nann 2004).

Antolini ve ark.'ı (2006) polimer matriksi içindeki metal alkantiyolatlarının lazer ışınının odaklanmasıyla bölgeye göre seçimli termal ayrışmaya uğraması sonucunda CdS nanokristalini elde etmişlerdir. Bu yöntem düşük kimyasal çarpışmayı sağlaması ve lazerin kimyasal dönüşümü sağlaması nedeni ile avantajlıdır.

Yang ve ark.'ı (2005) 50 ml 0.05 M CdCl₂ çözeltisine 50 ml 0.05 M sodyum sülfür çözeltisi ekleyerek mikrodalga cihazında CdS nanopartikülünü sentezlemiştir. Bu çalışmada tüm çözeltiler suda hazırlanmıştır. Bu karışım eşzamanlı olarak karıştırılıp ve ultrasonik banyoda tutulmuştur. Daha sonra çözeltinin bulunduğu kap reflaks sistemi ile bağlanarak mikrodalga fırınında 10 dakika tutulmuştur. Oda sıcaklığında soğutulmuş, sarı çökelek santrifüjlenip, yıkanmış ve 60 °C'de 10 saat vakumda kurutulmuştur.

Yan ve ark.'ı (2004) sıcaklığa duyarlılığı yüksek olan poli(N-isopropil akrilamid) P(N-İPAAm) matriksine CdS nanopartiküllerini gömerek çok iyi floresans özellik gösteren ve yeni organik-inorganik optik ya da fotoelektron materyali olmaya aday nanokompozit elde etmiştir. 8 g N-İPAAm 30 ml H₂O'da çözülerek renksiz transparan çözelti elde edilmiştir. 0.01 g APS başlatıcı olarak kullanılmış ve çözelti 66-68 °C'de ısıtılarak 2 saat azot atmosferinde karıştırılmıştır. Oluşan katı 300 ml H₂O'da çözülerek 30 ml çözelti eşdeğer molariteye sahip Cd(Ac)₂.2H₂O ve CH₃CSNH₂ eklenmiş ve reaksiyon 30 °C'de 2 saat frekansı 20 kHz ve gücü 100 W/cm² olan ultrasonik alanda tutulmuştur. Oluşan katı süzildükten sonra 60 °C'de 24 saat vakumda kurutulmuştur.

Flenniken ve ark.'nın (2004) yaptığı diğer bir çalışmada ise CdS nanokristali prokaryotik organizma içinde sentezlenmiştir. Bakteri zengin bir besiyeri ortamında 37 °C'de CdCl₂ ve Na₂S eklenmesi ile büyütülmüştür. Bu çalışmada sentezlenen CdS nanopartikülü 2-5 nm büyüklüğündedir.

Kulkarni ve ark.'nın (2005) yaptığı çalışmada ise sulu ve susuz ortamda CdS sentezlenmiş, sentez süresince ortama DNA eklenmesi ile kararlı bir kompleks elde edilmiş ve oluşan partikülün yüksek floresans özellik göstermesi nedeni ile protein sensörü olarak kullanılabileceği önerilmiştir. Sadece CdS sentezi için 0.01 M 2 ml kadmiyum asetat çözeltisi (etanolde) azot atmosferinde yarım saat karıştırılmıştır. Daha sonra karıştırılan çözeltiliye aynı hacimde 0.01 M Na₂S çözeltisi (etanolde) yavaşça eklenmiş ve karıştırmaya yarım saat daha devam edilmiştir. Karıştırma işlemi sonlandığında çözelti santrifüjlenerek çökelti toplanmış ve çökelek deiyonize su ile yıkanmış ve havayla kuruması sağlanmıştır. Sentezin hepsi oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. CdS-DNA nanopartikülü sentezi ise su, dimetilformamid (DMF), etanol, metanol, propanol gibi çözücülerle Na₂S eklenmeden DNA eklenmesi ile gerçekleştirilmiştir.

1.5.3. Kuantum nokta nanopartiküllerle optik algılama

Biyolojik tanımlama uygulamalarında ilk olarak kararlı luminesans sensörlerin amaçlanmasından bu yana beş yıldan fazla bir süre geçmiştir. Bu konuda yapılan ilk çalışmalardan birinde, Alivisatos ve ark. (1998) biyolojik işaretlemeye nano kristallerin kullanımını sağlamak, onları biyo uyumlu ve suda çözünebilir yapmak için yüzeyi ilave bir kat silika ile kaplanmış ve CdS/ZnS çekirdek ile CdSe kabuk ve biyomoleküller arasında bir bağ olduğunu bildirmişlerdir. Aynı zamanda, Chan ve Nie (1998) tek bir nanokristal seviyesinde hassas belirleme için merkaptasetik asit ile yüzeyi modifiye edilmiş suda çözünebilir biyo uyumlu nanokristalleri biyomoleküllere bağlamışlardır. Nano parçacıkların luminesans emisyonunun ölçülmesiyle spesifik antibadi veya antijenlerin tanımlanması için uygun immuno moleküllerle nanokristallerin birleşiminin kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Pek çok çalışmada nanokristal biyo bileşiklerin geleneksel organik boyalara göre, foto ağarma ve daha dar spektral bant genişliğiyle karşılaştırıldığında daha yüksek parlaklık, yüksek kararlılık gibi, belirgin avantajları vurgulanmıştır. Bununla birlikte, kuantum nokta nanokristaller biyolojik tanımlama uygulamalarında daha yavaş bir şekilde kendini belli

etmektedir. Bunun nedeni kısmen kararlı kuvantum nokta nanokristal-biyomolekül komplekslerini üretmekteki zorluklardır. Gelişmeler, protein ve DNA immuno tayin için tanımlayıcı olması yoluyla biyoanaliz ve teşhiste tanımlama için luminesans nanokristallerin geliştirilmesinde uygun yüzey modifikasyonunun önemini vurgulamaktadır. Çok sayıda çalışma luminesans kuvantum nokta nanokristallerin bu tür biyokimyasal uygulamalar için kullanımını özetlemektedir (Sutherland 2002; Chan ve ark. 2002; Smith ve Nie 2004; Riegler ve Nann 2004; Alivisatos 2004). Daha da ötesi nanokristallerin sentezindeki hızlı gelişme ve iyileşmeler, analitik kimyacıların henüz keşfedilmemiş bir potansiyel olan luminesans esaslı yeni nesil optik sensörler için bu nano malzemelerin geliştirilmesini araştırmaya yeni başlamışlardır.

1.5.4. Floresans esaslı kuvantum nokta nanosensörler

Kuvantum nokta nanokristallerin luminesansı, nanokristallerin yüzey durumuna son derece duyarlı olduğundan, nano parçacıkların yüzeyi ve verilen kimyasal tür arasındaki kimyasal veya fiziksel etkileşimlerin çekirdek-elektron boşluk kombinasyonunun veriminde değişikliklere yol açacağını beklemek oldukça mantıklıdır (Moore ve Patel 2001). Bu durum, nanokristallerin problemlere dayalı yeni optik sensörlerin geliştirilmesindeki araştırma aktivitelerinde temel oluşturmaktadır.

Bu yaklaşımı takiben, Cd-esaslı nanokristallerin küçük molekül ve iyonlar için optik seçicilik çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bir çalışmada, Cd iyonlarının, unspasifize edilmiş CdS nano parçacıkları içeren bir sulu çözeltiye ilave edilmesiyle, parçacık boyutlarında belirlenebilir bir değişiklik olmaksızın nano parçacıkların luminesans kuvantum verimlerinde önemli seviyede gelişme olduğu bildirilmiştir (Spanhel ve ark. 1987). Bu etki, yük taşıyıcıların radyoaktif olmayan kombinasyonlarını etkili bir şekilde elimine eden CdS çekirdek üzerinde Cd(OH)₂ kabuk oluşumuna bağlanmaktadır.

Benzer bir fotoluminesans aktivasyon etkisi CdS veya ZnS nanokristallerin kolloidal çözeltisine Zn veya Mn iyonlarının ilavesinden sonra da görülmektedir

(Moore ve Patel 2001; Sooklal ve ark. 1996). Bu davranış, kuvantum nokta partiküller ile bu tür metalik katyonlarda optik algılamaya için temel oluşturmuştur.

Çizelge 1.7’de kuvantum nokta nanokristaller kullanılarak gerçekleştirilmiş bazı küçük moleküllerin ve iyonların tayinleri verilmiştir.

Çizelge 1.7. Kuvantum nokta nanokristaller kullanılarak yapılmış tayinler (José ve ark. 2006)

Kuvantum Nanokristal	Kaplama Materyali	Analit	Ortam	Tayin Sınırı
CdS	Gly-His-Leu-Leu-Cys	Cu(II) Ag(II)	Fosfat tamponu	0.5 µM
CdS	Polifosfat L-sistein Tiyogliserol	Cu(II) Fe(III) Zn(II)	Su	0.8 mM Zn(II) 0.1 mM Cu(II)
CdSe	2-merkaptetan sülfonik asit	Cu(II)	Su	3.2 nM
CdSe-Zns	Bovin serum albumin	Cu(II)	Su	10 nM
CdSe	Merkaptoasetik asit + Bovin serum albumin	Ag(I)	Su	70 nm
CdTe	3-merkaptopropiyonik asit	Cu(II)	Su	0.19 ng/mL
CdTe	Tiyoglikolik asit	Zn(II), Mn(II) Ni(II), Co(II)	Su	-
CdS	Polifosfat	I ⁻	Metanol	-
CdSe	2-merkaptetan sülfonik asit	CN ⁻	Su	1.1 µM
CdS	L-sistein	Ag ⁺	Su	5.0 µM
CdSe	Polimer film	Trietilamin Benzilamin	Gaz ortamı	-
CdSe-ZnS	Tiyoglikolik + organofosforoz	Paraokson	Su	10 nM

1.5.5. Floresans rezonans enerji-transfer-esaslı kuvantum nokta nanosensörler

Enerji iletim mekanizmaları farklı alanlarda geniş bir şekilde kullanılmaktadır ve bu, yeni nesil luminesans sensörlere temel oluşturmaktadır (Traviesa ve ark. 2004). Yeniden şekillendirilmiş (boyut yönüyle) kuvantum nokta nanosensörlerin foto emisyon özellikleri, çok sayıda geleneksel organik boya ile etkili enerji transferine izin vermektedir. Böylece fotokimyasal kaynaklı floresans rezonans enerji transfer (FRET) mekanizması esasına dayalı, sensör veya kimyasal tayin uygulamalarında nano parçacıkların kullanılması artmıştır. Bununla birlikte, nanokristallerin emisyon spektrumu geleneksel organik floroforlardan daha dar ve daha simetriktrir.

1.5.6. Yüzey plazmon rezonans uygulamaları

Kuvantum nokta nanosensörler pek çok çalışmada yüzey plazmon rezonansının (SPR) ölçülmesinde kullanılmışlardır. Kimyasal olarak modifiye edilmiş yüzeyler üzerinde gerçekleşen indirgenme dönüşümleri ara yüzeyin kırılma indisini büyük ölçüde değiştirmekte ve böylece SPR spektrumunun plazma açısında değişikliğe neden olmaktadır (Zayats ve ark. 2003). Bu yaklaşımı takiben, Au nanoparçacık / CdS-nanokristal düzenlemesinde Au nano parçacıkların foto-elektrokimyasal yük etkisi esasına dayalı, asetilkolin-esteraz inhibitörleri için bir SPR sensörü hazırlanmıştır (Zayats ve ark. 2003).

Enzimlerin, Au yarı iletken ve nano parçacık düzenine eşleştirilebileceği ve böylece foto-elektrokimyasal fonksiyonları aktive edeceği gerçeği, yüzeyi modifiye edilmiş nanosensörler ile kombine edilmiş SPR spektroskopisinin kullanımının, yeni SPR sensör problemler için alternatif bir araç sağlayabileceğini göstermektedir.

1.5.7. Fosforesans esaslı kuvantum nokta nanosensörler

Bu güne kadar nanosensörlerle kombinasyonlu foto luminesans algılama için çoğunlukla floresans algılama kullanılmıştır. Bununla birlikte nokta nanosensörlerin luminesans özelliklerinin araştırılması yavaş yavaş güvenilir optik sensörlerin tasarlanmasında pek çok avantaj sağlayabilecek bir belirleme prensibi olan fosforesansa doğru kaymaktadır (Kuijt ve ark. 2003; Sanz-Medel 1993).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1. Materyal

Sunulan çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları şu ana başlıklar altında toplamak mümkündür:

1. Metakrilamidosisstein (MAC), metakrilamidohistidin (MAH), metakrilamidosisstein-Hg(II) [MAC-Hg(II)] ve metakrilamidohistidin-Pt(II) [MAH-Pt(II)] monomerlerinin sentezi ve karakterizasyonu,
2. MAH-Pt(II)-Guanozin [MAH-Pt(II)-Gz], MAC-Hg(II)-Adenin [MAC-Hg(II)-Ad] ve MAH-Pt(II)-Guanin [MAH-Pt(II)-Gu], ön organize monomer sistemlerini kullanarak SPR ve QCM biyosensör çiplerin hazırlanması ile DNA'nın bağlantı bölgelerini tanıyan belleklerin SPR çip ve QCM elektrot yüzeyinde oluşturulması,
3. Kendi organize olabilen SPR çiplerin ve QCM elektrotların DNA tayininde kullanılması ve tasarlanılan moleküler baskılanmış (MIP) malzemelerin moleküler tanımlama açısından değerlendirilmesi.
4. Guanozin belleklerle donatılan nanokabuklara sahip CdS kuvantum nokta nanosensörlerin hazırlanması ve DNA tanıma bölgeleri açısından değerlendirilmesi.

2.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler

Azobisisobutironitril (AIBN), etilenglikoldimetakrilat (EDMA), guanozin, guanin, adenin, adenozin Fluka AG (Buchs, Switzerland) firmasından alınmış ve etilenglikoldimetakrilat hidrokinonin inhibitörü ile vakum altında distile edilerek kullanılmadan önce 4°C'da saklanmıştır. L-sistein, histidin, metakroilklorür, platin (II) klorür, civa (II) klorür ve poliguanilikasit Aldrich (Milwaukee, WI, USA) firmasından temin edilmiştir. Diğer bütün kimyasallar ve biyokimyasallar analitik saflıkta olup, Merck AG (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlanmıştır.

Deneylerde kullanılan su; yüksek akışlı selüloz membranlı Barnstead (Dubuque, IA) Ropure LP[®] ters ozmoz ünitesinde işleme tabi tutulduktan sonra

Barnstead D3804 NANOpure[®] organik/kolloidal uzaklaştırma ve dolgulu iyon değişim sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun iletkenliği 18 megaohm/cm'dir.

2.1.2. Kullanılan cihazlar

Bu çalışmada ışığın geliş açısındaki kayma değerlerinin ($\Delta\theta$) belirlenmesi için dalgaboyu 660nm olan Genoptics SPRi spektroskopisi cihazı ve mikrogravimetrik ölçümler için 9 MHz, teflon tutturucuda AT-cut kuartz kristaller ve QC 922 (Seiko EG&G) kuartz kristal analizör kullanılmıştır. Guanozin baskılı CdS nanokristallerin uyarılma ve emisyon dalgaboyları arasındaki ayırım için floresans ölçümleri Varian Cary Eclipse marka spektrofloreometre kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

2.2. Yöntem

2.2.1. Metakrilamidosisstein (MAC) monomerinin sentezi

2-metakriloamidosisstein monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g L-sistein ve 0.2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃ (% 5, v/v) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuş ve 4.0 mL metakroilklorür, yavaşça bu çözeltinin üstüne dökülmüştür. Karışım azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu sürenin sonunda, çözeltinin pH'ı 7.0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcıda uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAC), etanol ve etilasetat ile kristallendirilmiştir.

2.2.2. Metakrilamidohistidin (MAH) monomerinin sentezi

2-metakriloamidohistidin monomerinin sentezi için uygulanan yöntemde; 5.0 g histidin ve 0.2 g NaNO₂, 30 mL K₂CO₃ (% 5, v/v) çözeltisi içerisinde çözülmüştür. Çözelti 0°C'a soğutulmuş ve 4.0 mL metakroilklorür, yavaşça bu

çözeltiye ilave edilmiştir. Karışım azot atmosferi altında, manyetik karıştırıcı ile 2 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonun sonunda, çözeltinin pH'ı 7.0'ye ayarlanmış ve etilasetat ile ekstrakte edilmiştir. Sulu faz, döner buharlaştırıcı kullanılarak uzaklaştırılmış ve kalan kısım (MAH), etanol ve etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.3. Metakrilamidohistidin-Pt(II) [MAH-Pt(II)] metal-şelat monomeri sentezi

Metakrilamidohistidin-Pt(II) metal-şelat monomeri [MAH-Pt(II)], MAH ve platin (II) klorür bileşiklerinin etkileştirilmesi ile sentezlenmiştir. Bunun için platin (II) klorür (1 mmol) ve MAH monomeri (1 mmol) etanolde ayrı ayrı çözündürülerek etkileştirilmiş ve kahverengi MAH-Pt(II) metal-şelat monomeri etanol/etilasetat ile kristallendirilerek saflaştırılmıştır.

2.2.4. Metakrilamidosisistein-Hg(II) [MAC-Hg(II)] metal-şelat monomeri Sentezi

Metakrilamidosisistein-Hg(II) metal şelat monomerinin [MAC-Hg(II)], sentezi için MAC monomeri (2.0 mmol) 15 mL etanolde çözülmüştür. Üzerine 1.0 mmol civa (II) klorür yavaşça sürekli karıştırılarak eklenmiştir. Döner buharlaştırıcıda çözücü uzaklaştırılarak MAC-Hg(II) metal şelat monomeri etanol/asetonitril karışımından kristallendirilmiştir.

2.2.5. Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Güanozin [MAH-Pt(II)-Gz] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu

Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Güanozin [MAH-Pt(II)-Gz] monomeri sentezi için hazırlanan MAH-Pt(II) metal şelat monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanol içerisinde çözülmüş ve hedef molekül olan güanozin (1 mmol) çözeltisi ile etkinleştirilerek (1:1) monomerin önorganizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.6. Metakrilamidosisistein-Hg(II)-Adenin [MAC-Hg(II)-Ad] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu

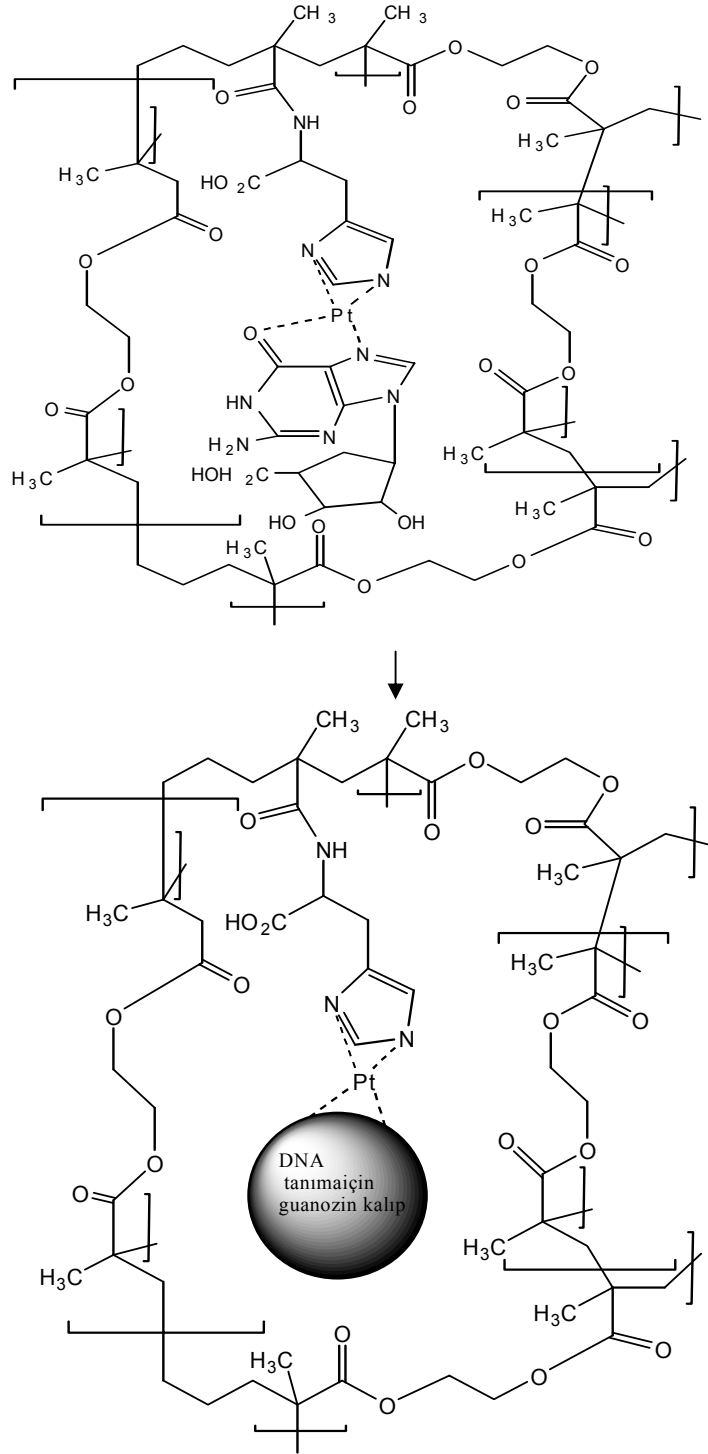
Metakrilamidosisistein-Hg(II)-Adenin [MAC-Hg(II)-Ad] monomeri sentezi için hazırlanan MAC-Hg(II) metal şelat monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanol içerisinde çözülmüş ve hedef molekül olan adenin (1 mmol) çözeltisi ile etkinleştirilerek (1:1) monomerin önorganizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.7. Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Guanin [MAH-Pt(II)-Gu] metal-şelat monomerinin ön organizasyonu

Metakrilamidohistidin-Pt(II)-Guanin [MAH-Pt(II)-Gu] monomeri sentezi için hazırlanan MAH-Pt(II) metal şelat monomeri (1.0 mmol) 15 mL etanol içerisinde çözülmüş ve hedef molekül olan guanin (1 mmol) çözeltisi ile etkinleştirilerek (1:1) monomerin önorganizasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.2.8. Guanozin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması

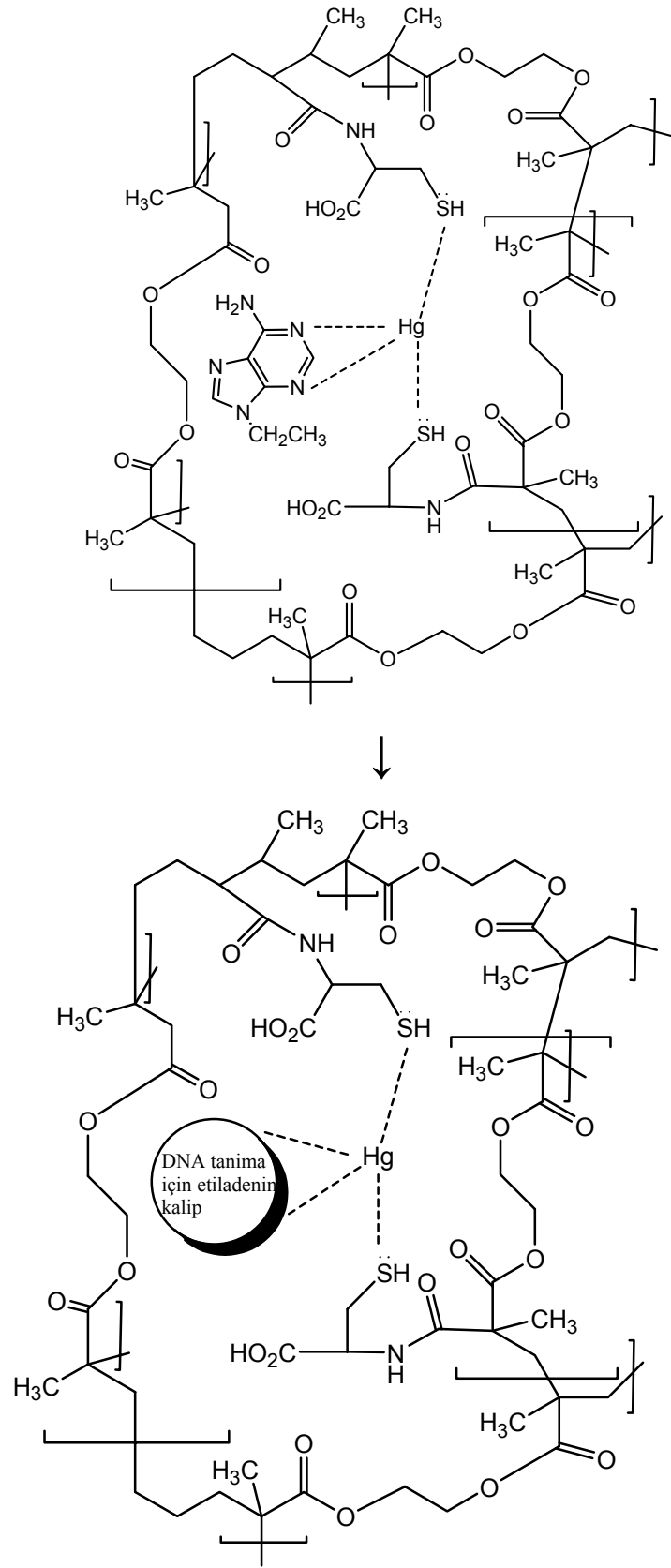
SPR sensörün yüzeyinde nano büyüklükte kaplanmış olan Au filmi tiyol ucundan metakroil modifiye etmek amacıyla metakrilamidosisistein (MAC-etanol/su (4:1, v/v) içinde hazırlanmış) ile mikro-hacimde spotlanarak 24 saat süreyle vakum desikatörde tutulmuştur. Daha sonra sensör etanol ve deiyonize su ile yıkanarak tepkimeye girmeyen tiyol grupları yüzeyden temizlenmiş ve altın yüzeyde kararlı ve homojen bir tabaka oluşturulmuştur. Bu şekilde metakroil modifiye edilen SPR sensör 0.25 mmol [MAH-Pt(II)-Gz] metal-şelat monomeri ve 3.75 mmol N,N'-metilbisakrilamid (N,N'-MBAA) çapraz bağlayıcı eşliğinde Na₂S₂O₅/K₂S₂O₈ başlatıcı karışımıyla spotlanarak UV ışık altında polimerize edilmiştir. Aynı şekilde guanozin belleklere sahip olmayan baskılanmamış SPR sensörde karşılaştırma amacıyla polimerize edilmiştir. Guanozin bellek oluşturmak amacıyla SPR spotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır. SPR sensör yüzeyinde guanozin belleklerin oluşumu Şekil 2.1 'de gösterilmiştir.



Şekil 2.1. SPR sensör yüzeyindeki guanozin bellek oluşumu

2.2.9. Adenin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması

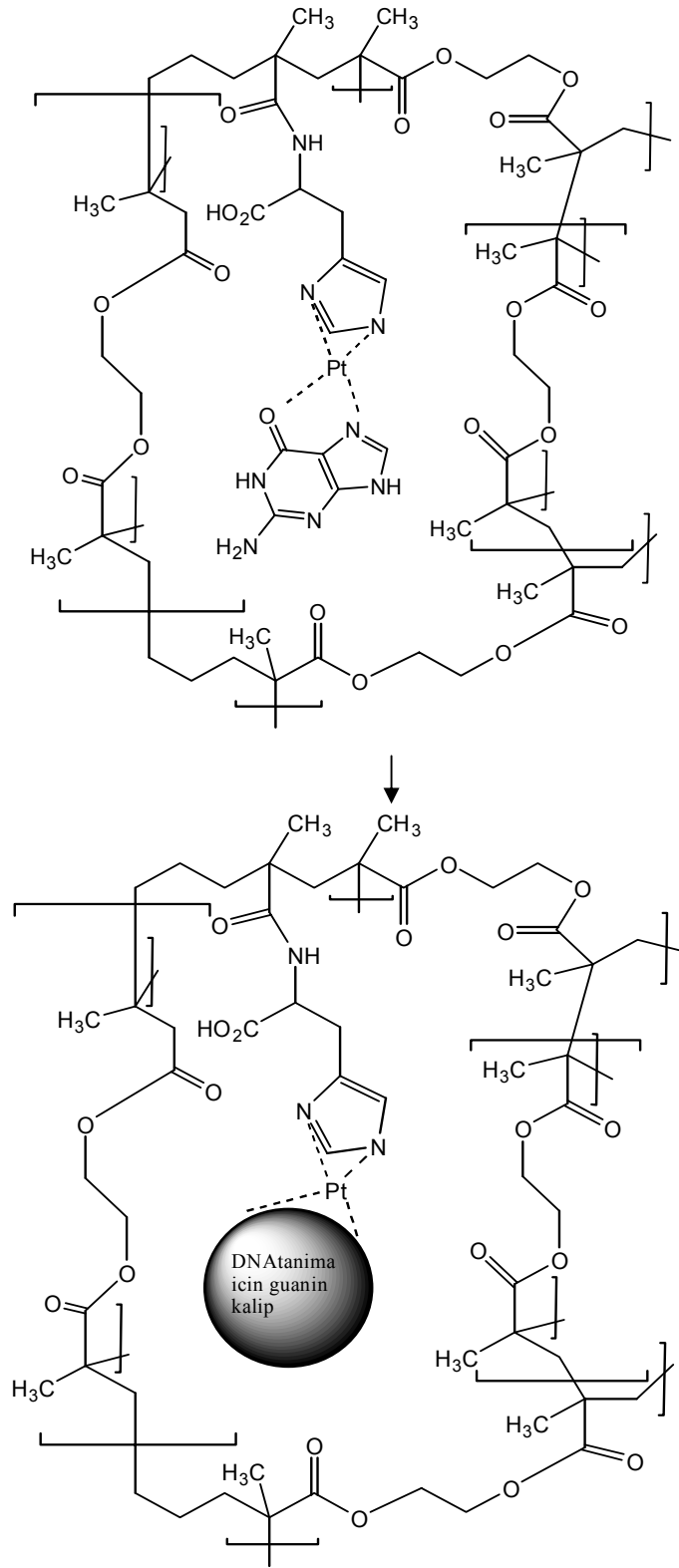
Guanozin baskılı sensör hazırlama tekniğine benzer şekilde adenin baskılı sensörde hazırlanmıştır. Bu amaçla SPR sensörün yüzeyinde Au filmi tiyol ucundan metakroil modifiye etmek amacıyla metakrilamidosisitein (MAC-etanol/su (4:1, v/v) içinde hazırlanmış) mikro-hacimde spotlanarak 24 h süreyle vakum desikatörde tutulmuştur. Daha sonra sensör etanol ve deiyonize su ile yıkanarak tepkimeye girmeyen tiyol grupları yüzeyden temizlenmiş ve altın yüzeyde kararlı ve homojen bir tabaka oluşturulmuştur. Bu şekilde metakroil modifiye edilen SPR sensör 0.25 mmol [MAC-Hg(II)-Ad] metal-şelat önorganize monomeri ve 3.75 mmol EDMA çapraz bağlayıcı eşliğinde AIBN başlatıcı karışımıyla spotlanarak UV ışık altında polimerize edilmiştir. Aynı şekilde adenin belleklere sahip olmayan baskılanmamış SPR sensörde karşılaştırma amacıyla polimerize edilmiştir. Adenin bellek oluşturmak amacıyla SPR spotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır. SPR yüzeyinde adenin belleklerin oluşumu Şekil 2.2'de gösterilmiştir.



Şekil 2.2. SPR sensör yüzeyindeki adenin bellek oluşumu

2.2.10. Guanin baskılanmış SPR sensörün hazırlanması

Guanin baskılı sensör guanozin ve adenin baskılı sensör hazırlama tekniğine benzer şekilde hazırlanmıştır. Bu amaçla SPR sensörün yüzeyinde nano büyüklükte kaplanmış olan Au filmi tiyol ucundan metakroil modifiye etmek amacıyla metakrilamidosisitein (MAC-etanol/su (4:1, v/v) içinde hazırlanmış) ile mikro-hacimde spotlanarak 24 h süreyle vakum desikatörde tutulmuştur. Daha sonra sensör etanol ve deiyonize su ile yıkanarak tepkimeye girmeyen tiyol grupları yüzeyden temizlenmiş ve altın yüzeyde kararlı ve homojen bir tabaka oluşturulmuştur. Bu şekilde metakroil modifiye edilen SPR sensör 0.25 mmol [MAH-Pt(II)-Gu] metal-şelat monomeri ve 3.75 mmol N,N'-metilbisakrilamid (N,N'-MBAA) çapraz bağlayıcı eşliğinde Na₂S₂O₅/K₂S₂O₈ başlatıcı karışımıyla spotlanarak UV ışık altında polimerize edilmiştir. Aynı şekilde guanin belleklere sahip olmayan baskılanmamış SPR sensörde karşılaştırma amacıyla polimerize edilmiştir. Guanin bellek oluşturmak amacıyla SPR spotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır. Guanin baskılı polimer oluşumu Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. SPR sensör yüzeyindeki guanin bellek oluşumu

2.2.11. Guanozin baskılanmış QCM elektrodun hazırlanması

Polimerizasyon öncesinde altın elektrotlar 1:1:5 oranında deiyonize su (%33), H₂O₂ (%33) ve NH₃ (%33) içeren kaynayan çözelti ile temizlenmişlerdir. Kristaller 10 dakika süreyle çözelti içine daldırılmış ve deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün süreyle kurutulmuştur. QCM'in metakriolil gruplarını etkinleştirmek için temizlenmiş altın yüzeyleri MAC içeren etanol/su (4:1, v/v) çözeltisinde 24 saat süreyle tutulmuştur. Tiyol gruplarının aşırısını uzaklaştırmak için kristal, etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Polimerizasyon için metakriolil ile aktive edilmiş kristaller, metal-şelat (MAH-Pt(II)-Gz) monomer (0.25 mM), çapraz bağlayıcı (N,N'-MBAA) (5 mM) ve polimerizasyon başlatıcı (Na₂S₂O₅/K₂S₂O₈) içeren çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı, QCM yüzeyinin üzerine damlatılmıştır. Oksijen varlığında polimerizasyon engellendiği için reaksiyon azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon azot atmosferi altında 75 dakika boyunca UV ışığı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Referans olarak kullanılmak üzere baskılanmamış polimer kaplı QCM, MAH-Pt(II) ile benzer şekilde hazırlanmıştır. Kullanımdan önce kuartz kristalleri 15 dakika etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Kalıp uzaklaştırılması için elektrotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır.

2.2.12. Guanozin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri

Guanozin baskılı kristaller ilk olarak 0.05 M fosfat tamponu (pH:10.0) ile oda sıcaklığında kararlı hale getirilmiş ve sabit rezonans frekansı (F_0) belirlenmiştir. Daha sonra fosfat tamponu içindeki (20.0 µL) guanozin'in standart çözeltisi QCM çiplerinin üzerine damlatılmış ve 15 dakika süre ile etkinleştirilmiştir. Sensörün frekansı kararlı hale gelene kadar (F_1) izlenmiştir. Guanozinin herbir konsantrasyonu için frekans kayması, $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliğinden hesaplanmıştır. Her bir ölçümden sonra guanozin önce 0.1 M glisin-HCl çözeltisi ile daha sonra üç kez fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekansı yaklaşık olarak F_0 değerine kadar geri elde edilmiştir.

2.2.13. Adenin baskılanmış QCM elektrodun hazırlanması

Adenin baskılı QCM sensör hazırlamak amacıyla guanozin baskılı QCM sensör hazırlama tekniği tekrarlanmıştır. Bu amaçla polimerizasyon öncesinde altın elektrotlar 1:1:5 oranında deiyonize su (%33), H₂O₂ (%33) ve NH₃ (%33) içeren kaynayan çözelti ile temizlenmişlerdir. Kristaller 10 dakika süreyle çözelti içine daldırılmış ve deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün süreyle kurutulmuştur. QCM'in metakroil gruplarını etkinleştirmek için temizlenmiş altın yüzeyleri MAC içeren etanol/su (4:1, v/v) çözeltisinde 24 saat süreyle tutulmuştur. Tiyol gruplarının aşırısını uzaklaştırmak için kristal, etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Polimerizasyon için metakroil ile aktive edilmiş kristaller, metal-şelat (MAC-Hg(II)-Ad) monomer (0.25 mM), çapraz bağlayıcı (EDMA) (5 mM) ve dimetilsülfoksit (DMSO) (330 µM) içinde radikal polimerizasyon başlatıcı (AIBN) içeren çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı, QCM yüzeyinin üzerine damlatılmıştır. Oksijen varlığında polimerizasyon engellendiği için reaksiyon azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon azot atmosferi altında 75 dakika boyunca UV ışığı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Referans olarak kullanılmak üzere baskılanmamış polimer kaplı QCM, MAC-Hg(II) ile benzer şekilde hazırlanmıştır. Kullanımdan önce kuantz kristalleri 15 dakika etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Kalıp uzaklaştırılması için elektrotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır.

2.2.14. Adenin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri

Adenin baskılı kristaller ilk olarak 0.05 M fosfat tamponu (pH:10.0) ile oda sıcaklığında kararlı hale getirilmiş ve sabit rezonans frekansı (F_0) belirlenmiştir. Daha sonra fosfat tamponu içindeki (20.0 µL) adenin'in standart çözeltisi QCM çiplerinin üzerine damlatılmış ve 15 dakika süre ile etkinleştirilmiştir. Sensörün frekansı kararlı hale gelene kadar (F_1) izlenmiştir. Adenin'in herbir konsantrasyonu için frekans kayması, $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliğinden hesaplanmıştır. Her bir ölçümden sonra adenin önce 0.1 M glisin-HCl çözeltisi ile

daha sonra üç kez fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekansı yaklaşık olarak F_0 değerine kadar geri elde edilmiştir.

2.2.15. Guanin baskılı QCM elektrodun hazırlanması

Guanin baskılı polimer hazırlamak amacıyla öncelikle elektrotlar 1:1:5 oranında deiyonize su (%33), H_2O_2 (%33) ve NH_3 (%33) içeren kaynayan çözelti ile temizlenmişlerdir. Kristaller 10 dakika süreyle çözelti içine daldırılmış ve deiyonize su ile yıkandıktan sonra bir gün süreyle kurutulmuştur. QCM'in metakrilil gruplarını etkinleştirmek için temizlenmiş altın yüzeyleri MAC içeren etanol/su (4:1, v/v) çözeltisinde 24 saat süreyle tutulmuştur. Tiyol gruplarının aşırısını uzaklaştırmak için kristal, etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Polimerizasyon için metakrilil ile aktive edilmiş kristaller, metal-şelat (MAH-Pt(II)-Gu) monomer (0.25 mM), çapraz bağlayıcı (N,N'-MBAA) (5 mM) ve polimerizasyon başlatıcı ($Na_2S_2O_5/K_2S_2O_8$) içeren çözeltiye ilave edilmiştir. Daha sonra reaksiyon karışımı, QCM yüzeyinin üzerine damlatılmıştır. Oksijen varlığında polimerizasyon engellendiği için reaksiyon azot atmosferi altında gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon azot atmosferi altında 75 dakika boyunca UV ışığı ile oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir. Referans olarak kullanılmak üzere baskılanmamış polimer kaplı QCM, MAH-Pt(II) ile benzer şekilde hazırlanmıştır. Kullanımdan önce kuartz kristalleri 15 dakika etanol ile yıkanmış ve kurutulmuştur. Kalıp uzaklaştırılması için elektrotlar 0.1 M glisin-HCl ve fosfat tamponuyla yıkanmıştır.

2.2.16. Guanin baskılanmış QCM elektrot ile sensör ölçümleri

Guanin baskılı kristaller ilk olarak 0.05 M fosfat tamponu (pH:10.0) ile oda sıcaklığında kararlı hale getirilmiş ve sabit rezonans frekansı (F_0) belirlenmiştir. Daha sonra fosfat tamponu içindeki (20.0 μ L) guanin'in standart çözeltisi QCM çiplerinin üzerine damlatılmış ve 15 dakika süre ile etkinleştirilmiştir. Sensörün frekansı kararlı hale gelene kadar (F_1) izlenmiştir. Guaninin herbir konsantrasyonu için frekans kayması, $\Delta F = F_0 - F_1$ eşitliğinden

hesaplanmıştır. Her bir ölçümden sonra guanin önce 0.1 M glisin-HCl çözeltisi ile daha sonra üç kez fosfat tamponu ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Sensörün frekansı yaklaşık olarak F_0 değerine kadar geri elde edilmiştir.

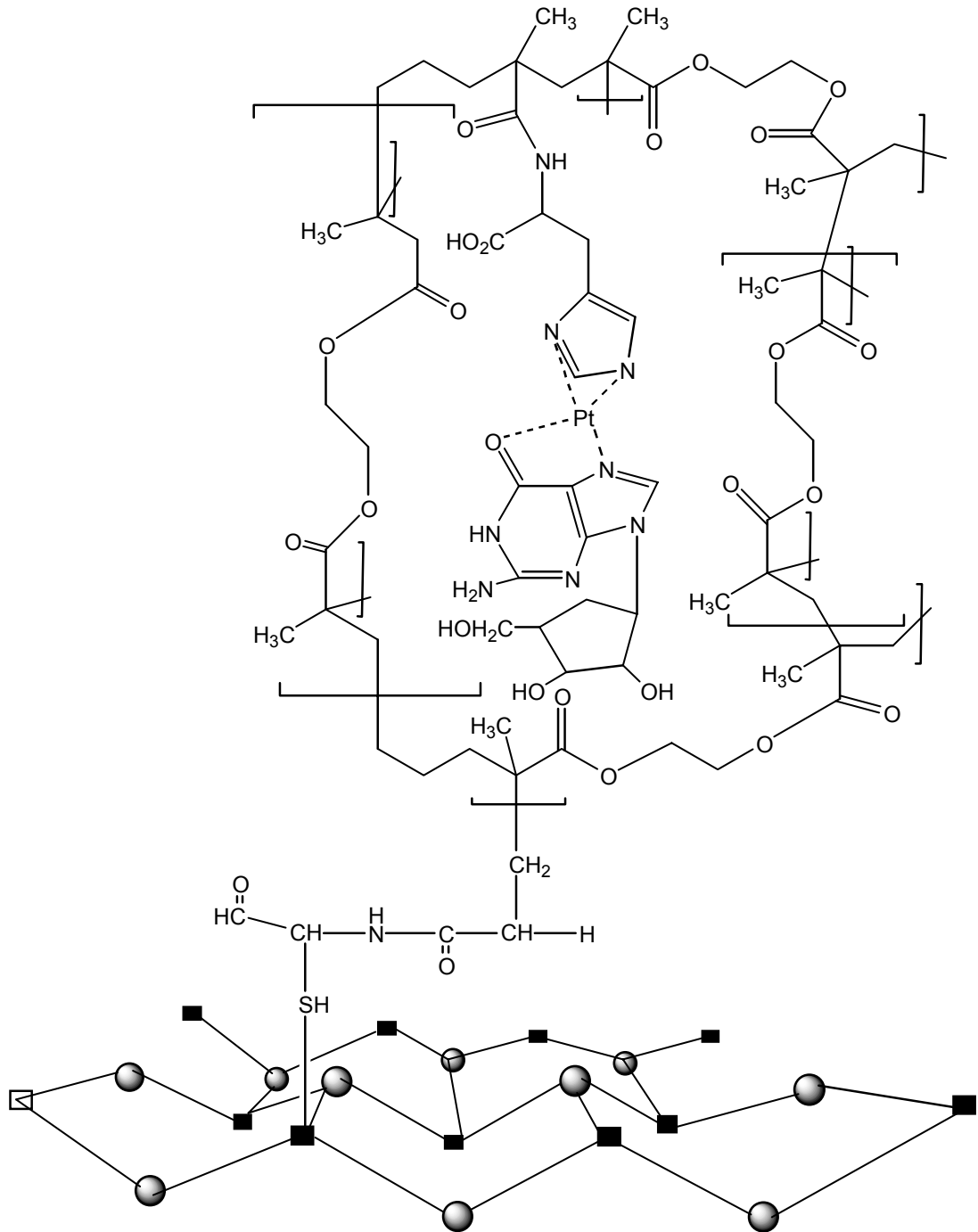
2.2.17. Guanozin baskılanmış nanokabuklara sahip kuvantum nokta nanosensörlerin hazırlanması

Guanozin baskılı nanokabuklara sahip kuvantum nokta nanosensörleri hazırlamak için öncelikle CdS nanokristaller sentezlenmiştir. Bu amaçla $\text{Cd}(\text{OAc})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 'ın 6 mL 0.01 M'lık çözeltisi etanolde çözülerek hazırlanmıştır. Çözelti 30 dakika azot atmosferinde sürekli karıştırılmış ve bu çözeltiliye 6 mL 0.01 M Na_2S çözeltisi ilave edilmiş ve azot atmosferi altında 30 dakika karıştırılmıştır. Ardından çözelti oluşan çökeleğin ayrılması için santrifüj edilmiş ve çökelek iki kez damıtık su ile yıkanmış ardından kurutulmuştur. Sentezin tüm basamakları oda sıcaklığında gerçekleştirilmiştir (Kulkarni ve ark. 2005)

CdS nanokristallerin yüzeyinde metakroil gruplarını oluşturmak ve nanopartiküllerin yüzeyini stabilize etmek yoluyla agregasyonu önlemek için CdS nanokristaller 0.2 mg MAC içeren etanol çözeltisi ile 30 dakika süre ile etkinleştirilmiştir. Ardından nanokristaller tiyol gruplarının fazlasını uzaklaştırmak için 10 dakika süre ile etanol ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Bu işlem yapılarak literatürde ilk olarak biyoyumluluğu yüksek sistein molekülü yoluyla hidrofilik ve monomerik bir kaplama sistemi gerçekleştirilmiştir.

Guanozin tanıma bölgelerine sahip nanokristallerin sentezi için metakroil grupları ile aktive edilmiş nanokristaller metal şelat (MAH-Pt(II)-Gz) monomer (0.05 mmol), çapraz bağlayıcı (0.4 mmol) ve etanol içinde radikal polimerizasyon başlatıcı (AIBN) içeren çözeltiliye ilave edilmiştir. Hazırlanan karışım cam polimerizasyon kabında 600 rpm karıştırma hızında manyetik karıştırıcı ile 60°C da 48 saat süreyle karıştırılmıştır. Polimerizasyon sonrasında guanozin nanokabuklara sahip CdS nanokristaller polimerizasyon ortamından uzaklaştırılmıştır. Kalıp molekül olan guanozinin uzaklaştırılması için nanokristaller 15 mL KOH ile 24 saat süreyle iki kez yıkanmıştır. Şekil 2.4'de

guanozin baskılı CdS nanokristallerde metal şelat monomer ve guanozin molekülü arasındaki kimyasal etkileşimlerin boyut ve yönlenimi görülmektedir.



Şekil 2.4. Guanozin baskılı CdS nanokristallerin şematik gösterimi

2.2.18. Guanozin baskılanmış CdS nanokristallerin luminesans ölçümleri

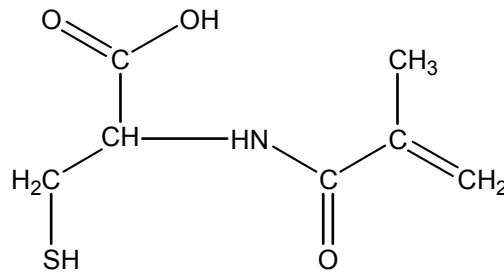
Guanozin baskılanmış CdS nanokabuk sensörlerin guanozin tanıma kapasitesi ve seçicilik çalışmaları guanin, ss-DNA, ds-DNA ve adenozin çözeltileri kullanılarak floresans spektrofotometresi ile belirlenmiştir. Guanin, guanozin, ss-DNA, ds-DNA örneklerinin ve CdS kuantum nokta nanosensörlerin uyarılma daldaboyu 300 nm'de ve emisyon dalgaboyu 600 nm'de belirlenmiştir.

3. BULGULAR

3.1. Hazırlanan Monomerlerin Karakterizasyonu

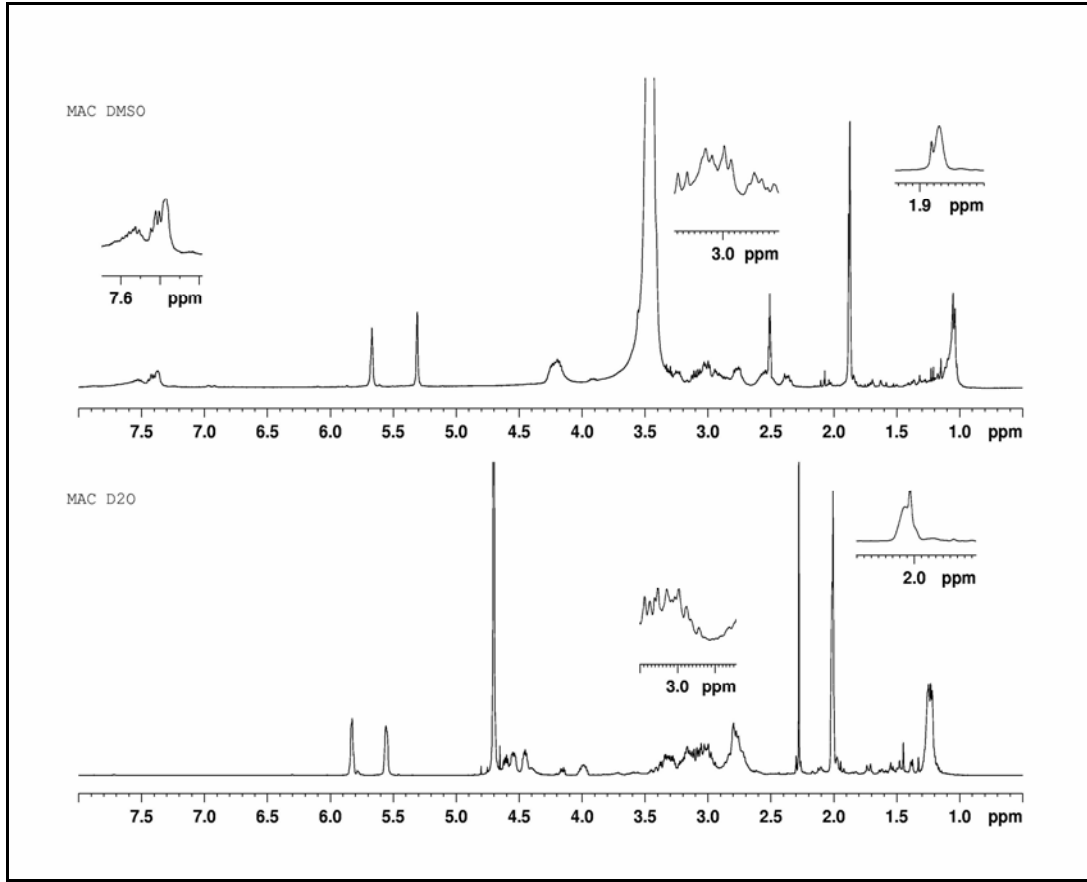
3.1.1. MAC ve MAC-Hg(II) monomerlerinin karakterizasyonu

Şekil 3.1'de açık yapısı verilen MAC monomerinin karakterizasyonu için iki farklı çözücüde (DMSO-D₆ ve D₂O) ¹H-NMR spektrumları alınmıştır. Şekil 3.2. NMR spektrumlarını göstermektedir. Karakteristik pikler şu şekildedir; 7.67-7.36 ppm arasındaki pikler -SH ve -NH protonlarına ait olup suda bu piklerin gözlenmemesi hareketli proton olmalarından kaynaklanmaktadır. 5.67 ve 5.31 ppm de etilen protonları gözlenmektedir. 4.16 ppm'de -CH, 1.88 ppm'de -CH₃ pikleri gözlenmektedir



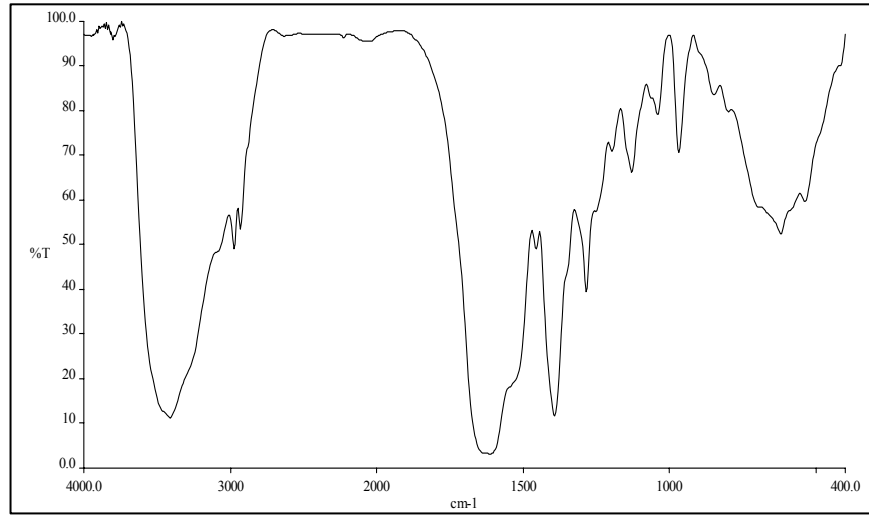
metakrilamidosisstein

Şekil 3.1. Metakrilamidosisstein monomerinin molekül formülü



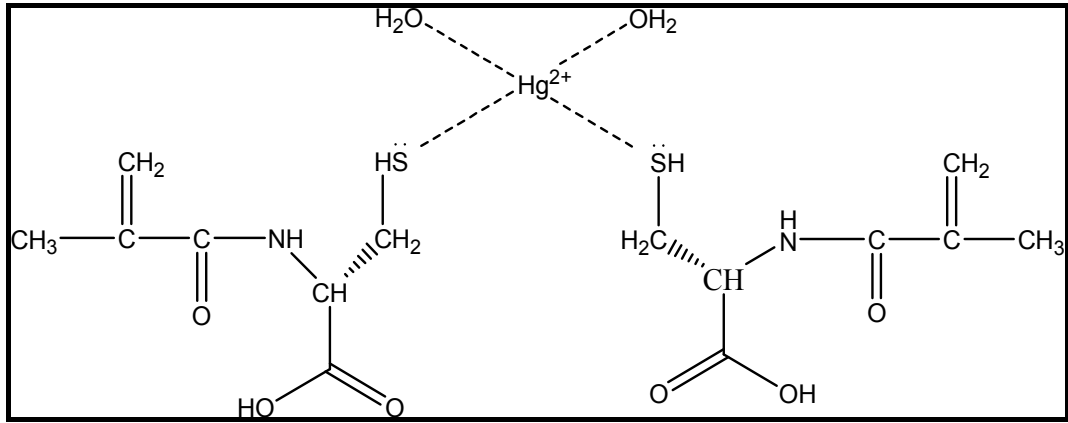
Şekil 3.2. MAC monomerinin NMR spektrumu

Şekil 3.3’de görülen FTIR spekturumundan MAC yapısında bulunan karbonil gruplarının ağırlıklı 1615 cm^{-1} ’de, bağlı N-H gerilmelerinin 3414 cm^{-1} ’de, C-S gerilmelerinin ise 706 ve 622 cm^{-1} ’de band oluşturduğu söylenebilir.



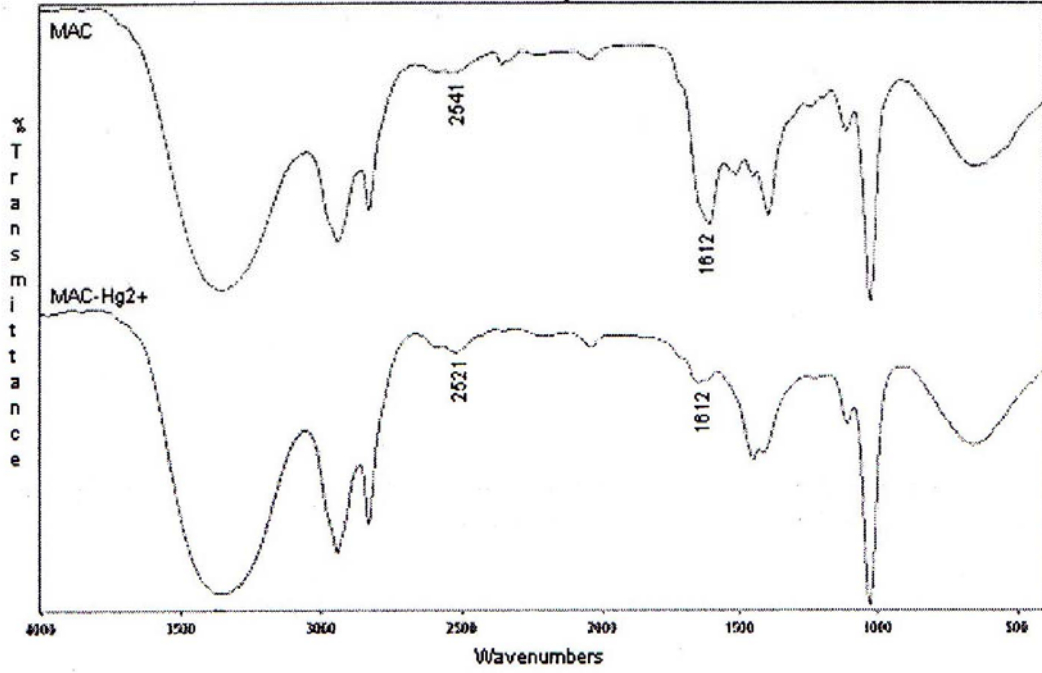
Şekil 3.3. MAC monomerinin FT-IR spektrumu

MAC monomeri ve Hg (II) arasındaki kompleks oluşumu FTIR ve RAMAN spektroskopisi ile karakterize edilmiştir Şekil 3.4’de MAC-Hg(II) kompleks monomerinin yapısı görülmektedir.



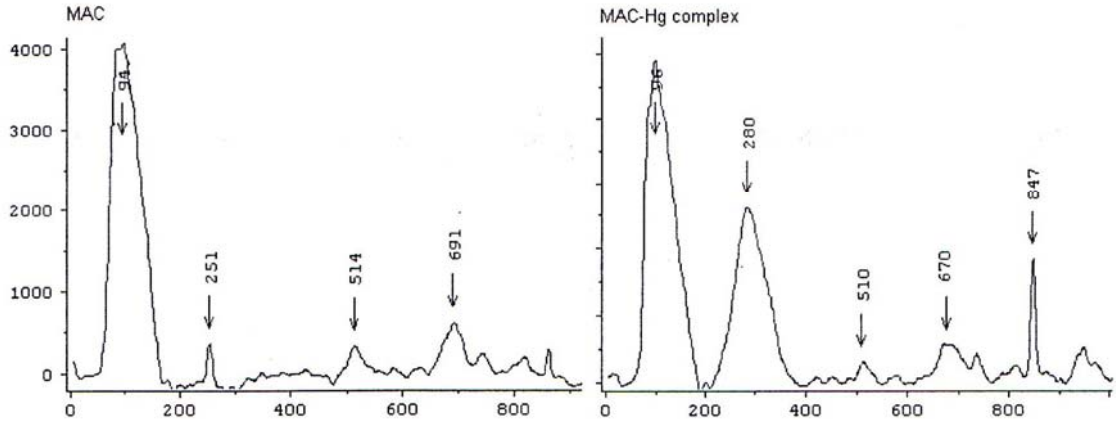
Şekil 3.4. MAC-Hg(II) monomerinin yapısı

Şekil 3.5’de verilen MAC monomerinin FTIR spektrumunda 1612 cm^{-1} ve 2541 cm^{-1} de -COO^- asimetrik gerilmesine ve -SH gerilmesine ait titreşim bantları görülmektedir. MAC ve Hg(II) arasındaki kompleks oluşumu sonucunda -SH gerilme titreşim bantı 2541 cm^{-1} ’den 2521 cm^{-1} ’e kaymıştır.



Şekil 3.5. MAC ve MAC-Hg(II) metal şelat monomerine ait FTIR spektrumları

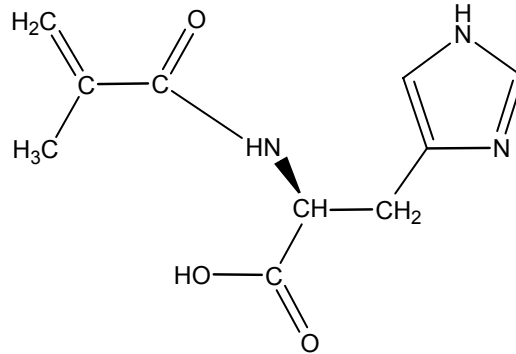
Hg-S-gerilme titreşimlerinin frekans aralığı yaklaşık $400-180 \text{ cm}^{-1}$ 'dir. Şekil 3.6'da verilen MAC monomerine ait Raman spektrumu incelendiğinde 691 cm^{-1} 'de C-S gerilme titreşimine ait bant gözlenmektedir. MAC-Hg(II) kompleksinde ise bu bantın 670 cm^{-1} 'e kaydığı gözlemlenmiştir. MAC monomerindeki sistein yapısında bulunan karbon (C-C-C) gruplarına ait eğilme bandı ise kompleks oluşumu sonrasında 514 cm^{-1} değerinden 510 cm^{-1} değerine kaymıştır. Ayrıca kompleks oluşumunu destekleyen (C-S-Hg) bükülesine ait 280 cm^{-1} bandı ve (Hg-S) asimetric titreşimine ait 847 cm^{-1} bantları görülmektedir.



Şekil 3.6. MAC ve MAC-Hg(II) metal şelat monomerine ait Raman spektrumları

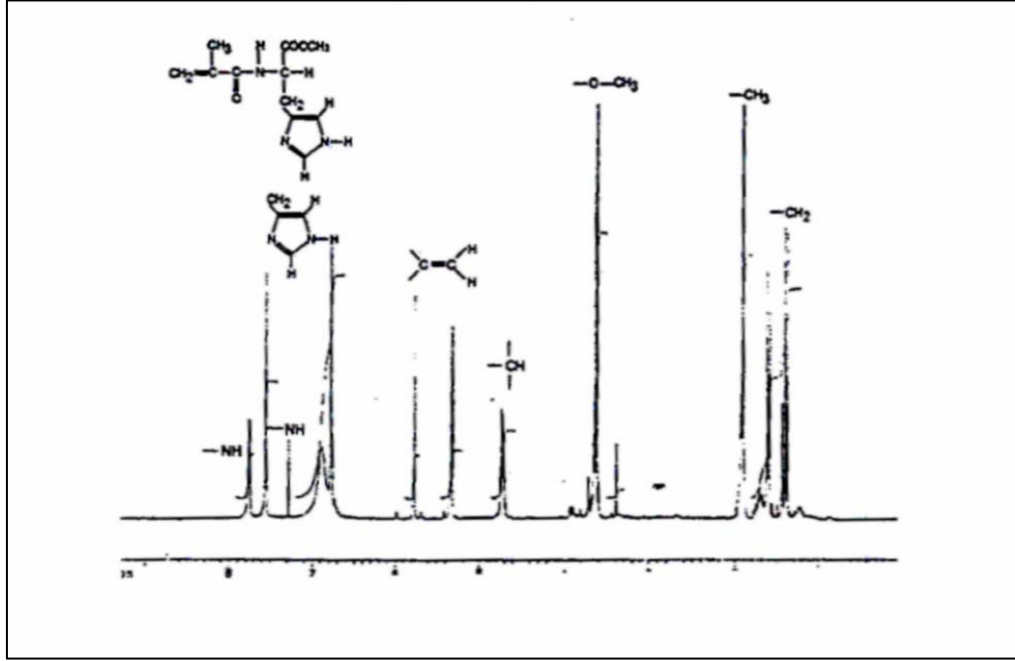
3.1.2. MAH ve MAH-Pt(II) monomerlerinin karakterizasyonu

Şekil 3.7'de açık yapısı verilen MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde $^1\text{H-NMR}$ kullanılmıştır.



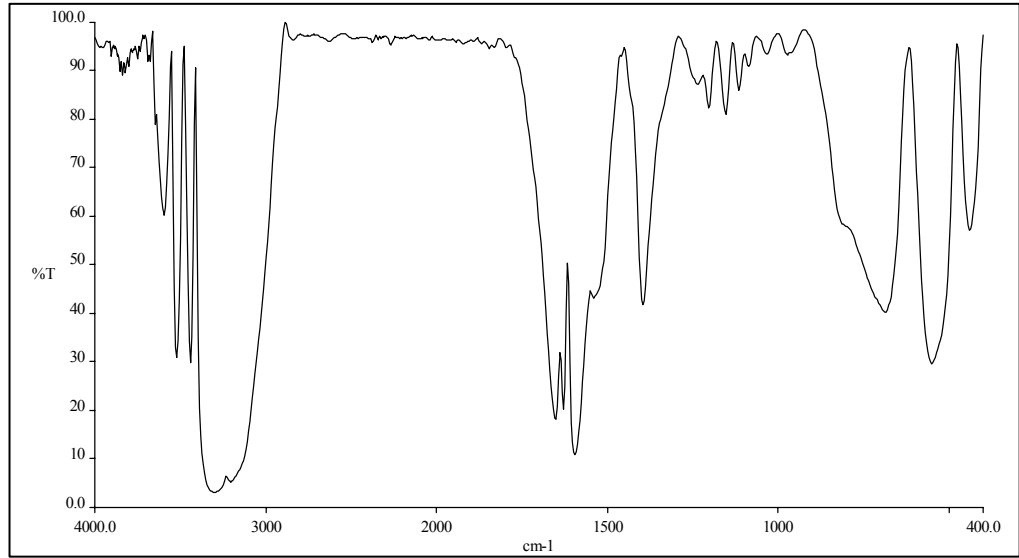
Şekil 3.7. Metakrilamidohistidin monomerinin molekül formülü

Yukarıda açık yapısı görülen MAH monomerinin Şekil 3.8'de verilen $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler görülmektedir. Bu karakteristik pikler: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.99 (t; 3H, $J=7.08$ Hz, CH_3), 1.42 (m; 2H, CH_2), 3.56 (t; 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (d; 1H, $J=7.4$ Hz, NH), 7.82 (d; 1H, $J=8.4$ Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) olarak bulunmuştur.



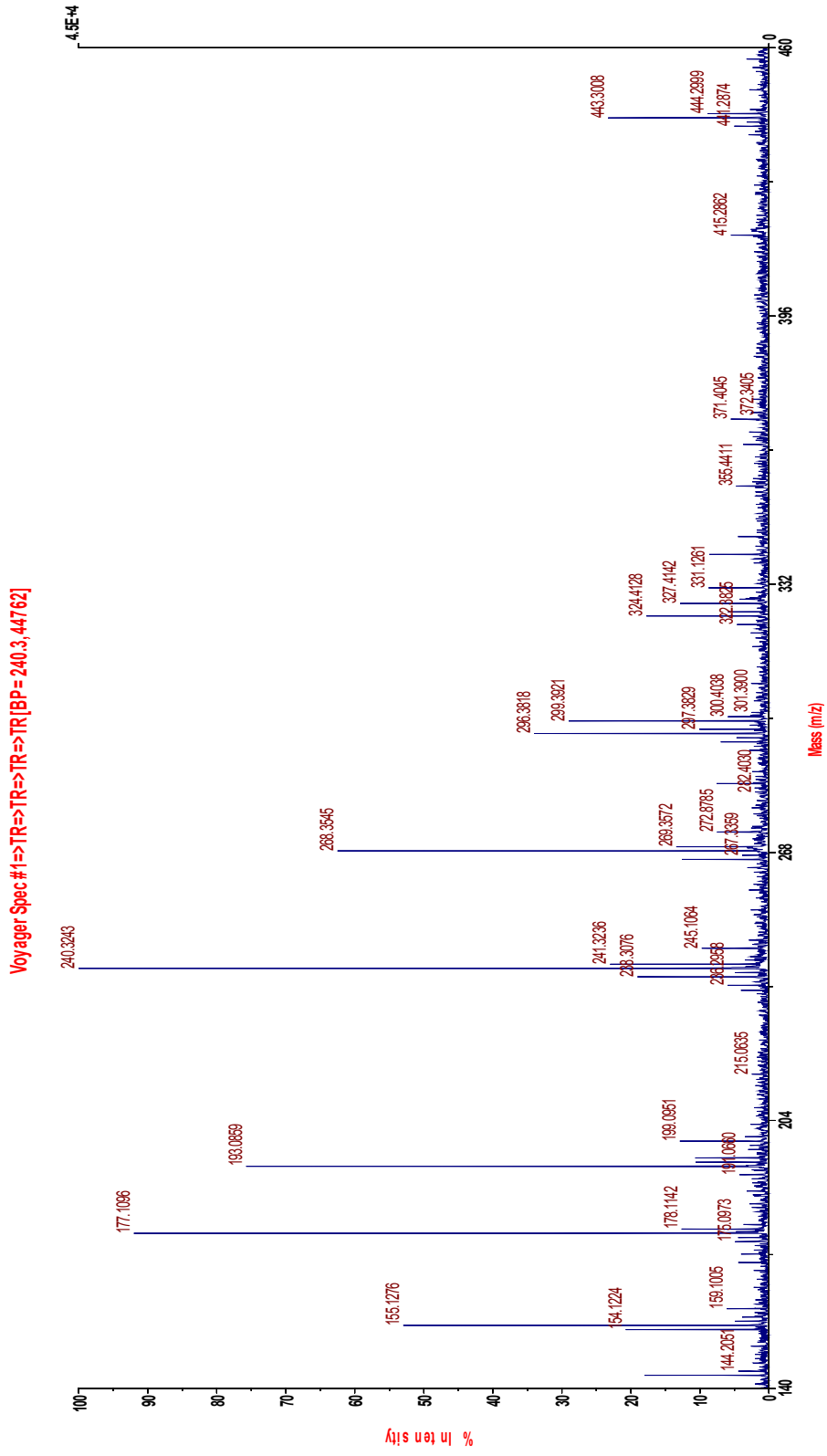
Şekil 3.8. MAH monomerinin ^1H -NMR spektrumu

MAH-Pt(II) monomeri FTIR ile karakterize edilmiştir. Şekil 3.9’de FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1653 ve 1629 cm^{-1} ’de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1529 cm^{-1} ’de görülmektedir. Ayrıca Pt-N titreşimine ait bandlar 552 ve 441 cm^{-1} ’de görülmektedir ki bu Pt(II) iyonlarının MAH yapısına koordine olduğunu göstermektedir. Bu spektrum hedef metal-şelat monomer yapının sentezlendiğini göstermektedir.

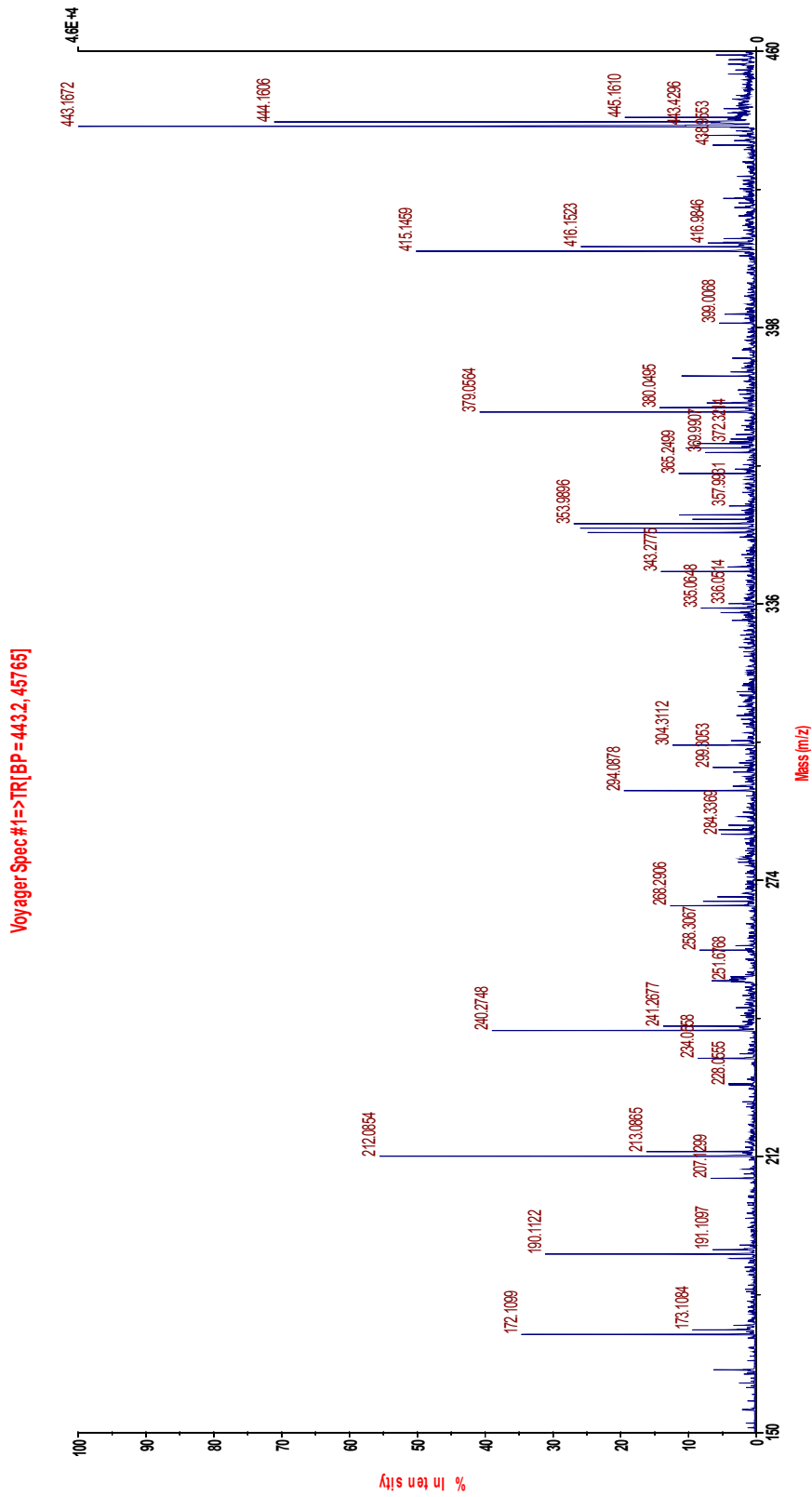


Şekil 3.9. MAH-Pt(II) monomerinin FT-IR spektrumu

Ayrıca MALDI-TOF-MS ile yapılan aydınlatma çalışmaları kapsamında; kütle analizleri pozitif reflektör modunda 2,5-dihidroksibenzoik asit ve α -Cyano-4-hidroksisinnamik acid matriksleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Şekil 3.10 ve Şekil 3.11'deki kütle spektrumlarından da görüleceği üzere MAH-Pt-(H₂O)₂ metal-şelat oluşumu 443 ile başlayan m/e değerlerinden de ortaya konulmuştur. Kütle spektrumlarında 415-417 arasında görülen pikler de platinin izotoplarını da içine alacak şekilde MAH-Pt oluşumunu desteklemektedir.



Şekil 3.10. MAH-Pt matris 2,5-dihidroksibenzoik asit olduğunda MALDI-TOF-MS kütle spektrumu



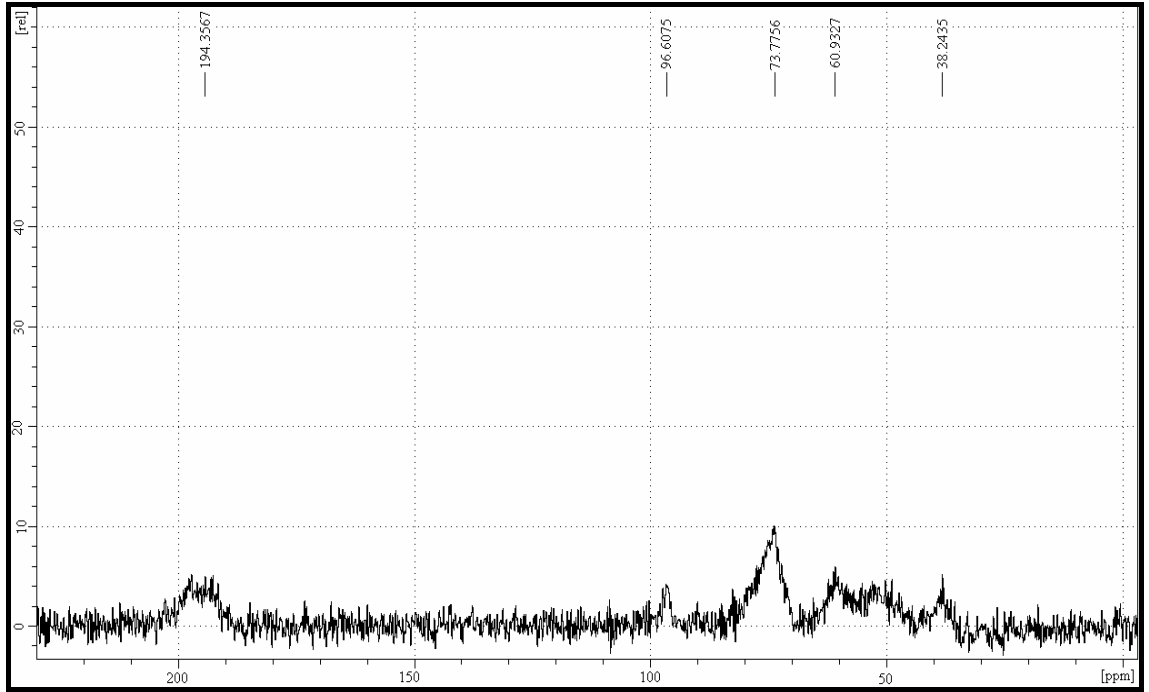
Şekil 3.11. MAH-Pt matiks α -Cyano-4-hidroksicinnamic acid olduğunda MALDI-TOF-MS kütle spektrumu

3.1.3. CdS nanosensörlerin ^{13}C -NMR ve TEM karakterizasyonları

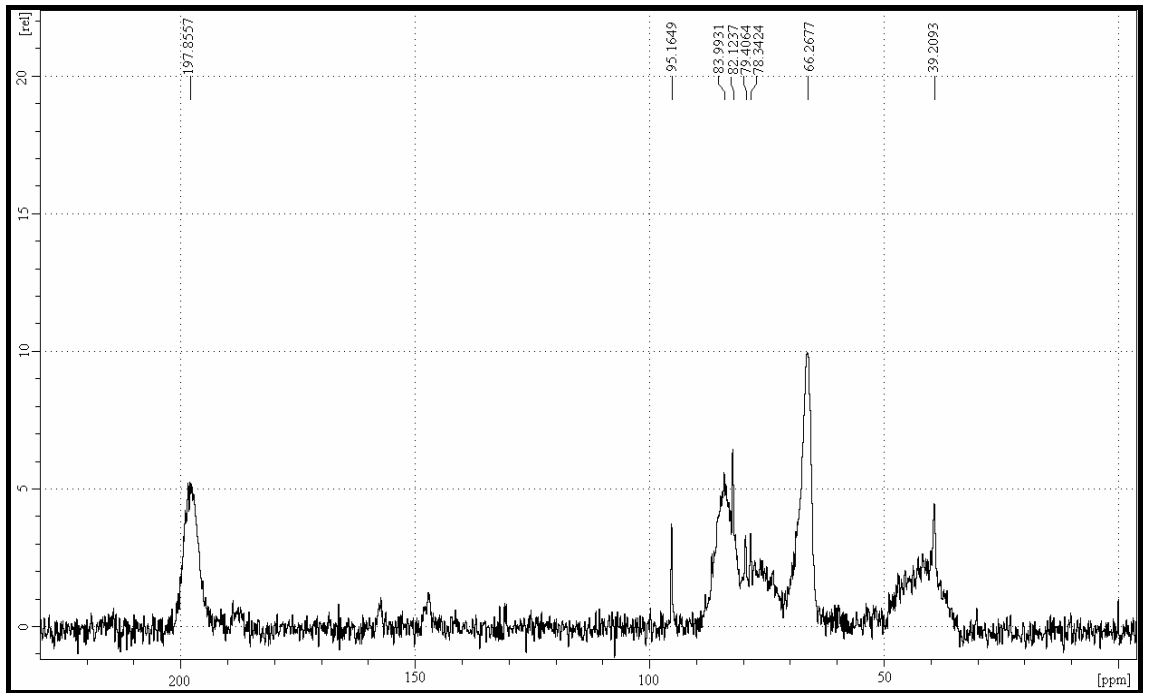
Şekil 3.12 a,b ve c'de sırasıyla metakrilamidosisstein ile aktive edilmiş CdS nanopartiküllerin ve guanozin baskılı nanosensörlerin kalıp uzaklaştırılmadan önce ve sonra alınan ^{13}C CP-MAS NMR spektrumları verilmiştir. Şekil 3.12 a'de verilen CdS nanokristallere ait spektrumda sistein yapısındaki karbonil grubuna ait pik 194.4 ppm'de, metakroil yapısındaki karbonil grubuna ait pik ise 198 ppm'de görülmektedir. Ayrıca metakroil yapısındaki metin ve metilen karbonlarına ait pikler sırasıyla 60.9 ve 73.8 ppm de, sistein yapısında bulunan karbon atomları içinse 38.2 ppm ve 50 ppm'de pikler görülmektedir.

Şekil 3.12 b'de görüldüğü gibi guanozin baskılı CdS nanokristallere ait NMR spektrumunda polimerizasyon sonrasında yapıya bağlanan histidin grupları nedeniyle 60.9 ve 73.8 ppm'deki pikler kaybolmuştur. Ayrıca spektrumda 66.3 ve 79.4 ppm'de histidin yapısındaki karbon atomlarına ait pikler ve 88-82.1 ppm'de guanozin yapısındaki C4', C1' ve C3' pikleri görülmektedir. Spektrumda 200 ppm civarında sinyaldeki artış polimerizasyonda çapraz bağlayıcı olarak kullanılan etilenglikoldimetakrilattan kaynaklanmaktadır.

Şekil 3.12 c'de kalıp molekül olan guanozinin yapıdan uzaklaştırılmasından sonra alınan NMR spektrumu verilmiştir. Spektrumda görüldüğü gibi guanozin molekülünün yapıdan uzaklaştırılması ile 88-82 ppm sinyalleri kaybolmuştur. Ayrıca MAC yapısındaki tiol gruplarına ait 41.7 ppm ve MAH-Pt yapısına ait 81-66 ppm sinyalleri CdS nanosensörlerin kararlılığını koruduğunu göstermektedir.

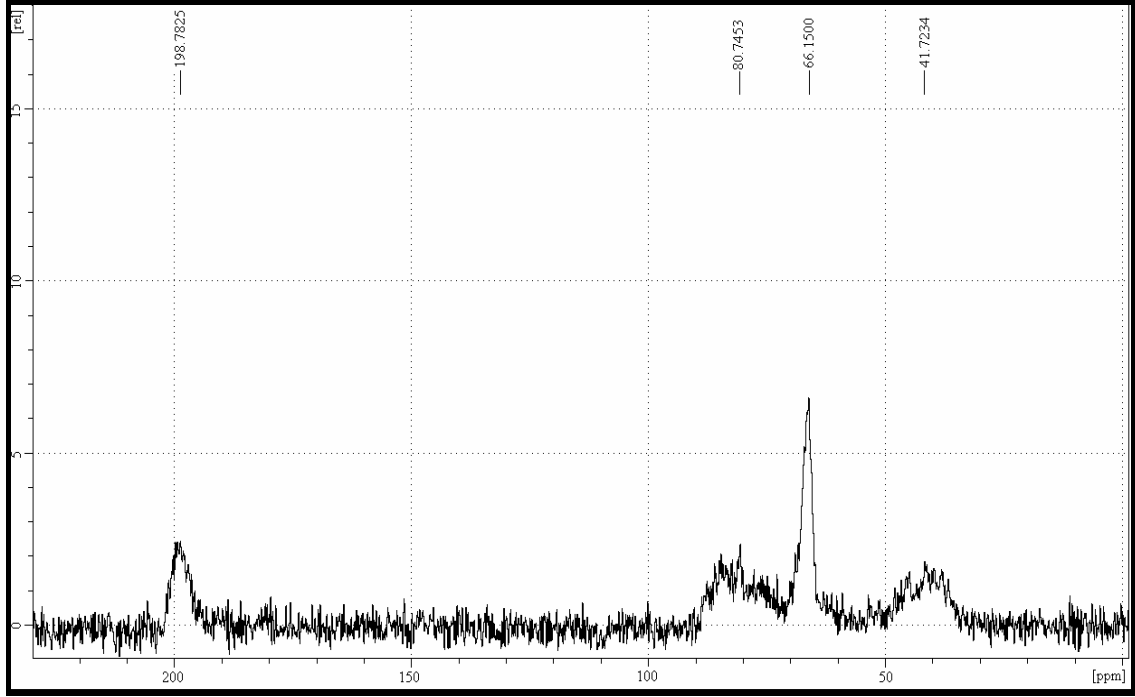


(a)



(b)

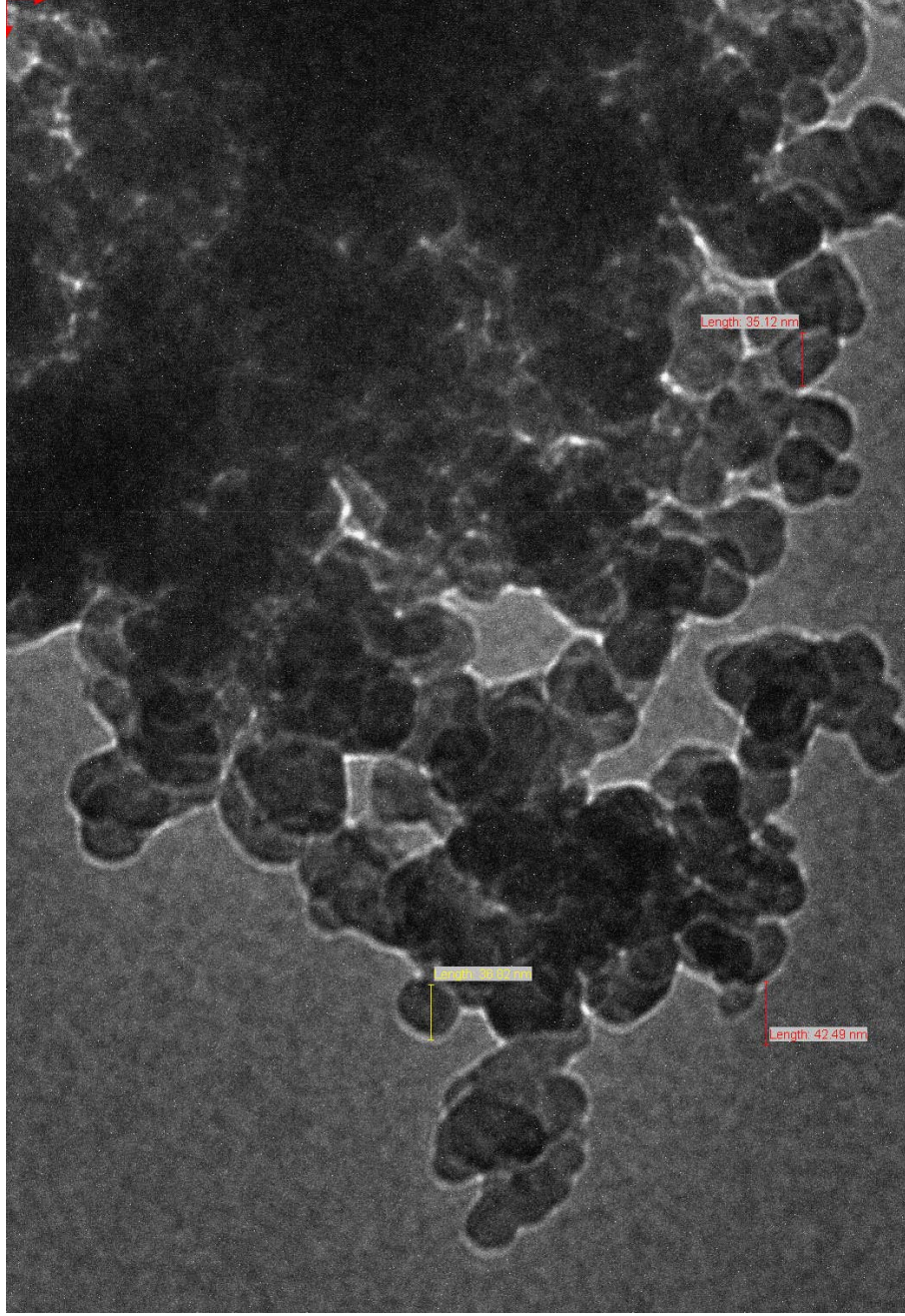
Şekil 3.12. Metakrilamidosisite ile aktive edilmiş CdS nanopartiküllerin (a) ve guanozin baskılı nanosensörlerin kalıp uzaklaştırılmadan önce (b) ve sonra (c) alınan ^{13}C CP-MAS NMR spektrumları



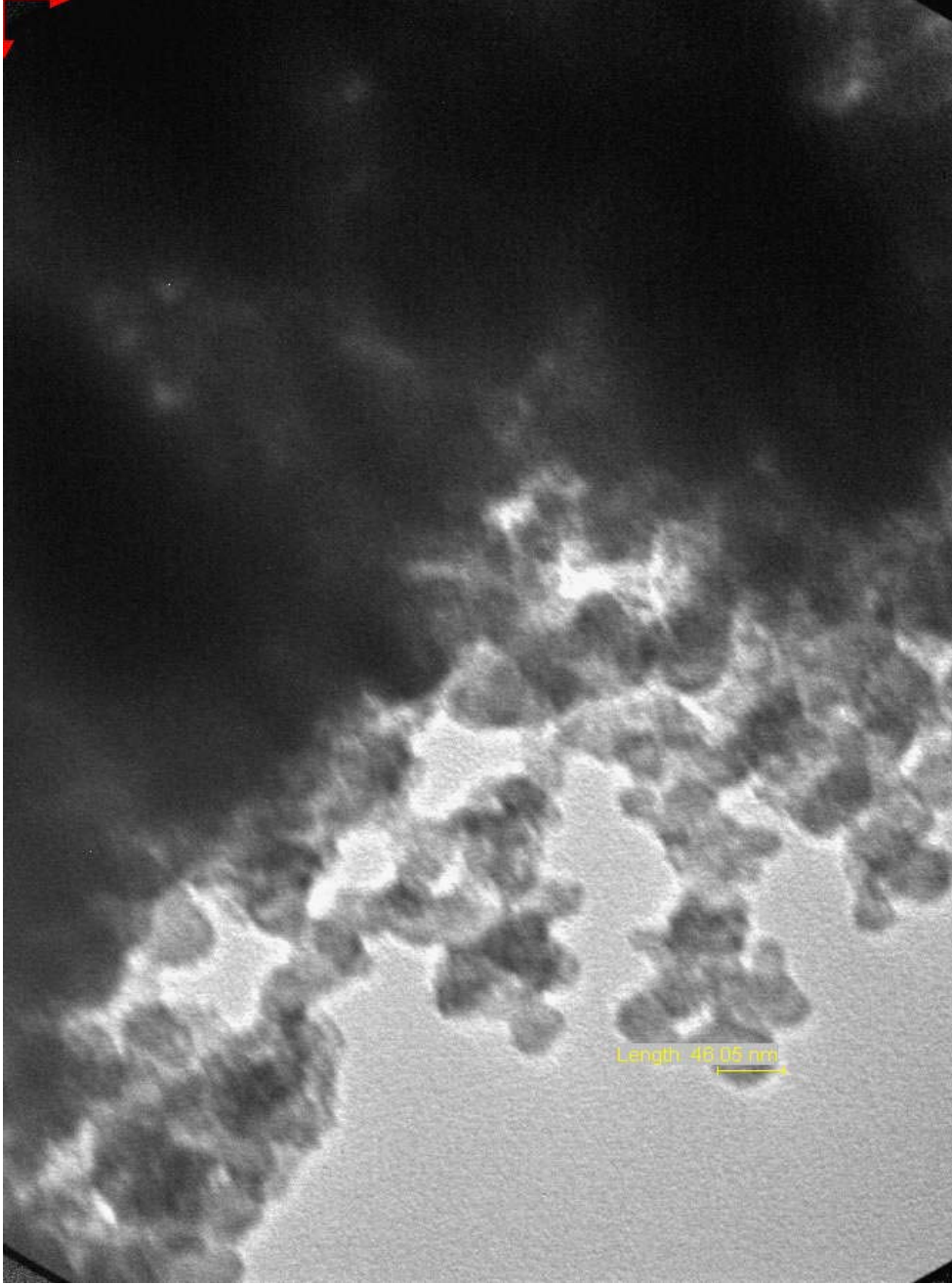
(c)

Şekil 3.12. (Devam) Metakrilamidosisitein ile aktive edilmiş CdS nanopartiküllerin (a) ve guanozin baskılı nanosensörlerin kalıp uzaklaştırılmadan önce (b) ve sonra (c) alınan ^{13}C CP-MAS NMR spektrumları

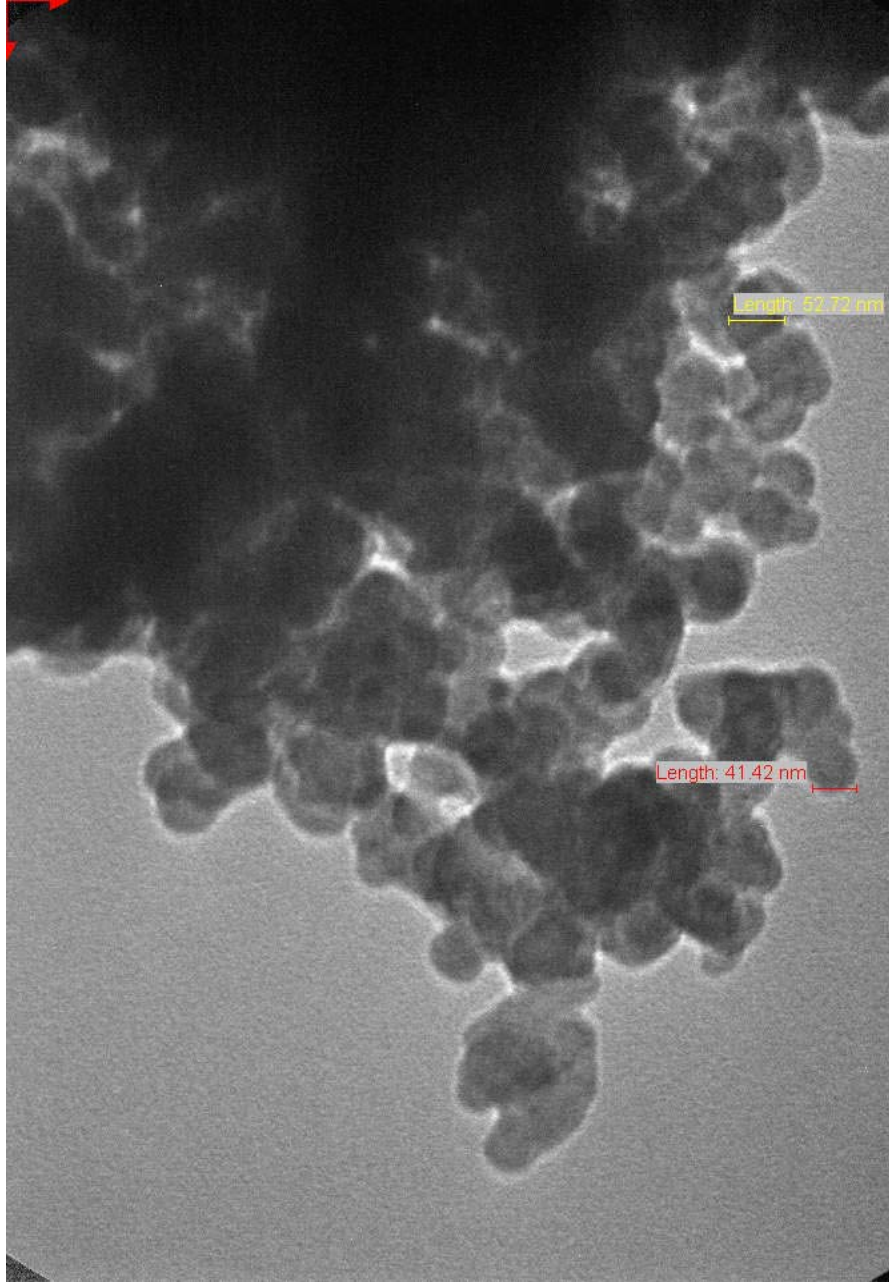
MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin ve guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce ve uzaklaştırıldıktan sonra CdS nanopartiküllerin alınan TEM görüntüleri Şekil 3.13, 3.14 ve 3.15’de verilmiştir. Şekil 3.13’de görüldüğü gibi MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküller küresel formda ve ortalama 35 nm boyutundadır. Şekil 3.14’de CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce alınan TEM görüntüsünde ise nanopartiküllerin küresel formda ve ortalama 46 nm boyutta oldukları görülmektedir. CdS nanopartiküllerin metanolik KOH ile yıkanarak guanozin kalıbın uzaklaştırılmasından sonra alınan TEM görüntüsünde (Şekil 3.15) nanopartiküllerin küresel şeklini koruduğu ve ortalama 45 nm boyutta oldukları görülmektedir.



Şekil 3.13. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin TEM görüntüsü



Şekil 3.14. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce TEM görüntüsü



Şekil 3.15. MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırıldıktan sonra TEM görüntüsü

3.2. Guanozin, Adenin ve Guanin Baskılı Polimerler İle SPR Ölçümleri

3.2.1. Guanozin baskılı SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi

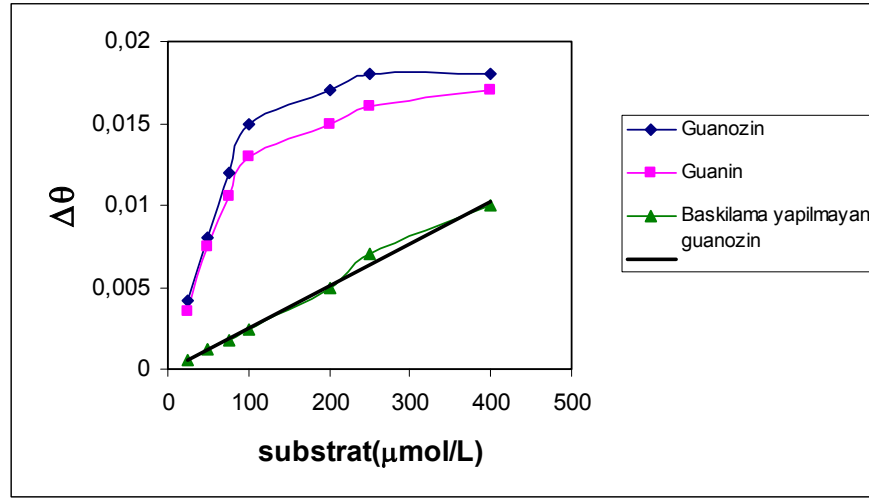
SPR, altın bir yüzeye yakın ortamdaki kırılma indisi değişimlerini belirleme esasına dayanan optik bir metoddur. Yansıma şiddeti ve gelme açısı arasındaki ilişki, altın-çözelti arayüzeyi arasındaki yüzey plazmonunun uyarılmasından kaynaklanan minimum yansıma şiddetini verir. Minimum yansıma şiddetini veren gelme açısının değeri (θ), altın yüzeyine bitişik arayüz bölgesindeki kırılma indisinin değişimiyle kayar (Taniwaki ve ark. 2003). θ daki kaymanın miktarı ($\Delta\theta$), yüzeyde adsorplanan maddenin miktarıyla orantılıdır. $\Delta\theta$ değeri kullanılarak, verilen hedef molekülün açık bir adsorpsiyon izoterm'i çizilebilir. Bu temel bilgiden hareketle guanozin hedef molekülünün DNA tanımadaki etkinliği ortaya konulmuştur.

SPR ile guanozin baskılanmış MIP filminin DNA tanıma kapasitesini incelemeye önce, kontrol filmi olarak baskılanmamış (guanozin kullanılmayan) malzeme ölçülmüştür. $\Delta\theta$ değeri, adsorplanmış maddenin miktarıyla orantılı olmasına rağmen, SPR-MIP film üzerinde adsorbe edilmiş maddenin derişimine doğrudan çevrilemez. Bu çalışmada, moleküler olarak baskılanmış malzemede, adsorbe edilen malzeme derişimi $\Delta\theta$ değerini veren bir faktör " f " ile çarpılarak dikkate alınmıştır.

$$\Delta\theta = f \cdot [\text{madde}]_m \quad (3.1)$$

f ; $[\text{madde}]_m$ derişim değerini $\Delta\theta$ ya çeviren faktördür.

Guanozin baskılanmış MIP filme adsorplanan guanin ve guanozinin adsorpsiyon izotermeleri, madde derişiminin bir fonksiyonu olarak gözlemlenen $\Delta\theta$ 'nin çizilmesi ile elde edilmiş ve bir arada Şekil 3.16'da gösterilmiştir. Ayrıca kontrol amacıyla hazırlanan guanozin kullanılmayan SPR filmin etkisi de grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3.16. Guanozin baskılanmış ve baskılanmamış filmlere substratların adsorpsiyon izotermleri

Guanozin ve guanin için görülen her iki adsorpsiyon izoterminin, MIP filminin bu iki elemana belli bir afinitesi olduğunu göstermektedir. Guanozin baskılanmamış kontrol filmi için ise guanozine duyarlı olmadığını gösteren ve orijin noktasından geçen doğru elde edilmiştir. Bu durum, guanozin substratının baskılanmamış kontrol malzemesinde spesifik olmayan bir şekilde adsorbe edildiğini göstermektedir.

MIP'deki adsorplanan guanozinin derişimi aşağıdaki eşitlikte gösterilebilir.

$$\Delta\theta = f[Gz]_m = f \left\{ k_{A,app} [Gz] + \frac{K_{S,app} [site]_0 [Gz]}{1 + K_{S,app} [Gz]} \right\} \quad (3.2)$$

$[Gz]_m$, MIP'deki adsorbe edilmiş Gz'nin toplam derişimi, $K_{S,app}$, Gz substratı ve guanozin moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, $[site]_0$ MIP'deki moleküler tanıma bölgeleri derişimi ve $[Gz]$ ise tampondaki Gz derişimidir. Gz ve oluşturulan moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir:

Gz ve belleklendirilmiş moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, verilen derişimlerde Gz ve örneğin, benzer bir molekülü olan adenozin (Az)

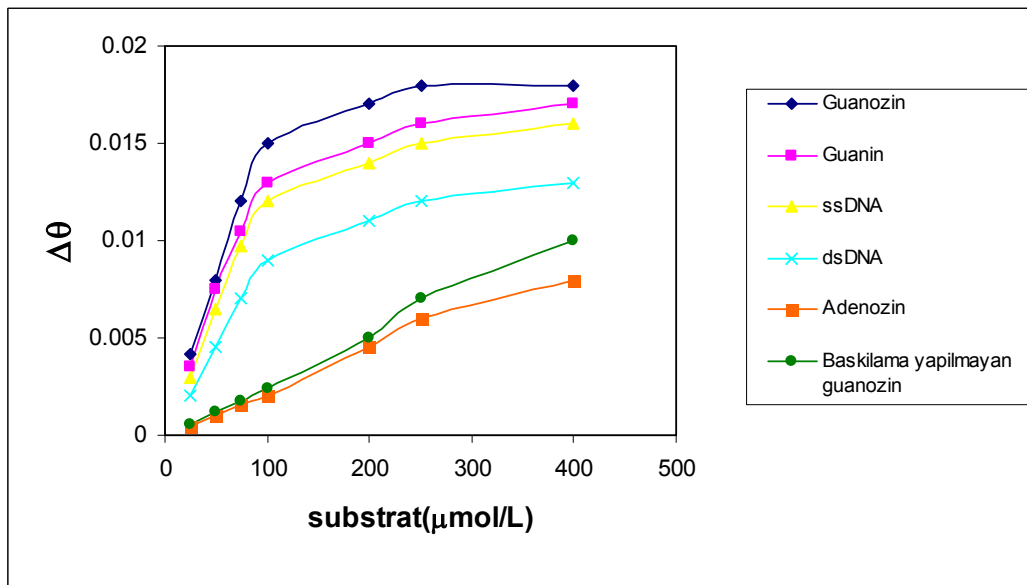
kullanılarak belirlenmiştir. Guanozin ve örnekler arasındaki rezonans frekans kayması, $(\Delta\theta)_s$, aşağıdaki eşitlikle korele edilebilir.

$$(\Delta\theta)_s = f \left\{ \frac{K_{s,app} [site]_0 [Gz]}{1 + K_{s,app} [Gz]} \right\} \quad (3.3)$$

θ daki adenozine göreceli bir kayma ile $(\Delta\theta)_s$ 'in sonsuz derişimdeki $(\Delta\theta)_{s,\infty}$ ($= f [site]_0$) oranı Gz derişiminin bir fonksiyonu olarak belirlenebilir ve $(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ aşağıdaki eşitlikle korele edilebilir (Taniwaki ve ark. 2003).

$$\frac{(\Delta\theta)_s}{(\Delta\theta)_{s,\infty}} = \frac{K_{s,app} [Gz]}{1 + K_{s,app} [Gz]} \quad (3.4)$$

$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ oranı ve Gz derişimi arasındaki ilişkiden, Şekil 3.17'de görülen adsorpsiyon izotermelerinden her bir molekül için guanozin baskılanmış malzemenin afinite sabiti belirlenmiştir. Belirlenmiş mevcut afinite sabitleri, $K_{s,app}$, Çizelge 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.17. Guanozin bellekli SPR sensörün adenozin ve diğer substratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri

Şekil 3.17'den görüleceği üzere guanozin belleklere sahip MIP-SPR sensörü adenozin için orjinden geçen bir ilişki oluşturmaktadır ki bu durum MIP filmin adenozin molekülü için spesifik olmayan ve Az ye afinite göstermeyen bir özelliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.1'de verilen adenozine göreceli afinite sabitlerinin büyüklüğü, DNA tanıyan molekül belleklerin oluştuğunu ve etkin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.1. Guanozin baskılı polimerin adenozine göreceli afinite sabitleri

Substrat	Substrat ve Adenozin (0.05mM) arasındaki $(\Delta\theta)_s$	$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_\infty$	$K_{\text{affinity}} (1 / M)$
Guanozin	0.0070	0.389	66382
Guanin	0.0065	0.382	59463
ssDNA	0.0055	0.344	35908
dsDNA	0.0035	0.269	12511

Literatürde guanozin belleklere sahip MIP filmlerin kullanıldığı DNA mimik malzemelerin etkinliğine yönelik çalışmalar bulunmamaktadır. Metal-şelat yaklaşımının kullanıldığı nükleotit bazı baskılanmış çalışma kaydedilmekle birlikte şu ana dek yaptığımız çalışmalarda MAH-Pt metal-şelat monomeriyle guanozin baskılamanın sonuç verdiğini ve belleklerle guanozinin (66382 1/M), guanin, ss-DNA ve ds-DNA'nın guanin ayağından oldukça yüksek seçicilikte etkileşime girdiğini söyleyebiliriz.

Sonuç olarak guanozin spesifik tanıma bölgesine sahip malzemeler için olan adsorpsiyon seçicilik profilinde gözlemlendiği gibi, Gz'ye doğru olan adsorpsiyon seçiciliği MIP filmin yüzeyinde DNA elemanlarından olan guanin ve guanozin moleküllerini tanıma bölgelerine sahip belleklerin oluştuğunu söyleyebiliriz. Aynı zamanda biyouyumluluğu çok yüksek olan sulu çözeltilerde polimerleşmeyi sağlayacak bir teknik geliştirilmiştir.

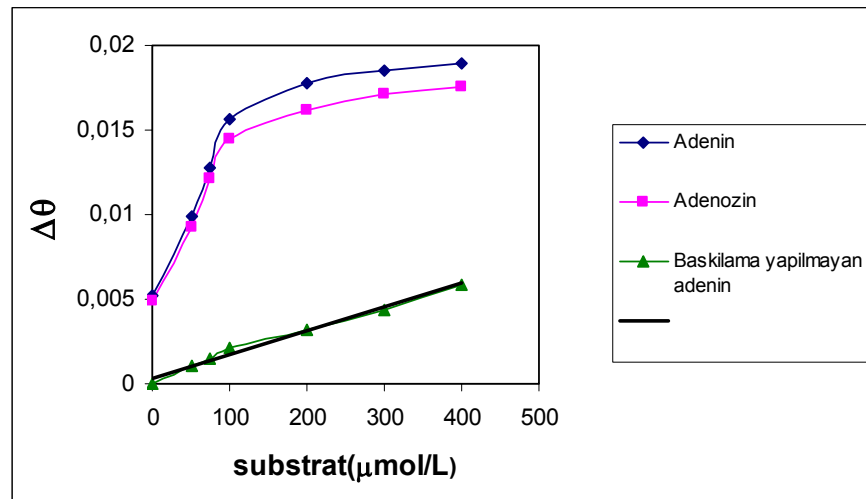
3.2.2. Adenin baskılı SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi

SPR ile adenin baskılanmış MIP filminin DNA tanıma kapasitesini incelemeye önce, kontrol filmi olarak baskılanmamış (adenin kullanılmayan) malzeme ölçülmüştür. Adsorbe edilen adenin derişimi, guanozin baskılı polimerde olduğu gibi $\Delta\theta$ değerini veren bir faktör, " f ", ile çarpılarak dikkate alınmıştır.

$$\Delta\theta = f \cdot [\text{madde}]_m \quad (3.5)$$

f ; $[\text{madde}]_m$ derişim değerini $\Delta\theta$ ya çeviren faktördür.

Adenin baskılanmış MIP filme adsorplanan adenin ve adenozin adsorpsiyon izotermi, madde derişiminin bir fonksiyonu olarak gözlemlenen $\Delta\theta$ 'nin çizilmesi ile elde edilmiş ve bir arada Şekil 3.18'de gösterilmiştir. Kontrol amacıyla hazırlanan adenin kullanılmayan SPR filmin etkisi de grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3.18. Adenin baskılanmış ve baskılanmamış filmlere substratların izotermi

Adenin ve adenozin için görülen her iki adsorpsiyon izotermi, MIP filmin bu iki elemana belli bir afinitesi olduğunu göstermektedir. Adenin baskılanmamış kontrol filmi için ise adenine duyarlı olmadığını gösteren ve orijin noktasından

geçen bir doğru elde edilmiştir. Adenin substratı için $\Delta\theta$, baskılanmamış kontrol malzemesinde spesifik olmayan bir şekilde adsorbe edildiğini göstermektedir.

MIP'deki adsorplanan adenin derişimi aşağıdaki eşitlikle gösterilebilir.

$$\Delta\theta = f[Ad]_m = f \left\{ k_{A,app} [Ad] + \frac{K_{S,app} [site]_0 [Ad]}{1 + K_{S,app} [Ad]} \right\} \quad (3.6)$$

$[Ad]_m$ MIP'deki adsorbe edilmiş Ad'nin toplam derişimi, $K_{S,app}$ Ad substratı ve adenin moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, $[site]_0$ MIP'deki moleküler tanıma bölgeleri derişimi ve $[Ad]$ tampondaki Ad derişimidir. Ad ve oluşturulan moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir.

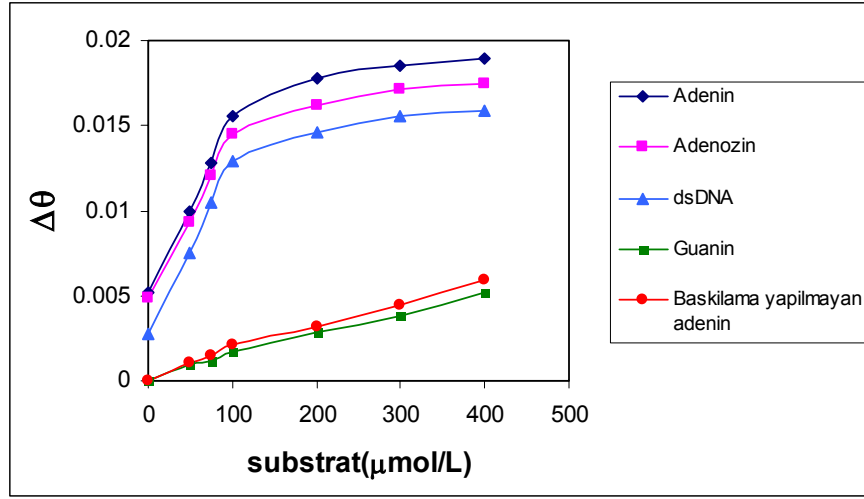
Ad ve belleklendirilmiş moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, verilen derişimlerde Ad ve örneğin, benzer bir molekölü olan guanin (Gu) kullanılarak belirlenmiştir. Adenin ve örnekler arasındaki rezonans frekans kayması, $(\Delta\theta)_s$, aşağıdaki eşitlikle korele edilebilir.

$$(\Delta\theta)_s = f \left\{ \frac{K_{S,app} [site]_0 [Ad]}{1 + K_{S,app} [Ad]} \right\} \quad (3.7)$$

θ daki guanozine göreceli bir kayma ile $(\Delta\theta)_s$ 'in sonsuz derişimdaki $(\Delta\theta)_{s,\infty}$ ($= f [site]_0$) oranı Ad derişiminin bir fonksiyonu olarak belirlenebilir ve $(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ aşağıdaki eşitlikle korele edilebilir.

$$\frac{(\Delta\theta)_s}{(\Delta\theta)_{s,\infty}} = \frac{K_{S,app} [Ad]}{1 + K_{S,app} [Ad]} \quad (3.8)$$

$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ oranı ve Ad derişimi arasındaki ilişkiden, Şekil 8.19'da görülen adsopsiyon izotermelerinden her bir moleköl için adenin baskılanmış malzemenin afinite sabiti belirlenmiştir. Belirlenmiş mevcut afinite sabitleri, $K_{S,app}$, Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3.19. Adenin bellekli SPR sensörün adenin ve diğer substratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri

Şekil 3.19'dan görüleceği üzere adenin belleklere sahip MIP-SPR sensörü guanin için orjinden geçen bir ilişki oluşturmaktadır ki bu durum MIP filmin guanin molekülü için spesifik olmayan ve guanine afinite göstermeyen bir özelliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.2'de verilen guanine göreceli afinite sabitlerinin büyüklüğü DNA tanıyan molekül belleklerin oluştuğunu ve etkin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.2. Adenin baskılı polimerin guanozine göreceli afinite sabitleri

Substrat	Substrat ve Guanin (0.05mM) arasındaki $(\Delta\theta)_s$	$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_\infty$	$K_{\text{affinity}} (1 / M)$
Adenin	0.0086	0.421	52326
Adenozin	0.0078	0.416	49981
dsDNA	0.0055	0.323	15182

Literatürde adenin baskılanmış çalışmalara bakıldığında Shea ve ark'nın.(1996) çalışmalarına göre kloroform ve/veya asetonitril çözücülerin kullanılmasıyla metakrilik asit varlığında yapılan MIP malzemelerin afinite sabitleri 700-2400 1/M arasında değişmektedir. Yine adenozin baskılanmış başka

bir çalışmada (Taniwaki ve ark. 2003) polisülfon malzeme kullanılmış ve Ka değerleri 13000-16000 1/M olarak bulunmuştur. Çalışmalarımız sonucu elde edilen Ka değerleri literatür değerlerine göre oldukça yüksektir. Bu çalışmalarda bize MAC-Hg metal-şelat monomeriyle adenin baskılanmanın sonuç verdiğini ve belleklerle adenin, adenozin ve ds-DNA'nın adenin ayağından oldukça yüksek seçicilikte etkileşime girdiğini göstermektedir.

Sonuç olarak MIP filmin yüzeyinde DNA elemanlarından olan adenin ve adenozin moleküllerini tanıma bölgelerine sahip belleklerin oluştuğunu söyleyebiliriz.

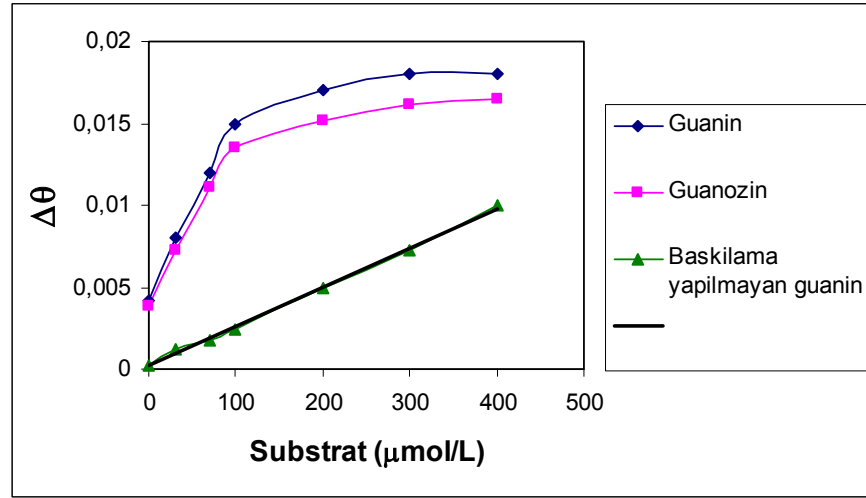
3.2.3. Guanin bellekli SPR sensörün DNA tanıma etkinliğinin incelenmesi

SPR ile guanin baskılanmış MIP filminin DNA tanıma kapasitesini incelemeye önce, kontrol filmi olarak baskılanmamış (guanin kullanılmayan) malzeme ölçülmüştür. Moleküler olarak baskılanmış malzemede, adsorbe edilen malzeme derişimi $\Delta\theta$ değerini veren bir faktör " f " ile çarpılarak dikkate alınmıştır.

$$\Delta\theta = f \cdot [\text{madde}]_m \quad (3.9)$$

f ; $[\text{madde}]_m$ derişim değerini $\Delta\theta$ ya çeviren faktördür.

Guanin baskılanmış MIP filme adsorplanan guanin ve guanozinin adsorpsiyon izotermi, madde derişiminin bir fonksiyonu olarak gözlemlenen $\Delta\theta$ 'nin çizilmesi ile elde edilmiş ve birarada Şekil 3.20'de gösterilmiştir. Ayrıca kontrol amacıyla hazırlanan guanin kullanılmayan SPR filmin etkisi de grafikte gösterilmiştir.



Şekil 3.20. Guanin baskılanmış ve baskılanmamış filmlere substratların izotermi

Guanin ve guanozin için görülen her iki adsorpsiyon izotermi, MIP filmin bu iki elemana belli bir afinitesi olduğunu göstermektedir. Guanin baskılanmamış kontrol filmi için ise guanine duyarlı olmadığını gösteren ve orijin noktasından geçen doğru elde edilmiştir. Bu durumda, guanin substratı için $\Delta\theta$, baskılanmamış kontrol malzemesinde spesifik olmayan bir şekilde adsorbe edildiğini göstermektedir.

MIP'deki adsorplanan guaninin derişimi aşağıdaki eşitlikte gösterilebilir.

$$\Delta\theta = f[Gu]_m = f \left\{ k_{A,app} [Gu] + \frac{K_{S,app} [site]_0 [Gu]}{1 + K_{S,app} [Gu]} \right\} \quad (3.10)$$

$[Gu]_m$, MIP'deki adsorbe edilmiş Gu'nin toplam derişimi, $K_{S,app}$, Gu substratı ve guanozin moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, $[site]_0$ MIP'deki moleküler tanıma bölgeleri derişimi ve $[Gu]$ ise tampondaki Gu derişimidir. Gu ve oluşturulan moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti aşağıdaki yöntemle belirlenmiştir:

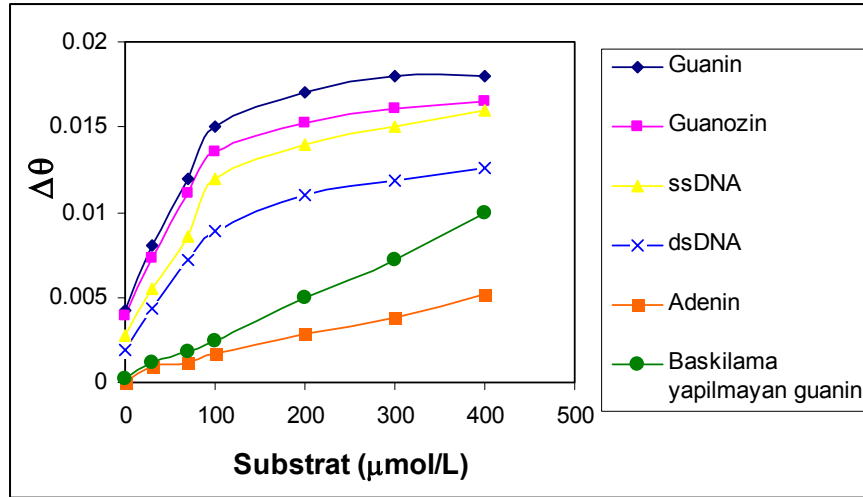
Gu ve belleklendirilmiş moleküler tanıma bölgeleri arasındaki afinite sabiti, verilen derişimlerde Gu ve örneğin, benzer bir molekülü olan adenin (Ad) kullanılarak belirlenmiştir. Guanin ve örnekler arasındaki rezonans frekans kayması, $(\Delta\theta)_s$, aşağıdaki eşitlikle korele edilebilir.

$$(\Delta\theta)_s = f \left\{ \frac{K_{S,app}[site]_0[Gu]}{1 + K_{S,app}[Gu]} \right\} \quad (3.11)$$

θ daki adenine göreceli bir kayma ile $(\Delta\theta)_s$ 'in sonsuz derişimdeki $(\Delta\theta)_{s,\infty}$ ($= f [site]_0$) oranı Gu derişiminin bir fonksiyonu olarak belirlenebilir ve $(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ aşığıdaki eşitlikle korele edilebilir.

$$\frac{(\Delta\theta)_s}{(\Delta\theta)_{s,\infty}} = \frac{K_{S,app}[Gu]}{1 + K_{S,app}[Gu]} \quad (3.12)$$

$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_{s,\infty}$ oranı ve Gu derişimi arasındaki ilişkidten Şekil 3.21'de görülen adsorpsiyon izotermelerinden her bir molekül için guanin baskılanmış malzemenin afinite sabiti belirlenmiştir. Belirlenmiş mevcut afinite sabitleri, $K_{s,app}$, Çizelge 3.3'de özetlenmiştir.



Şekil 3.21. Guanin bellekli SPR sensörün adenin ve diğer substratlara ilişkin adsorpsiyon izotermeleri

Şekil 3.21'den görüleceği üzere guanin belleklere sahip MIP-SPR sensörü adenin için orjinden geçen bir ilişki oluşturmaktadır ki bu durum MIP filmin

adenin molekülü için spesifik olmayan ve Ad ye afinite göstermeyen bir özelliğe sahip olduğunu ifade etmektedir.

Çizelge 3.3’de verilen adenine göreceli afinite sabitlerinin büyüklüğü, DNA tanıma bölgelerine sahip molekül belleklerin oluştuğunu ve etkin olduğunu göstermektedir.

Çizelge 3.3. Guanin baskılı polimerin adenine göreceli afinite sabitleri

Substrate	Substrat ve Adenin (0.05mM) arasındaki ($\Delta\theta$)s	$(\Delta\theta)_s / (\Delta\theta)_\infty$	$K_{\text{affinity}} (1 / M)$
Guanin	0.0074	0.395	65827
Guanozin	0.0068	0.388	61548
ssDNA	0.0042	0.331	37206
dsDNA	0.0033	0.255	14368

Sonuç olarak guanin spesifik tanıma bölgesine sahip malzemeler için olan adsorpsiyon seçicilik profilinde gözlemlendiği gibi, Gu'ye doğru olan adsorpsiyon seçiciliği MIP filmin yüzeyinde DNA elemanlarından olan guanin ve guanozin moleküllerini tanıma bölgelerine sahip belleklerin oluştuğunu söyleyebiliriz. Aynı zamanda biyouyumluluğu çok yüksek olan sulu çözeltilerde polimerleşmeyi sağlayacak bir teknik geliştirilmiştir.

3.3. Guanozin, Adenin ve Guanin Baskılı Polimerler İle QCM Ölçümleri

3.3.1. Ligand etkileşimi aracılığıyla guanozin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü

Altın kuartz kristaller üzerine guanozin ligand-değişim metoduyla baskılı polimerlerini hazırlamak için metakroil bazlı yeni bir yöntem geliştirilmiş ve guanozin baskılı MAH-Pt(II)-Gz polimerinin guanozin seçiciliği incelenmiştir. Hedef molekülün metakroil temelli metal-şelat kopolimerine bağlanması kristalin frekansına yansıyan kütlede bir değişime (Δm) neden olmaktadır. Δm ve frekans kayması (ΔF_0) arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlik ile ifade edilebilir.

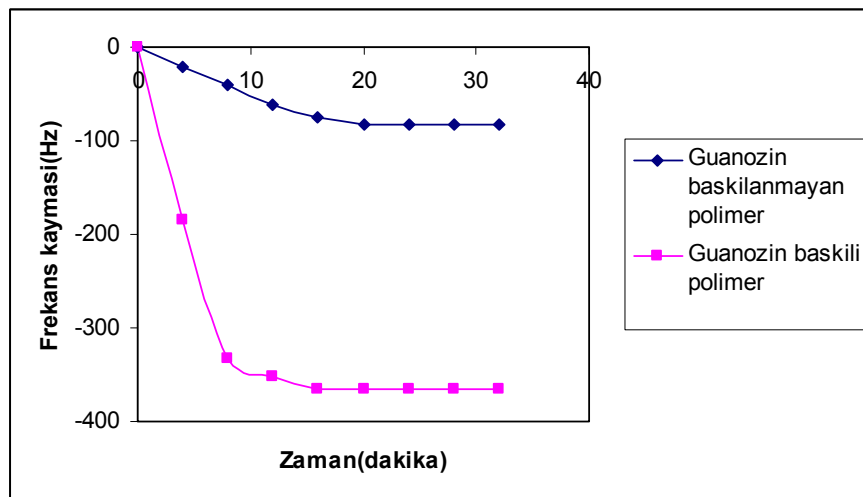
$$\Delta F = - \frac{2F_0^2 \Delta m}{A\sqrt{\rho\mu}} \quad (3.11)$$

Bu eşitlikte;

- F_0 : temel frekans
 A : piezoelektriksel yüzey alanı
 ρ : Kuartzın yoğunluğu
 μ : Kuartzın kayma modülünü ifade etmektedir.

Fosfat tamponu içinde baskılı polimer kaplı sensörün frekansı kararlı hale geldiği zaman guanozin çözeltisi dedektör hücresinin üzerine damlatılmıştır. Guanozin çözeltisi ilave edildikten sonra sensörün frekansı azalmıştır ve 12 dakika içinde sabit bir değere ulaşmıştır (Şekil 3.22).

Ligand değişim reaksiyonunun oldukça çabuk dengeye geldiği görülmüştür ve bu frekans değişimleri kuartz kristal üzerindeki baskılanmış polimere guanozin moleküllerinin tutunduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra baskılanmamış polimere guanozin bağlanmasının çok daha zayıf olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.22. Guanozin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri

Baskılı polimer ve guanozin kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiş ve bu yöntem MIP çalışmalarında daha önceleri de kullanılmıştır. Bu analizde aşağıdaki eşitlik kullanılmaktadır.

$$\frac{B}{[F]} = \frac{B_{maks}}{K_D} - \frac{B}{K_D} \quad (3.12)$$

Bu eşitlikte;

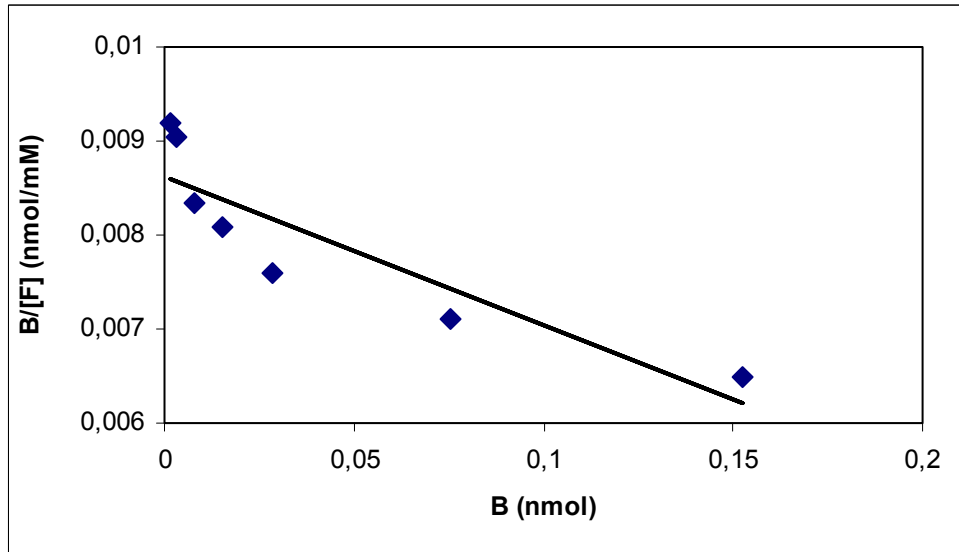
B : Polimere bağlanan guanozin miktarını

[F] : Serbest guanozin derişimini

B_{max} : Bağlanma bölgelerinin maksimum sayısını

K_D : Ligand-değişim temelli metal-şelat kopolimerinin ayrışma sabitini

ifade etmektedir.



Şekil 3.23. Guanozin baskılı polimerin Scatchard eğrisi

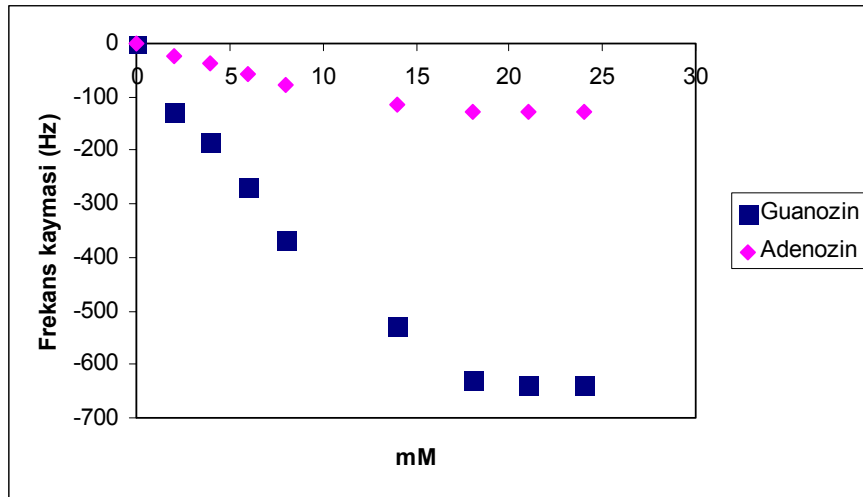
Şekil 3.23'de 0,1-20 mM aralığındaki guanozin çözeltisinin Scatchard grafiği görülmektedir. Bu aralık içindeki elde edilen Scatchard regresyon eşitliği

$$\frac{B}{[F]} = -0.00001580 B + 0.0086 \quad (3.13)$$

Eşitlik 3.13'den MIP sensöre guanozin bağlanması için bağlanma sabiti (K_a) 63291 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} 0.0086 nmol olarak bulunmuştur. K_a değeri bağlanma bölgelerindeki afinitenin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir.

3.3.2. Guanozin baskılanmış QCM elektrodun seçiciliği

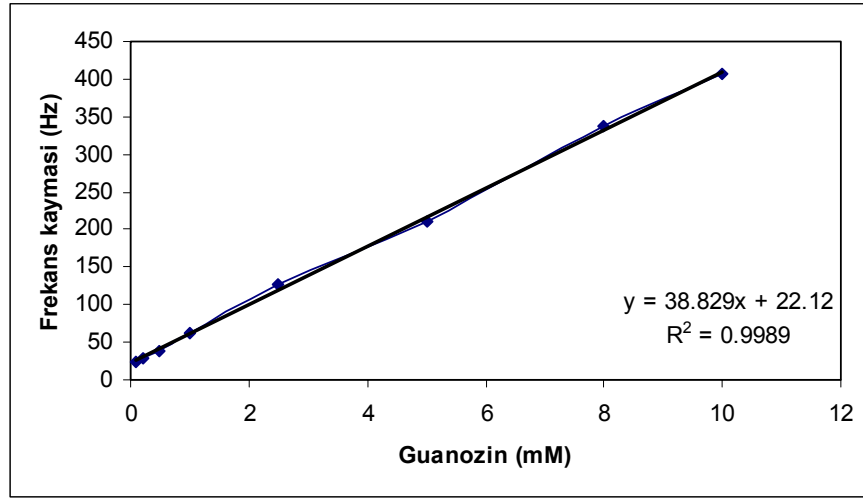
Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için guanozin ile benzer yapıya sahip olan adenozinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelenmiştir. Şekil 3.24'de adsorpsiyon izotermelerinde görüldüğü gibi frekanstaki değişim guanozin, ve adenozin konsantrasyonları ile direkt orantılıdır. Adsorpsiyon izotermelerinden guanozin için eğimdeki azalma -27 Hz mmol^{-1} , ve adenozin için -5 Hz mmol^{-1} olarak elde edilmiştir. Guanozin baskılı QCM'in seçicilik katsayısı adenozin için 5.4 (27/5) olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlerden görüldüğü gibi MAH-Pt-Gz kompleksinin guanozin için seçicilik katsayısı adenozine göre yüksektir. Bu sonuçlar guanozinin metal iyonları ile şelat oluşturabilmesi ve boyut olarakta elde edilen kaviteye tam uyum göstermesi ile açıklanabilir.



Şekil 3.24. Guanozin ve adenozin için QCM sensör verileri

3.3.3. Guanozin baskılanmış QCM elektrodun analitik performansı

Şekil 3.25’de guanozin baskılı kuartz kristalin guanozin derişim değerlerine karşı frekans kayması değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği görölmektedir. Guanozinin 0.01 ve 10 mM derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir ve guanozin baskılı kuartz kristalin tayin sınırı 0.01 mM’dır. Guanozin derişimi arttıkça frekans değerlerinin de arttığı görölmüştür ve elde edilen doğru eğimi 38 Hz mmol^{-1} olarak bulunmuştur. Deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.

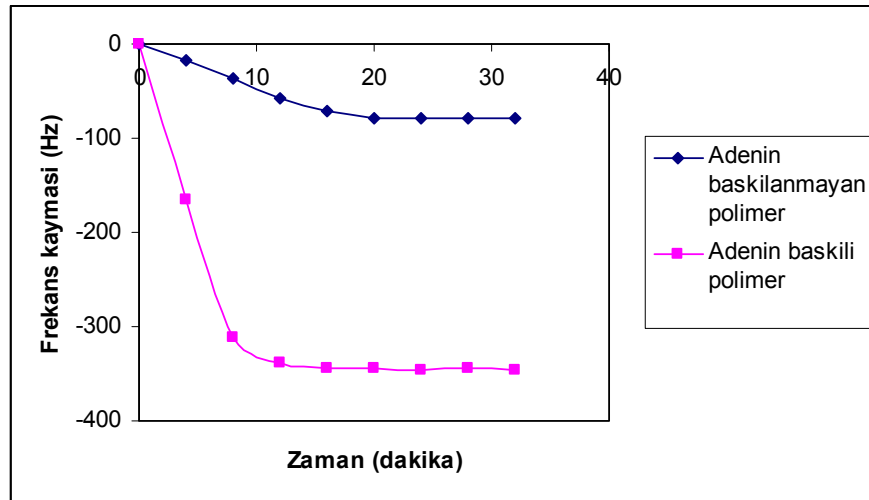


Şekil 3.25. Guanozin sensör için kalibrasyon grafiği

3.3.4. Ligand etkileşimi aracılığıyla adenin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü

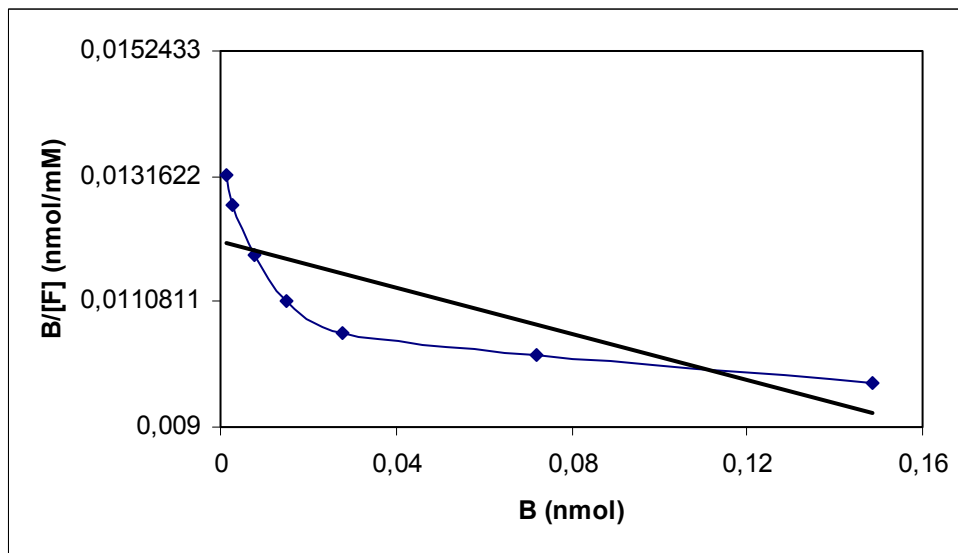
Altın kuartz kristaller üzerine adenin baskılı MAC-Hg(II)-Ad polimerinin adenin seçiciliği incelenmiştir. Hedef molekülün metakroil temelli metal-şelat kopolimerine bağlanması Souerbrey eşitliği ile hesaplanmıştır.

Fosfat tamponu içinde baskılı polimer kaplı sensörün frekansı kararlı hale geldiği zaman adenin çözeltisi dedektör hücresinin üzerine damlatılmıştır. Adenin çözeltisi ilave edildikten sonra sensörün frekansı azalmıştır ve 15 dakika içinde sabit bir değere ulaşmıştır (Şekil 3.26). Elde edilen frekans değişimleri kuartz kristal üzerindeki baskılanmış polimere adenin moleküllerinin tutunduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra baskılanmamış polimere adenin bağlanmasının çok daha zayıf olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.26. Adenin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri

Baskılı polimer ve adenin kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiştir.



Şekil 3.27 Adenin baskılı polimerin Scatchard eğrisi

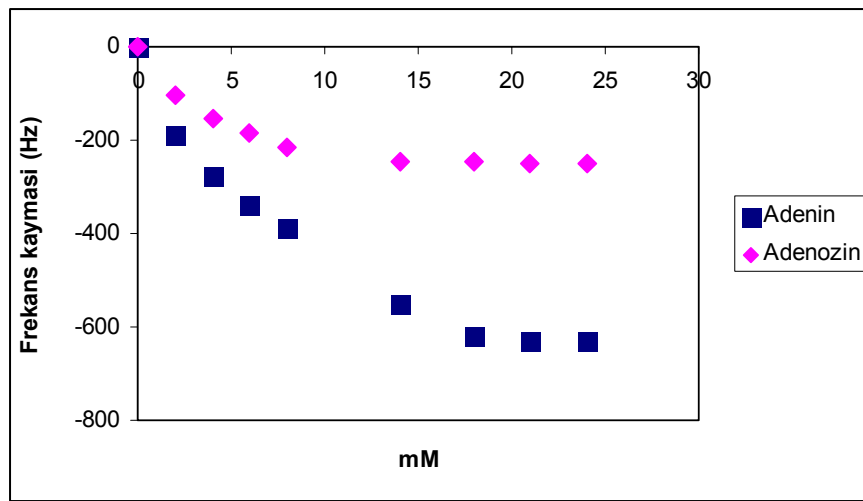
Şekil 3.27'de 0.1-20 mM aralığındaki adenin çözeltisinin Scatchard grafiği görülmektedir. Bu aralık içindeki elde edilen Scatchard regresyon eşitliği

$$\frac{B}{[F]} = -0.0000191 B + 0.0121 \quad (3.14)$$

Eşitlik 8.14'den MIP sensöre adenin bağlanması için bağlanma sabiti (K_a) 52356 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{max} 0.0121 nmol olarak bulunmuştur. K_a değeri bağlanma bölgelerindeki afinitenin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir.

3.3.5. Adenin baskılanmış QCM elektrodun seçiciliği

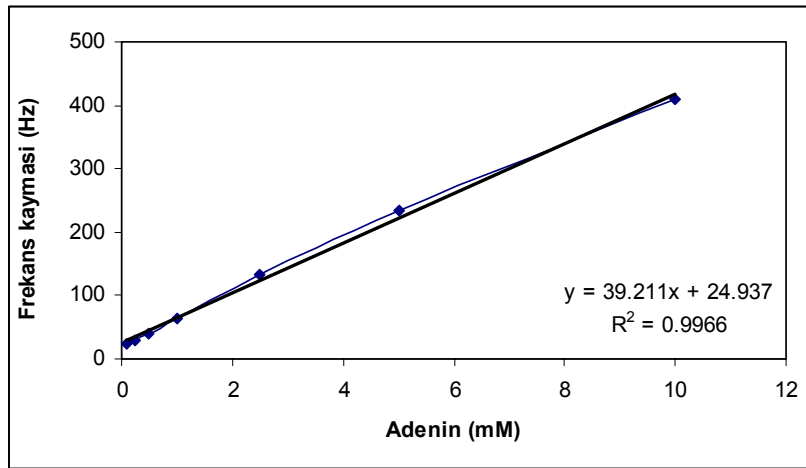
Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için adenin ile benzer yapıya sahip olan adenzinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelenmiştir. Şekil 3.28'de adsorpsiyon izotermelerinde görüldüğü gibi frekanstaki değişim adenin, ve adenzin konsantrasyonları ile direk orantılıdır. Adsorpsiyon izotermelerinden adenin için eğimdeki azalma -24 Hz mmol^{-1} , ve adenzin için -8 Hz mmol^{-1} olarak elde edilmiştir. Adenin baskılı QCM'in seçicilik katsayısı adenzin için 3.0 ($24/8$) olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlerden görüldüğü gibi MAC-Hg-Ad kompleksinin adenin için seçicilik katsayısı adenzine göre yüksektir. Bu sonuçlar adeninin metal iyonları ile şelat oluşturabilmesi ve boyut olarakta elde edilen kaviteye tam uyum göstermesi ile açıklanabilir.



Şekil 3.28. Adenin ve adenzin için QCM sensör verileri

3.3.6. Adenin baskılanmış QCM elektrodun analitik performansı

Şekil 3.29’da adenin baskılı kuartz kristalin adenin derişim değerlerine karşı frekans kayması değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiği görölmektedir. Adenin 0.01 ve 10 mM derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir ve adenin baskılı kuartz kristalin tayin sınırı 0.01 mM olarak bulunmuştur. Adenin derişimi arttıkça frekans değerlerinin de arttığı görölmüştür ve elde edilen doğru eğimi 39 Hz mmol^{-1} olarak bulunmuştur. Deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.



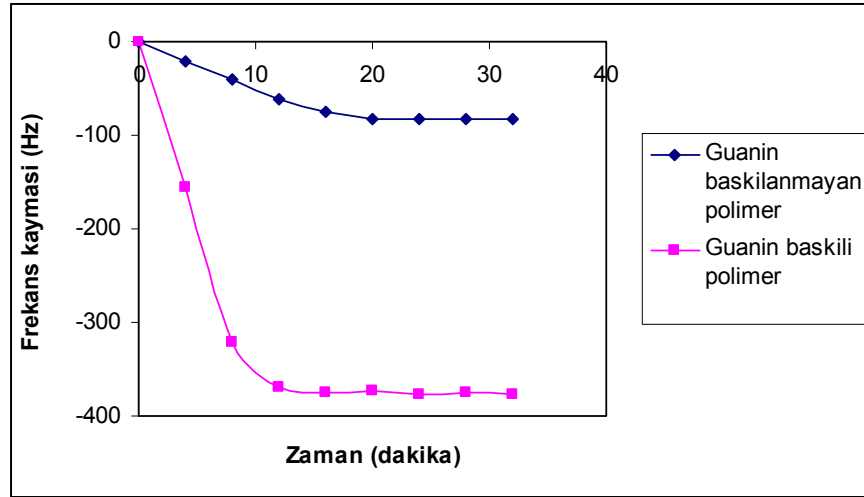
Şekil 3.29. Adenin sensör için kalibrasyon grafiği

3.3.7. Ligand etkileşimi aracılığıyla guanin baskılı QCM sensörlerin bağlama etkileşimlerinin ölçümü

Guanin baskılı MAH-Pt(II)-Gu polimerinin guanin seçiciliği incelenmiştir. Hedef molekülün metakroil temelli metal-şelat kopolimerine bağlanması Souerbrey eşitliği ile hesaplanmıştır.

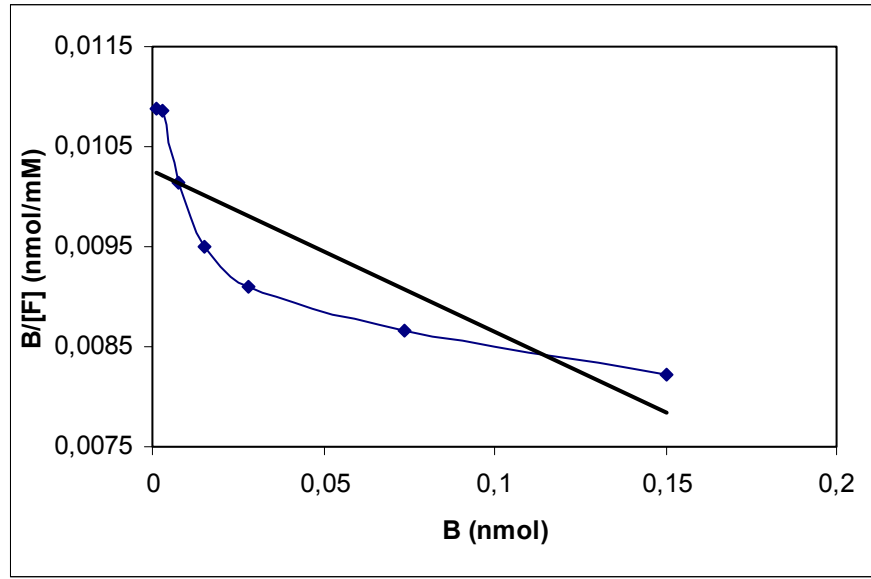
Fosfat tamponu içinde baskılı polimer kaplı sensörün frekansı kararlı hale geldiği zaman guanin çözeltisi dedektör hücresinin üzerine damlatılmıştır. Guanin

çözeltisi ilave edildikten sonra sensörün frekansı azalmıştır ve 15 dakika içinde sabit bir değere ulaşmıştır (Şekil 3.30). Frekans değişimleri kuartz kristal üzerindeki baskılanmış polimere guanin moleküllerinin tutunduğunu göstermiştir. Bunun yanı sıra baskılanmamış polimere guanin bağlanmasının çok daha zayıf olduğu gözlenmiştir.



Şekil 3.30. Guanin baskılı ve baskısız sensörün frekans değerleri

Baskılı polimer ve guanin kalıp arasındaki bağlanma etkileşimleri ve eşitlikleri Scatchard analizi yöntemi ile elde edilmiştir.



Şekil 3.31. Guanin baskılı polimerin Scatchard eğrisi

Şekil 3.31’de 0.1-20 mM aralığındaki guanin çözeltisinin Scatchard grafiği görülmektedir. Bu aralık içindeki elde edilen Scatchard regresyon eşitliği

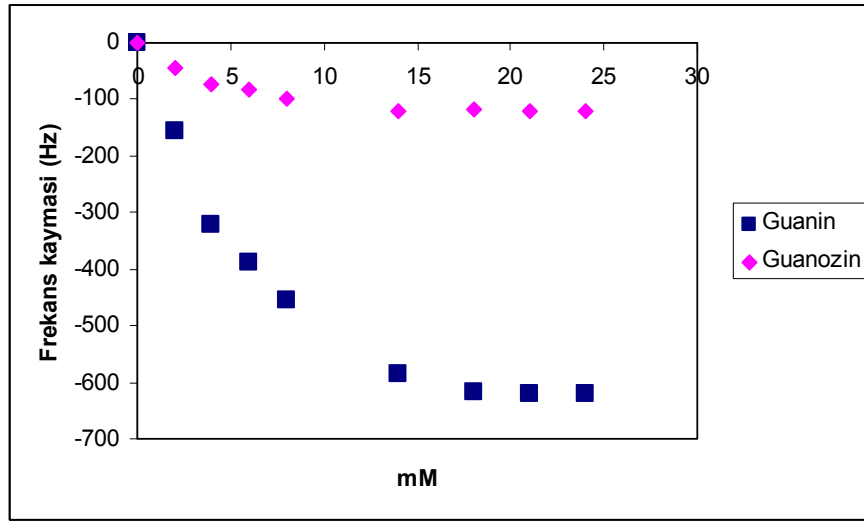
$$\frac{B}{[F]} = -0.0000161 B + 0.0103 \quad (3.15)$$

Eşitlik 3.15’ten MIP sensöre guanin bağlanması için bağlanma sabiti (K_a) 62112 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} 0.0103 nmol olarak bulunmuştur. K_a değeri bağlanma bölgelerindeki afinitenin oldukça güçlü olduğunu göstermektedir.

3.3.8. Guanin baskılanmış QCM elektrodun seçiciliği

Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için guanin ile benzer yapıya sahip olan guanozinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelenmiştir. Şekil 3.32’de adsorpsiyon izotermelerinde görüldüğü gibi frekanstaki değişim guanin, ve guanozin konsantrasyonları ile direk orantılıdır. Adsorpsiyon izotermelerinden guanin için eğimdeki azalma -27 Hz mmol^{-1} , ve

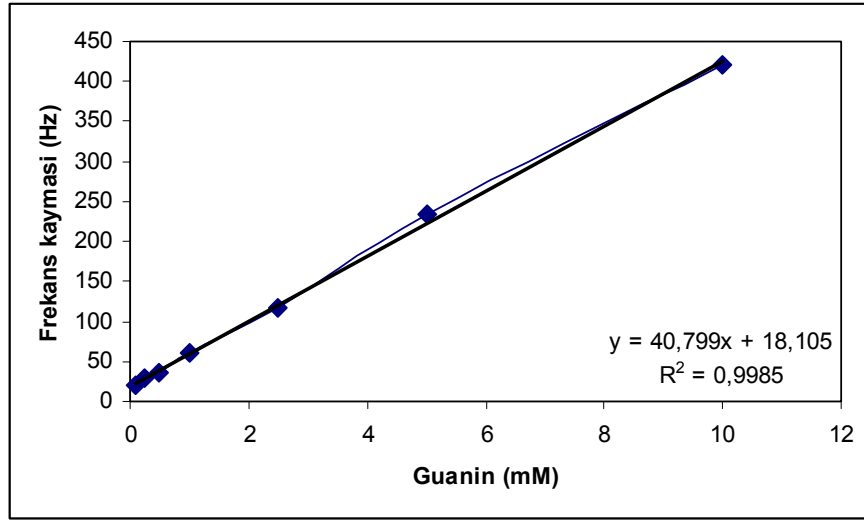
guanozin için -5 Hz mmol^{-1} olarak elde edilmiştir. Guanin baskılı QCM'in seçicilik katsayısı guanozin için 5.4 (27/5) olarak bulunmuştur. Elde edilen değerlerden görüldüğü gibi MAH-Pt-Gu kompleksinin guanin için seçicilik katsayısı guanozine göre yüksektir. Bu sonuçlar guaninin metal iyonları ile şelat oluşturabilmesi ve boyut olarakta elde edilen kaviteye tam uyum göstermesi ile açıklanabilir.



Şekil 3.32. Guanin ve guanozin için QCM sensör verileri

3.3.9. Guanin baskılanmış QCM elektrodun analitik performansı

Şekil 3.33'de guanin baskılı kuartz kristalin guanin derişim değerlerine karşı frekans kayması değerlerinden elde edilen kalibrasyon grafiğı görülmektedir. Guaninin 0.01 ve 10 mM derişim aralığında doğrusal bir grafik elde edilmiştir ve guanin baskılı kuartz kristalin tayin sınırı 0.01 mM'dır. Guanin derişimi arttıkça frekans değerlerinin de arttığı görülmüştür ve elde edilen doğru eğimi 59 Hz mmol^{-1} olarak bulunmuştur. Deneyler en az üç kez tekrar edilmiştir. Her bir veri seti için ortalama değerler ve standart sapmayı hesaplamak üzere standart istatistiksel yöntemler uygulanmıştır. Güven aralığı % 95 tutulmuştur.

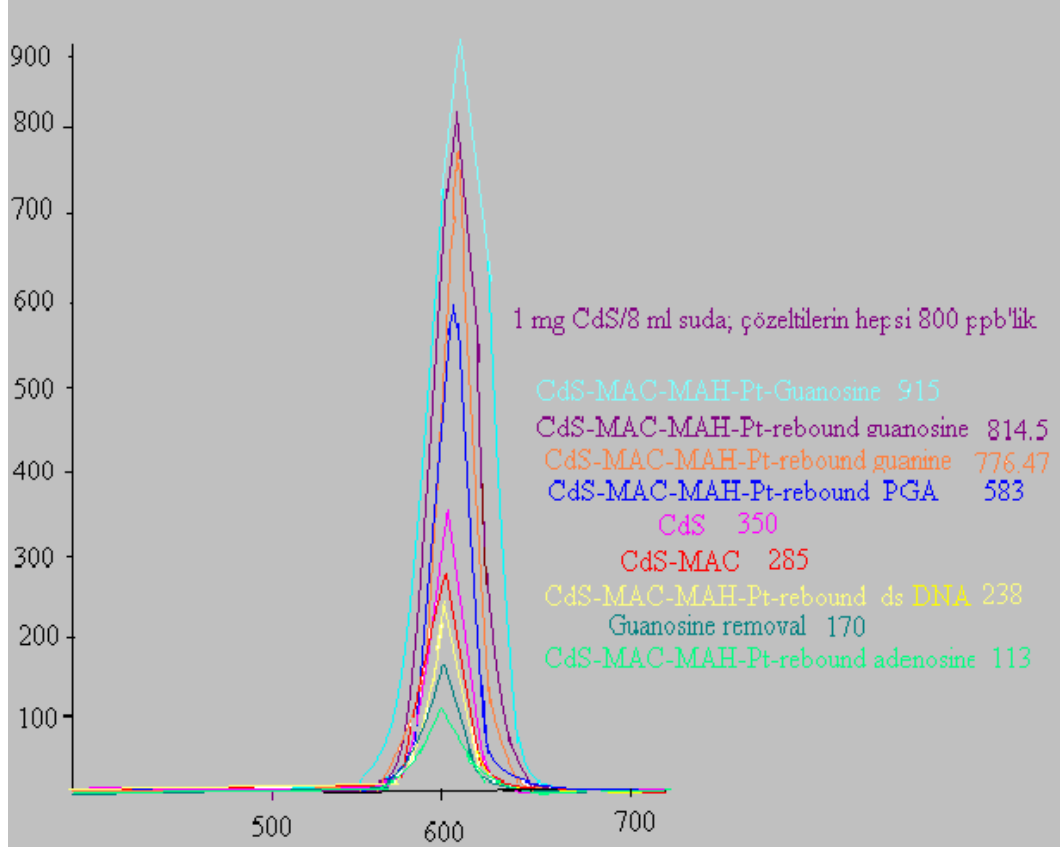


Şekil 3.33. Guanin sensör için kalibrasyon grafiği

3.4. Moleküler Baskılı Nanokabuk Sensörlerin Etkinliği

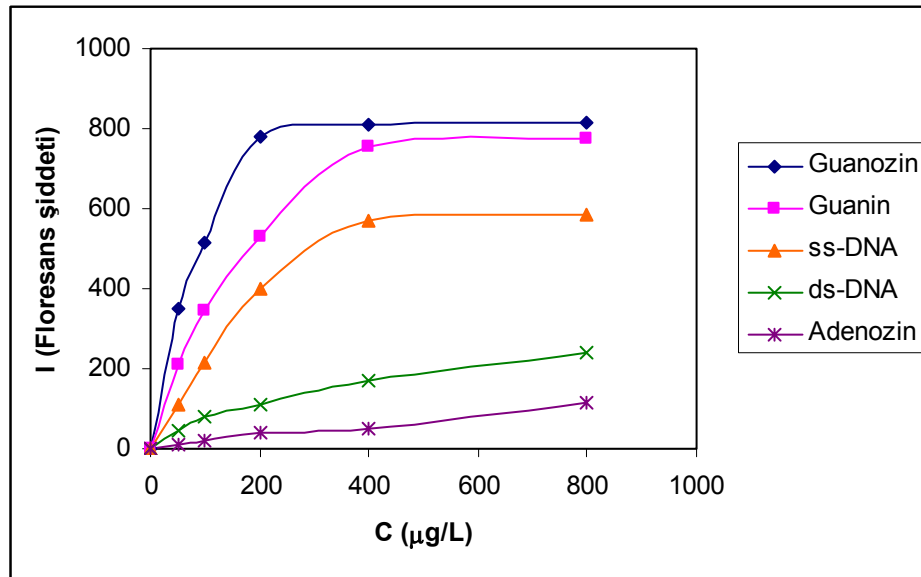
CdS nanokabuk sensörler ile guanozin, guanin, ss-DNA, ds-DNA ve adeninin bağlanma ve sentetik reseptör seçicilik çalışmaları floresans spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan CdS nanokristallerin, MAC ile kaplanmış CdS nanokristallerin, kaplı nanokristallerin MAH-Pt-Gz ile polimerleştirilmesinden sonra hazırlanmış guanozin baskılı polimerlerin ve bu polimerlere substratların adsorpsiyonu sonucu floresans şiddetinin değişimi Şekil 3.34'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi CdS nanokristallerin 600 nm'deki floresans şiddeti yapıya kalıp molekül olan guanozinin bağlanması sonucunda artmıştır. Hazırlanan polimer yapısından bağlanan guanozinin uzaklaştırılmasından sonra floresans şiddeti 170 I değerine düşmekte ve sonra tekrar kullanılabilirlik açısından değerlendirmek için guanozin bağlanma çalışmasında ise floresans şiddeti 815 I'ya yükselmektedir. Aynı zamanda hazırlanan nanosensörlerin floresans şiddeti guanin ve ss-DNA (poliguaninik asit, PGA) bağlanmasıyla sırasıyla 814 ve 583 I'ya artmaktadır. Sonuç olarak diyebiliriz ki çapraz bağlı nano kabuk polimer matriksinin spesifik tanıma bölgelerine guanozin, guanin ve ss-DNA bağlanması sonucunda CdS

nanokristallerin fotoluminesans emisyonu artmakta ve bu nedenle floresans şiddetinde belirgin bir artış olmaktadır.



Şekil 3.34. Nanokristallerin 600 nm'deki floresans şiddetindeki değişim

Şekil 3.35'den görüldüğü gibi çapraz bağlı polimer yapısındaki spesifik bağlanma bölgeleri ile guanozin, guanin ve ss-DNA'nın etkileşimi sonucu artan substrat konsantrasyonu ile floresans şiddetinde artış olmaktadır.



Şekil 3.35. Guanozin baskılı CdS nanosensörün guanozin ve diğer substratlara ilişkin floresans şiddetine bağlı adsorpsiyon izotermleri

Konsantrasyona bağlı floresans şiddeti değişimi guanozin ve guaninin 400 µg/L konsantrasyonunda maksimum değere ulaşmıştır. Ayrıca çizilen adsorpsiyon izotermlerinden görüldüğü gibi guanozin baskılı nanokristaller adenozine karşı afinite göstermemekte ve floresans şiddetinde önemli bir değişim olmamaktadır. Guanozin, guanin ve ss-DNA başlangıç konsantrasyonunun artmasıyla floresans şiddetide artmaktadır. Literatürde ilk defa yapılan bir yaklaşımla guanozin baskılı CdS nanosensörlerin guanozin ve diğer substratlara ilişkin afinite sabitleri Scatchard analizi (Tsoi ve ark 2000; Yang ve ark. 2006) ve Langmuir izoterm (Persson ve ark. 1997) yöntemleri kullanılarak belirlenmiştir.

Guanozin ve CdS nanosensörler arasındaki bağlanma denklemi 3.16 eşitliğinde verilmiştir.



Bu eşitlikte;

- Gz : çözültideki guanozin ve benzer yapıdaki substratları
 KNS : guanozin baskılı kuvantum nanosensörleri
 Gz-KNS : guanozin ve nanokristaller arasındaki kompleks yapıyı göstermektedir.

Bu denkleme ait Scatchart eşitliği 3.17'de verilmiştir.

$$\frac{I}{C_0} = \frac{I_{maks}}{K_D} - \frac{I}{K_D} \quad (3.17)$$

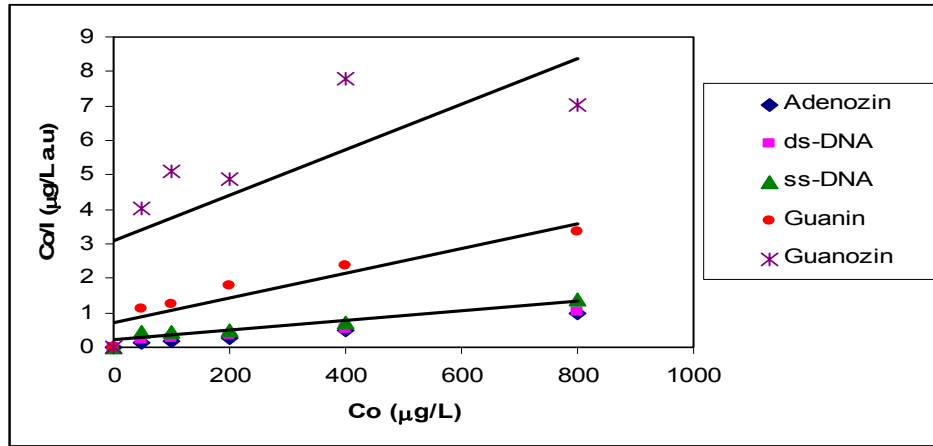
Bu eşitlikte;

- K_D : ayrışma sabitini
 I : floresans şiddetini
 I_{maks} : maksimum floresans şiddetini
 C_0 . konsantrasyonu göstermektedir.

Floresans şiddetinin I/C_0 'ye karşı grafiğe geçirilmesi sonucu elde edilen doğru eğiminden her bir substrat için afinite sabitleri (K_A) hesaplanmıştır. Ayrıca bulunan afinite sabitlerinin karşılaştırılması için eşitlik 3.19'da verilen Langmuir izoterm denklemi kullanılmıştır.

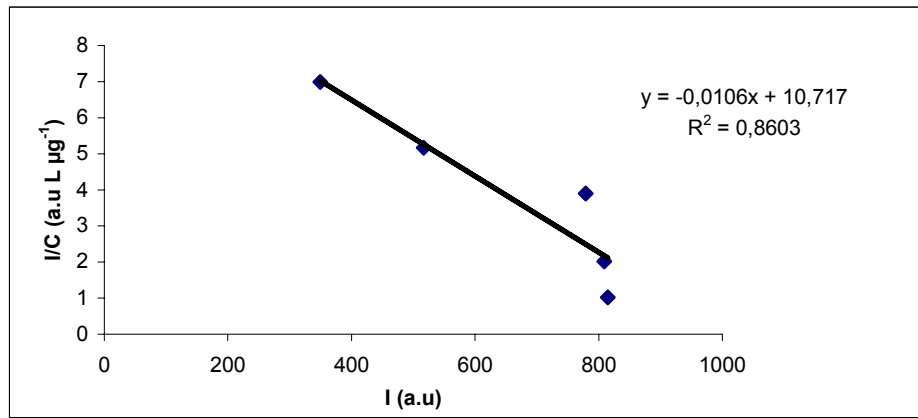
$$\frac{C_0}{I} = \frac{1}{I_{maks}} b + \frac{C_0}{I_{maks}} \quad (3.19)$$

Guanozin baskılı CdS nanosensörlerin Langmuir adsorpsiyon analizine ilişkin doğrular Şekil 3.36'da verilmiştir.



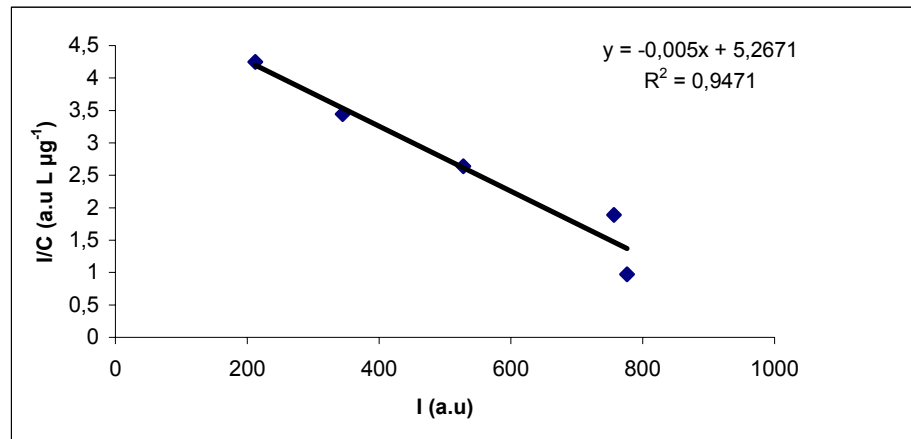
Şekil 3.36. CdS nanokristallerin Langmuir adsorpsiyon analizi

Şekil 3.37 a,b,c,d ve e'de guanozin baskılı nanosensörlere sırasıyla guanozin, guanin, ss-DNA, ds-DNA ve adenozinin Scatchard analizine ilişkin doğrular verilmiştir.

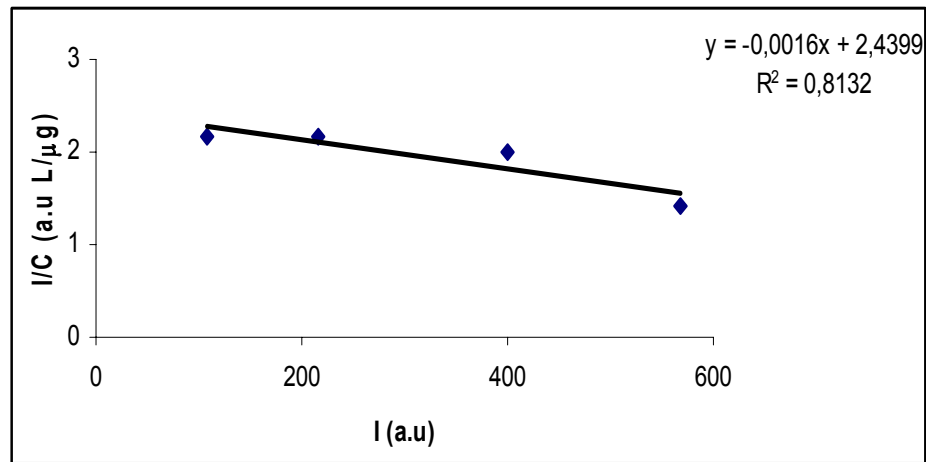


(a)

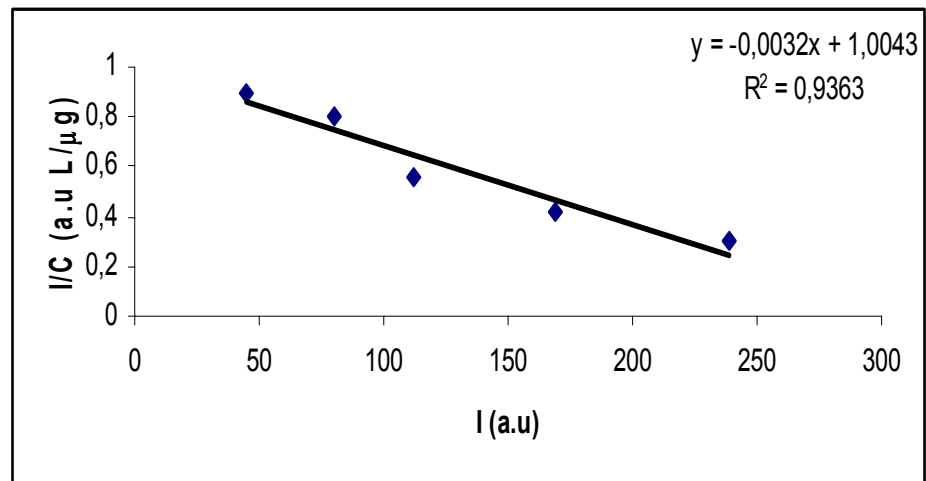
Şekil 3.37. CdS nanokristallere (a) guanozin, (b) guanin, (c) ss-DNA, (d) ds-DNA ve (e) adenozinin Scatchard analizleri



(b)

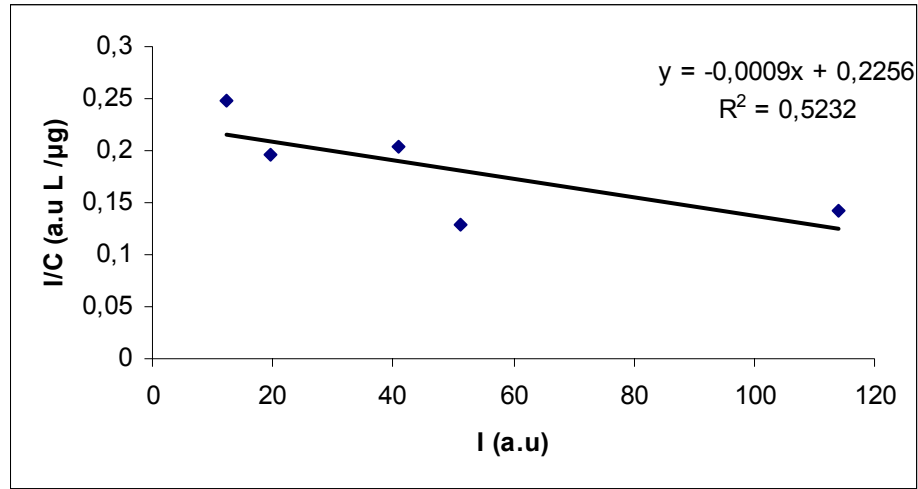


(c)



(d)

Şekil 3.37. (Devam) CdS nanokristallere (a) guanozin, (b) guanin, (c) ss-DNA, (d) ds-DNA ve (e) adenozinin Scatchard analizleri



(e)

Şekil 3.37. (Devam) CdS nanokristallere (a) guanozin, (b) guanin, (c) ss-DNA, (d) ds-DNA ve (e) adenozinin Scatchard analizleri

Çizelge 3.4. Guanozin baskılı nanokristallerin Langmuir ve Scatchard analizlerinin karşılaştırılması

Molekül	Langmuir, K_A L/µg	I_{maks} (a.u)	Scatchard, K_A L/ µg	I_{maks} (a.u)
Guanozin	1.71×10^{-2}	909.1	1.06×10^{-2}	1011
Guanin	5.92×10^{-3}	1000	5.0×10^{-3}	1053
ss-DNA	3.81×10^{-3}	833.3	1.6×10^{-3}	1525
ds-DNA	2.86×10^{-3}	333.3	3.2×10^{-3}	313.8
Adenozin	8.82×10^{-4}	250.0	0.9×10^{-3}	250.7

Gerek Langmuir gerekse Scatchard yaklaşımı kullanılarak yapılan hesaplamalara ilişkin bulunan afinite sabitleri Çizelge 3.4'te karşılaştırılmıştır. Scatchard analizi ile bulunan K_A ve I_{maks} değerleri Langmuir analizi ile bulunan verilere oldukça yakındır ve nanokristallerin guanozin tanıma bölgeleri guanozine oldukça seçicidir. Antibadilerin bağlanma sabitlerinin 10^7 - 10^8 M^{-1} olduğu düşünüldüğünde (Blake ve ark. 1996, Yagisawa ve ark. 1986) sentezlediğimiz guanozin bellekli sentetik nanoreseptörlerin guanozin ve guanini 10^6 M^{-1} değerlerinde seçici bağlaması nanokabuklarda etkin ve her bir bağlanma bölgesine

tek bir molekülün bağlandığı homojen bir sentetik antibadi oluşturduğumuz söylenebilir.

Guanozin baskılanarak hazırlanan polimerlerde oluşturulan kavite guanozin ve analoglarına oldukça yüksek bir seçiciliğe sahiptir. Ayrıca çeşitli nükleotit oligomerleri için guanin yapısındaki N ile platin arasında oldukça yüksek bir afinite olduğu bulunmuştur. (Kaim ve Schwederski 1994) Guanozin, Pt(II) metal iyonu ile şelat oluşturabilmektedir. Bu nedenle Pt(II) iyonları ve boş koordinasyon küreleri arasındaki etkileşim hazırlanan guanozin baskılı polimerlerde ve CdS nanokristallerde de etkilidir. Yapılan çalışmalar sonucunda platin ve guanozin yapısındaki O ve N atomlarıyla boyut seçici kavitenin afinite sabitinin $4.841 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, serbest guanin bazıyla $0.894 \cdot 10^6 \text{ M}^{-1}$, tek sarmal DNA (ss-DNA) ile $3.81 \cdot 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{g}$ ve çift sarmal DNA (ds-DNA) ile $2.86 \cdot 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{g}$ olduğu bulunmuştur. ss-DNA yapısındaki guanozin ile platin arasındaki etkileşim için bulunan afinite sabiti ds-DNA etkileşiminin afinite sabitinden daha büyüktür. Çünkü platin ile DNA zinciri üzerindeki iki komşu guanozin nükleotidinin N atomları arasındaki etkileşimi ds-DNA guanozinleri arasındaki etkileşimden daha güçlüdür (Kaim ve Schwederski 1994).

4. TARTIŞMA, SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada MAH-Pt(II)-Guanozin , MAC-Hg(II)-Adenin ve MAH-Pt(II)-Guanin ön organize monomer sistemlerini kullanarak SPR ve QCM biyosensör çiplerin hazırlanması ile DNA'nın bağlantı bölgelerini tanıyan belleklerin SPR çip ve QCM elektrot yüzeyinde oluşturularak kendi organize olabilen SPR çiplerin ve QCM elektrotların DNA tayininde kullanılması ve tasarlanılan moleküler baskılanmış (MIP) malzemelerin moleküler tanımlama açısından değerlendirilmesi çalışmaları ve guanozin belleklerle donatılan nanokabuklara sahip CdS kuvantum nokta nanosensörlerin hazırlanması ile DNA tanıma bölgeleri açısından değerlendirilmesi çalışmaları yapılmıştır.

MAC monomerinin karakterizasyonu için iki farklı çözücüde (DMSO-D₆ ve D₂O) ¹H-NMR spektrumları alınmıştır. Karakteristik pikler şu şekildedir; 7.67-7.36 ppm arasındaki pikler -SH ve -NH protonlarına ait olup suda bu piklerin gözlenmemesi hareketli proton olmalarından kaynaklanmaktadır. 5.67 ve 5.31 ppm de etilen protonları gözlenmiştir. 4.16 ppm'de -CH, 1.88 ppm'de -CH₃ pikleri gözlenmiştir MAC monomerinin FTIR spekturumundan MAC yapısında bulunan karbonil gruplarının ağırlıklı 1615 cm⁻¹'de, bağlı N-H gerilmelerinin 3414 cm⁻¹'de, C-S gerilmelerinin ise 706 ve 622 cm⁻¹'de band oluşturduğu bulunmuştur.

MAC monomeri ve Hg (II) arasındaki kompleks oluşumu FTIR ve RAMAN spektroskopisi ile karakterize edilmiştir. MAC monomerinin FTIR spektrumunda 1612 cm⁻¹ ve 2541 cm⁻¹ de -COO⁻ asimetric gerilmesine ve -SH gerilmesine ait titreşim bantları elde edilmiştir. MAC ve Hg(II) arasındaki kompleks oluşumu sonucunda -SH gerilme titreşim bantı 2541 cm⁻¹'den 2551 cm⁻¹'e kaymıştır.

MAH monomerinin yapısının belirlenmesinde ¹H-NMR kullanılmıştır. ¹H-NMR spektrumunda MAH'da bulunan gruplara ait karakteristik pikler elde edilmiştir. Bu karakteristik pikler: ¹H-NMR (CDCl₃): 1.99 (t; 3H, J=7.08 Hz, CH₃), 1.42 (m; 2H, CH₂), 3.56 (t; 3H, -OCH₃), 4.82-4.87 (m; 1H, metin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (d; 1H, J=7.4 Hz, NH), 7.82 (d; 1H, J=8.4 Hz, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik) olarak bulunmuştur. MAH-Pt(II) monomeri

FTIR ile karakterize edilmiştir. FT-IR spektrumu incelendiğinde MAH yapısına ait karakteristik karbonil bandları 1653 ve 1629 cm^{-1} 'de, amid II gerilme titreşim bandı ise 1529 cm^{-1} 'de görülmektedir. Ayrıca Pt-N titreşimine ait bandlar 552 ve 441 cm^{-1} 'de görülmektedir ki bu Pt(II) iyonlarının MAH yapısına koordine olduğunu göstermiştir. Bu spektrum hedef metal-şelat monomer yapının sentezlendiğini göstermektedir. Ayrıca MALDI-TOF-MS ile yapılan aydınlatma çalışmaları kapsamında; kütle analizleri pozitif reflektör modunda 2,5-dihidroksibenzoik asit ve α -Cyano-4-hidroksisinnamik acid matriksleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kütle spektrumlarından görüleceği üzere MAH-Pt-(H₂O)₂ metal-şelat oluşumu 443 ile başlayan m/e değerlerinden de ortaya konulmuştur. Kütle spektrumlarında 415-417 arasında görülen pikler de platinin izotoplarını da içine alacak şekilde MAH-Pt oluşumunu desteklemiştir.

Metakrilamidosisitein ile aktive edilmiş CdS nanopartiküllerin ve guanozin baskılı nanosensörlerin kalıp uzaklaştırılmadan önce ve sonra ¹³C CP-MAS NMR spektrumları alınmıştır. CdS nanokristallere ait spektrumda sistein yapısındaki karbonil grubuna ait pik 194.4 ppm'de, metakroil yapısındaki karbonil grubuna ait pik ise 198 ppm'de, metakroil yapısındaki metin ve metilen karbonlarına ait pikler sırasıyla 60.9 ve 73.8 ppm de, sistein yapısında bulunan karbon atomları içinse 38.2 ppm ve 50 ppm'de pikler eldedilmiştir. Guanozin baskılı CdS nanokristallere ait NMR spektrumunda polimerizasyon sonrasında yapıya bağlanan histidin grupları nedeniyle 60.9 ve 73.8 ppm'deki pikler kaybolmuştur. Ayrıca spektrumda 66.3 ve 79.4 ppm'de histidin yapısındaki karbon atomlarına ait pikler ve 88-82.1 ppm'de guanozin yapısındaki C4', C1' ve C3' pikleri elde edilmiştir. Kalıp molekül olan guanozinin yapıdan uzaklaştırılmasından sonra alınan NMR spektrumunda ise. guanozin molekülünün yapıdan uzaklaştırılması ile 88-82 ppm sinyalleri kaybolmuştur. Ayrıca MAC yapısındaki tiol gruplarına ait 41.7 ppm ve MAH-Pt yapısına ait 81-66 ppm sinyalleri CdS nanosensörlerin kararlılığını koruduğunu göstermektedir. Ayrıca MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin ve guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce ve uzaklaştırıldıktan sonra CdS nanopartiküllerin TEM görüntülerinden MAC ile kaplanmış CdS nanopartiküllerin küresel formda ve ortalama 35 nm boyutta olduğu bulunmuştur. CdS nanopartiküllerin guanozin kalıp uzaklaştırılmadan önce alınan TEM görüntüsünde ise nanopartiküllerin

küresel formda ve ortalama 46 nm boyutta oldukları,. CdS nanopartiküllerin metanolik KOH ile yıkanarak guanozin kalıbın uzaklaştırılmasından sonra alınan TEM görüntüsünde ise nanopartiküllerin küresel şeklini koruduğu ve ortalama 45 nm boyutta oldukları bulunmuştur.

Guanozin, adenin ve guanin baskılı polimerler ile yapılan SPR ölçümleri sonucunda MAH-Pt(II)-Gz monomeriyle guanozin baskılamanın sonuç verdiği ve belleklerle guanozinin (66382 1/M), guaninin (59463 1/M), ss-DNA'nın (35908 1/M) ve ds-DNA'nın (12511 1/M) guanin ayağından etkileşime girdiği, MAC-Hg(II)-Ad monomeriyle adenin baskılamanın sonucunda belleklerle adeninin (52326 1/M), adenozinin (49981 1/M) ve ds-DNA'nın (15182 1/M) adenin ayağından etkileşime girdiği ve MAH-Pt(II)-Gu monomeriyle guanin baskılama sonucunda elde edilen belleklerle guaninin (65827 1/M), guanozinin (61548 1/M), ss-DNA'nın (37206 1/M) ve ds-DNA'nın (14368 1/M) oldukça yüksek seçicilikle etkileşime girdiği bulunmuştur.

Guanozin, adenin ve guanin baskılı polimerler ile QCM ölçümleri sonucunda guanozin baskılı MIP sensöre guanozin bağlanması için bağlanma sabiti (K_a) 63291 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} 0.0086 nmol olarak bulunmuştur. Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için guanozin ile benzer yapıya sahip olan adenozinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelendiğinde adsorpsiyon izotermelerinden guanozin için eğimdeki azalma -27 Hz mmoL^{-1} , ve adenozin için -5 Hz mmoL^{-1} olarak elde edilmiştir. Guanozin baskılı QCM elektrodun seçicilik katsayısı adenozin için 5.4 (27/5) olarak bulunmuştur. Adenin baskılı MIP sensöre adenin bağlanması için bağlanma sabiti (K_a) 52356 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} 0.0121 nmol olarak bulunmuştur. Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için adenin ile benzer yapıya sahip olan adenozinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelendiğinde adsorpsiyon izotermelerinden adenin için eğimdeki azalma -24 Hz mmoL^{-1} , ve adenozin için -8 Hz mmoL^{-1} olarak elde edilmiştir. Adenin baskılı QCM elektrodun seçicilik katsayısı adenozin için 3.0 (24/8) olarak bulunmuştur. Guanin baskılı MIP sensöre guanin bağlanması için bağlanma sabiti

(K_a) 62112 M^{-1} ve ligand-değişim bölgelerinin sayısı, B_{\max} 0.0103 nmol olarak bulunmuştur. Kalıp molekül ve MIP-QCM sensörün metal-şelat bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşiminin seçiciliğinin anlaşılması için guanin ile benzer yapıya sahip olan guanozinin baskılı kuartz kristal sensör üzerine adsorpsiyonları incelendiğinde adsorpsiyon izotermelerinden guanin için eğimdeki azalma -27 Hz mmoL^{-1} , ve adenozin için -5 Hz mmoL^{-1} olarak elde edilmiştir. Guanin baskılı QCM elektrodun seçicilik katsayısı guanozin için $5.4 (27/5)$ olarak bulunmuştur.

CdS nanokabuk sensörler ile guanozin, guanin, ss-DNA, ds-DNA ve adeninin bağlanma ve sentetik reseptör seçicilik çalışmaları floresans spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Konsantrasyona bağlı floresans şiddeti değişiminin guanozin ve guaninin $400 \mu\text{g/L}$ konsantrasyonunda maksimum değere ulaştığı ve çizilen adsorpsiyon izotermelerinden guanozin baskılı nanokristallerin adenezine karşı afinite göstermediği bulunmuştur. Ayrıca Langmuir ve Scatchard yaklaşımı kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda bulunan afinite sabitleri karşılaştırılmıştır. Scatchard analizi ile bulunan K_A ve I_{\max} değerleri (Guanozin için 1.06×10^{-2} , guanin için 5.0×10^{-3} , ss-DNA için 1.6×10^{-3} , ds-DNA için 3.2×10^{-3} ve adenozin için $0.9 \times 10^{-3} \text{ L}/\mu\text{g}$) Langmuir analizi ile bulunan verilere (Guanozin için 1.71×10^{-2} , guanin için 5.92×10^{-3} , ss-DNA için 9.81×10^{-3} , ds-DNA için 2.86×10^{-3} ve adenozin için $8.82 \times 10^{-4} \text{ L}/\mu\text{g}$) oldukça yakındır.

KAYNAKLAR

- Aktipis, S. (1992), *DNA: The Replicative Process and Repair*. Devlin, T.M. In: Textbook of Biochemistry., Wiley-Liss, 3rd ed., New York, 607-680.
- Alivisatos, A.P. (1996), "Semiconductor clusters, nanocrystals, and quantum dots," *Science*, **271**, 933-937.
- Alivisatos, A.P. (1996), "Semiconductor nanocrystals: New materials through control of size," *Abstracts Of Papers Of The American Chemical Society*, **212**, Part 1
- Andersson, L.I. (2000), "Molecular imprinting for drug bioanalysis A review on the application of imprinted polymers to solid phase extraction and binding assay," *J. Chromatography. B.*, **739**, 163-173.
- Andersson, L.I., Mandenius, C.F. ve Mosbach, K. (1988), "Studies on guest selective molecular recognition on an octadecyl silylated silicon surface using ellipsometry," *Tetrahedron Letters*, **29**, 5437-5440.
- Andersson, L.I., Nicholls, I.A. ve Mosbach, K. (1994), "Molecular imprinting a versatile technique for the preparation of separation materials of predetermined selectivity," *Highly Selective Separations in Biotechnology*, **9**, 207-224.
- Antolini, F., Ghezelbash, A., Esposito, C., Trave, E., Tapfer, L. ve Korgel, B.A. (2006), "Laser-induced nanocomposite formation for printed nanoelectronics," *Materials Letters*, **60**, 1095-1098.
- Arya, H., Kaul, Z., Wadha, R., Taira, K., Hirano, T. ve Kaul, S.C. (2005), "Quantum dots in bio-imaging: Revolution by the small," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **329**, 1173-1777.
- Behling, C., Luucklum, R. ve Hauptmann, P. (1998), "Response of quartz crystal resonators to gas and liquid analyte exposure," *Sensors and Actuators A*, **68**, 388-398.
- Blake, D.A., Chakrabarti, P., Khosraviani, M., Hatcher, F.M., Washhoff, C.M., Goebel, B. Wylie, D.E. ve Blake, R.C. (1996), "Metal binding properties of a

- monoclonal antibody directed toward metal-chelate complexes," *J. Biol. Chem.*, **271**, 27677.
- Brus, L.E. (1983), "A simple model for the ionization potential, electron affinity, and aqueous redox potentials of small semiconductor crystallites," *J. Chem. Phys.*, **79**, 5566
- Brus, L.E. (1984), "Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state," *J. Chem. Phys.*, **80**, 4403.
- Caide, X. ve Sen-Fang, S. (2000), "Characterization of surface plasmon resonance biosensor," *Sensors and Actuators B: Chemical*, **661**, 3174-3177.
- Caro, E., Masqué, N., Marcé, R.M., Borrull, F., Cormack, P.A.G. ve Sherrington, D.C. (2002), "Non-covalent and semi-covalent molecularly imprinted polymers for selective on-line solid-phase extraction of 4-nitrophenol from water samples," *J. Chromatogr. A*, **963**, 169-178.
- Cha, T.W., Boiadjev, V., Lozano, J., Yang, H. ve Zhu, X.Y. (2002), "Immobilization of oligonucleotides on poly(ethylene glycol) brush-coated Si surfaces," *Analytical Biochemistry*, **311**, 27-32.
- Champe, P.C. ve Harvey, R.A. (1998), *Biochemistry Lippincott's Illustrated Reviews*. Lippincott Company Philadelphia, J.B..
- Chan, W.C.W. ve Nie, S.M. (1998), "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection," *Science*, **281**, 2016-2018.
- Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao X.H., Bailey, R.E., Han, M. ve Nie, S. (2002), "Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging," *Current Opinion In Biotechnology*, **13**, 40-46.
- Chen, J.L. ve Zhu, C.Q. (2005), "Functionalized CdS quantum dots fluorescence probe silver ion determination," *Analytica Chimica Acta*, **546**, 147-153.
- Chen, Y. ve Rosenzweig, Z. (2002) "Luminescent CdS quantum dots as selective ion probes," *Anal. Chem.*, **74**, 5132-5138.

- Chu, Y.C., Wang, C.C. ve Chen, C.Y. (2005), "Synthesis of luminescent and rodlike CdS nanocrystals dispersed in polymer templates," *Nanotechnology*, **16**, 58-64.
- Chun Zhou, X., Huang, L.Q. ve Li S F.Y. (2001), "Microgravimetric DNA sensor based on quartz crystal microbalance: comparison of oligonucleotide immobilization methods and the application in genetic diagnosis," *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 85-95..
- Dickert, F.L. ve Hayden, O. (1999), "Imprinting with sensor development On the way to synthetic antibodies," *Fresenius J. Anal. Chem.*, **364**, 506-511.
- Dmitrienko, S.G., Irkha, V.V. ve Kuznetsova, A.Y. (2004), "Use of Molecular Imprinted Polymers for the Separation and Preconcentration of Organic Compounds," *J. Anal. Chem.*, **59**, 808-817.
- Dong, X.C., Sun, H., Lu, X.Y., Wang, H.B., Liu S.X. ve Wang, N. (2002) "Separation of ephedrine stereoisomers by molecularly imprinted polymers influence of synthetic conditions and mobile phase compositions on the chromatographic performance," *Analyst* **127**, 1427-1432.
- Flenniken, M., Allen, M. ve Douglas, T. (2004), "Microbe manufacturers of semiconductors," *Chemistry & Biology*, **11**, 1478-1480.
- Gao, X., Yang, L., Petros, J.A. Marshall, F.F Simons, J.W. ve Nie, S. (2005), "In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots," *Current Opinion in Biotechnology*, **16**, 63-72.
- Garnier, F., Youssoufi, H.K., Srivastava, P., Mandrand, B. ve Delair, T. (1999), "Toward intelligent polymers: DNA sensors based on oligonucleotide-functionalized polypyrroles," *Synthetic Metals*, **100**, 89-94.
- Gözükara, E.M. (2000), *Biyokimya*, Dördüncü Baskı, Nobel Tıp Kitabevi, İstanbul.
- Hantz, E., Larue, V. ve Ladam, P. (2001), "Solution Conformation of an RNA-DNA hybrid duplex containing a pyrimidine RNA strand and a purine DNA strand," *Int. J. Biol. Macromol.*, **28**, 273-284.
- Hauden, D., Jaillet, G. ve Coquerel, R. (1981), *Temperature sensor using SAW delay lines*, IEEE Ultrason Symp. (Proc.), 148.

- Haupt, K. (2001), "Molecularly imprinted polymers in analytical chemistry," *Analyst*, **126**, 747-756.
- Haupt, K. ve Mosbach, K. (2000), "Molecularly imprinted polymers and their use in biomimetic sensors," *Chem. Rev.*, **100**, 2495-2504.
- Haupt, K., Cormack, P.A.G. ve Mosbach, K. (2002), "Imprinted Polymers As Tailor-Made Stationary Phases for Affinity Separation," *Biochromatography*, **419**, 419-431.
- Heising, R.A. (1946), *Quartz crystals for electrical circuits, their design and manufacture*, Van Nostrand, New York.
- Henini, M. ve Karam, J.M. (1997), "Low dimensional structures and devices: Micro- and nano-technology," *Microelectronics Journal*, **28**, 367-370.
- Herz, E. (2003), *Colloidal Semiconductor Nanocrystals: a study of synthesis of and capping structures for CdSe*, Doktora Tezi, Polytechnic Institute and State University, Blacksburg, Virginia.
- Homola, J., Yee, S.S. ve Gauglitz, G., (1999), "Surface plasmon resonance sensors: review", *Sensors and Actuators B*, **54**, 3-15
- Idziak, L., Benrebouh, A. ve Deschamps, F. (2001), "Simple NMR experiments as a means to predict the performance of an anti-17 alpha-ethynylestradiol molecularly imprinted polymer," *Anal. Chim. Acta*, **435**, 137-140.
- Ikegami, T., Mukawa, T., Nariai H. ve Takeuchi, T. (2004), "Bisphenol A-recognition polymers prepared by covalent molecular imprinting," *Anal. Chim. Acta.*, **504**, 131-135.
- Jackson, J.D. (1972), *Classical Electrodynamics*, Wiley, New York
- Jenkins, A.L., Uy, O.M. ve Murray, G.M., (1999), "Polymer-based lanthanide luminescent sensor for detection of the hydrolysis product of the nerve agent Soman in water," *Anal. Chem.*, **71**, 373-378.
- José, M.C.F, Rosario, P.ve Alfredo, S.M. (2006), "The use of luminescent quantum dots for optical sensing," *Trends in Anal. Chem.*, **3**, 217-218.
- Kaim, W. ve Schwederski, B (1994), "Bioinorganic Chemistry: Inorganic Elements in the Chemistry of Life," John Wiley & Sons, 369-370.

- Karlsen, S.R., Johnston, K.S., Jorgenson, R.C. ve Yee, S.S., (1995), "Simultaneous determination of refractive index and absorbance spectra of chemical samples using surface plasmon resonance," *Sensors and Actuators B*, **25**, 747-749.
- Katz, A., Davis, M.E. (1999), "Investigations into the Mechanisms of Molecular Recognition with Imprinted Polymers," *Macromolecules*, **32**, 4113-4121.
- Kharitonov, A.B., Shipway, A.N. ve Willner, I. (1999), "An Au nanoparticle/bisbipyridinium cyclophane functionalized ion sensitive field effect transistor for the sensing of adrenaline," *Anal.Chem.*, **71**, 1441-1443.
- Knight, A., Gaunt, J., Davidson, T., Chechik, V. ve Windsor, S. (2004), <http://www.npl.co.uk/biotech/dgl-as-007.pdf>
- Komiyama, M., Takeuchi, T., Mukawa, T. ve Asanuma, H. (2002), *Molecular Imprinting: From Fundamentals to Applications*, WILEY-VCH, New York.
- Kretschmann, E. (1969), "The dependence of the plasma-resonance-emission of thin silver films on the temperature" *Zeitschrift fuer Physik.*, **221**, 357-361.
- Kretschmann, E. (1969), "The determination of the optical constants of thin films by means of curves of constant transmission," *Zeitschrift fuer Physik.*, **221**, 346-356
- Kretschmann, E. (1971), "Die bestimmung optischer konstanten von metallen durch anregung von oberflächenplasmaschwingungen," *Zeitschrift für Physik*, **241**, 313-324.
- Kretschmann, E., Raether, H. (1968), "Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light," *Zeitschrift für Naturforsch.*, **23A**, 398-410.
- Kriz, D., Ramstrom, O. ve Mosbach, K. (1997), "Molecular imprinting: new possibilities for sensor technology," *Anal. Chem.*, **69**, 345 A-349 A.
- Kuijt, J, Ariese, F. ve Brinkman, U.A.T. (2003), "Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry," *Analytica Chimica Acta*, **488**, 135-171.
- Kulkarni, S.K., Kharrazi, A.S., Deobagkar, D.N. ve Deobagkar, D.D. (2005) "Synthesis and spectral properties of DNA capped CdS nanoparticles in

- aqueous and non-aqueous media,” *Biosensors and Bioelectronics*, **21** (1), 95-102.
- Lanza, F. ve Sällergren, B. (1999), “Method for synthesis and screening of large groups of molecularly imprinted polymers,” *Anal. Chem.* **71**, 2092–2096.
- La-Scalea, M.A., Serrano, S.H.P., Ferreira, E.I. ve Oliveira Brett, A.M. (2002), “Voltammetric behavior of benznidazole at a DNA-electrochemical biosensor,” *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **29**, 561-568.
- Lassalle, N., Mailley, P., Vieil, E., Livache, T., Roget, A., Correia, J.P. ve Abrantes, L.M. (2001), “Electronically conductive polymer grafted with oligonucleotides as electrochemical sensors of DNA: Preliminary study of real time monitoring by in situ techniques,” *Journal of Electroanalytical Chemistry*, **509**, 48-57.
- Lehninger, A.L., Nelson, D.L. ve Cox, M.M. (2000), *Principles of Biochemistry*, 3rd ed., Worth Publishers Inc., New York.
- Li, Z., Du, Y., Zhang, Z. ve Pang, D. (2003), “Preparation and characterization of CdS quantum dots chitosan biocomposite”, *Reactive&Functional Polymers*, **55**, 35-43.
- Liedberg, B., Nylander, C., ve Lundström, I. (1983), “Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing,” *Sensors and Actuators*, **4**, 299-304.
- Lin, C.I., Joseph, A.K., Chang, C.K. ve Lee, Y.D. (2004), “Synthesis and photoluminescence study of molecularly imprinted polymers appended onto CdSe/ZnS core-shells,” *Biosens. Bioelectron.*, **20**, 127-131.
- Lin, T.Y., Hu, C.H. ve Chou, T.C. (2004), Determination of albumin concentration by MIP-QCM sensor,” *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 75-81.
- Lin, Z., Cui, S., Zhang, H., Chen, Q., Yang, B., Su, X., Zhang, J. ve Jin, Q. (2003) “Studies on quantum dots synthesized in aqueous solution for biological labeling via electrostatic interaction,” *Analytical Biochemistry*, **319**, 239-243.
- Lu, C. Ve Czanderna, A.W. (1984), *Applications of piezoelectric quartz crystal microbalances*, Elsevier.

- Malhotra, B.D., Chaubey, A. Ve Singh, S.P., (2006), "Prospects of conducting polymers in biosensors," *Analytica Chimica Acta*, In press.
- Mallik, S., Plunkett, S.D., Dhal, P.K., Johnson, R.D., Pack, D.W., Shnek D.R. ve Arnold, F.H. (1994) "Towards materials for the specific recognition and separation of proteins," *New Journal of Chemistry*, **18**, 299-304.
- Martinez-Castañón, G.A., Sánchez-Loredo, M. G., Martinez-Mendoza, J. R. ve Ruiz, F. (2005) "Synthesis of CdS Nanoparticles: a Simple Method in Aqueous Media," *Advances in Technology of Materials and Materials Processing*, **7 (2)**, 171-174.
- Mathews, C.K. ve Van Holde, K.E. (1996), *Biochemistry*, The Benjamin/Cummings Publishing Company, Inc., Redwood City, California.
- Mattoussi, H., Igor, L.M., Aaron, R.C., Ellen, R.G., Jyoti, K.J., Sanford, M.S. ve Matthew, J.M. (2004), "Luminescent quantum dot-bioconjugates in immunoassays, FRET, Biosensing, and Imaging Applications," *JALA*, 28-32.
- Merkoçi, A., Aldavert, M., Marin, S.ve Alegret, S. (2005), "New materials for electrochemical sensing V: Nanoparticles for DNA labeling," *Trens in Anal. Chem.* **24 (4)**, 341-349.
- Minniti, G., Caruso, U., Cerone, R. ve de Toni, E. (1998), "Purines and pyrimidines determination in urine using high-performance liquid chromatography." *Adv. Exp. Med. Biol.*, **431**, 843-848.
- Moore, D.E. ve Patel, K. (2001), "Q-CdS photoluminescence activation on Zn²⁺ and Cd²⁺ salt introduction," *Langmuir*, **17**, 2541-2544.
- Mosbach, K. ve Mayes, A.G. (1997), "Molecularly imprinted polymers: useful materials for analytical chemistry," *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, **16**, 321-332.
- Mosbach, K. ve Arshady, R. (1981), "Synthesis of substrate-selective polymers by host-guest polymerization," *Makromol. Chem.*, **182**, 687-692.
- Murphy, C.J. ve Coffey, J.L. (2002), "Quantum dots: A primer," *Appl. Spectrosc.*, **56** 16A-27A

- Murray, C.B., Norris, D.J. ve Bawendi, M.G. (1993), "Synthesis and characterization of nearly monodisperse CdE (E = sulfur, selenium, tellurium) semiconductor nanocrystallites," *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 8706-8715.
- Murray, R.K., Granner D.K., Mayes, P.A. ve Rodwell, V.W. (2000) *Harper's Biochemistry*, 25th Ed., Appleton & Lange, Stamford.
- Myszka, D.G. (1999), "Improving biosensor analysis," *J. Molecular Recognition*, **12**, 179-184.
- Nelson, S.G., Johnston, K.S. ve Yee, S.S. (1996), "High sensitivity surface plasmon resonance sensor based on phase detection," *Sensors and Actuators B*, **35**, 187-191
- Neumeister, J., Thum, R. ve Lüder, E. (1990), "A SAW delay-line oscillator as a high-resolution temperature sensor," *Sens. Actuators A*, **A21-23**, 670.
- Niemeyer, C. M. (2001), "Nanoparticles, proteins, and nucleic acids: Biotechnology meets materials science," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **40**, 4128-4158.
- Otto, A. (1968), Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Zeitschrift für physik*, **216**, 398-410.
- Pal, U., Loaiza-Gonzalez, G., Bautista-Hernandez, A. ve Vazquez-Cuchillo, O. (2000), *Synthesis of CdS nanoparticles through colloidal rout.*
<http://www.fis.cinvestav.mx/~smcsyv/supyvac/11/sv114000.pdf>
- Peng, Z.A. ve Peng, X.G. (2001), "Formation of high-quality CdTe, CdSe and CdS nanocrystals using CdO as precursor," *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 183-
- Persson, B., Stenhag, K., Nilsson, P., Larsson, A., Uhlen, M. ve Nygren, P.A. (1997), "Analysis of oligonucleotide probe affinities using surface plasmon resonance: a means for mutational scanning," *Anal. Biochem*, **246**, 34-44.
- Ralf, L., Carsten, B. ve Peter H. (2000), "Gravimetric and non-gravimetric chemical quartz crystal resonators," *Sensors and Actuators B*, **65**, 277-283.
- Ravanat, J.L., Guicherd, P., Tuce, Z. ve Cadet, J. (1999), "Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine," *Chem. Res. Toxicol.*, **12**, 802-808.

- Riegler, J., ve Nann, T. (2004), "Application of luminescent nanocrystals as labels for biological molecules," *Anal. Bioanal. Chem.*, **379**, 913-919.
- Ritchie, R.H., Arakawa, E.T., Cowan, J.J. ve Hamm, R.N. (1968), "Surface-Plasmon Resonance Effect in Grating Diffraction," *Phys. Rev. Lett.*, **21**, 1530–1533.
- Rogach, A.L., Kornowski, A. Gao, M., Eychmüller, A. ve Weller, H. (1999), "Synthesis and characterization of a size series of extremely small thiol-stabilized CdSe nanocrystals," *J. Phys. Chem. B*, **103**, 3065-3069.
- Sanz-Medel, A. (1993), "Solid surface photoluminescence and flow analysis: a happy marriage," *Anal. Chim. Acta*, **283**, 367-378.
- Sauerbrey, G.Z. (1959), "Verwendung von schwingquarzen zur wägung dünner schichten und zur mikrowägung," *Zeitschrift für Physik*, **155**, 206-222.
- Sellergren, B. (2000), "Imprinted polymers with memory for small molecules, proteins, or crystals," *Angew. Chem. Int. Ed.* **39**, 1031-1037.
- Sellergren, B., Lepistö, M. ve Mosbach, K. (1988), "Highly enantioselective and substrate-selective polymers obtained by molecular imprinting utilizing noncovalent interactions - NMR and chromatographic studies on the nature of recognition," *J. Am. Chem. Soc.* **110**, 5853–5860.
- Smith, A.M. ve Nie, S.M. (2004), "Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots," *Analyst*, **129**, 672-677.
- Sooklal, K, Cullum, B.S. ve Angel, S.M. (1996), "Photophysical properties of ZnS nanoclusters with spatially localized Mn²⁺," *Journal Of Physical Chemistry*, **100**, 4551-4555.
- Spégel, P., Schweitz, L. ve Nilsson, S. (2002), "Molecularly imprinted polymers" *Anal Bioanal Chem.*, **372**, 37-8.
- Steinke, J., Sherrington, D. ve Dunkin, I. (1995), "Imprinting of Synthetic Polymers Using Molecular Templates," *Adv. Polym. Sci.* **123**, 80-125
- Sutherland, A.J. (2002), "Quantum dots as luminescent probes in biological systems," *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.*, **6**, 365
- Takeuchi, T., Fukuma, D. ve Matsui, J. (1999), "Combinatorial molecular imprinting: an approach to synthetic polymer receptors," *Anal. Chem.*, **71**, 285–290.

- Taniwaki, K., Hyakutake, A., Aoki, T., Yoshikawa, M., Guiver, M.D. ve Robertson, G.P. (2003), "Evaluation of the recognition ability of molecularly imprinted materials by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy," *Analytica Chimica Acta*, **489**, 191-198
- Thompson, M. ve Stone D.C. (1997), *Surface-launched acoustic wave sensors: chemical sensing and thin-film characterization*, John Wiley & Sons, New York.
- Tong, H. ve Zhu, Y.J. (2006), "Synthesis of CdS nanocrystals based on low-temperature thermolysis of one single-source organometallic precursor," *Nanotechnology*, **17**, 845-851.
- Traviesa, J.M., Costa, J.M., Pereiro, R. ve Sanz-Medel, A. (2004), "Flow-through solid-phase energy transfer-room temperature phosphorescence for orthophosphate determinations at trace levels," *Talanta*, **62**, 827-833.
- Tsoi, P.Y., Yang, J., Sun, Y.T., Sui, S.F. ve Yang, M.S. (2000), "Surface plasmon resonance study of DNA polymerases binding to template/primer DNA duplexes immobilized on supported lipid monolayers," *Langmuir*, **16**, 6590-6596.
- Turkova, J. (1992), *Bioaffinity Chromatography*, Elsevier, Amsterdam.
- Viens, M. ve Cheeke, J.D.N. (1990), Highly sensitive temperature sensor using SAW resonator oscillator, *Sens. Actuators A*, **A24**, 209
- Vlatakis, G., Andersson, L.I., Müller, R. ve Mosbach, K. (1993), "Drug assay using antibody mimics made by molecular imprinting," *Nature*, **361**, 645-647.
- Wang J. (1997), "Remote electrochemical sensors for monitoring inorganic and organic pollutants," *Trends Anal. Chem.*, **16**, 84.
- Wang, J. ve Kawde, A.N. (2001), "Pencil-based renewable biosensor for label-free electrochemical detection of DNA hybridization," *Analytica Chimica Acta*, **431**, 219-224.
- Wang, Y., Tang, Z. ve Nicholas A.K. (2005), "Bioapplication of nanosemiconductors," *Nanotoday*, 20-31.

- Weller, H. (1993), "Colloidal Semiconductor Q-Particles: Chemistry in the Transition Region Between Solid State and Molecules," *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **32**, 41-53.
- Winter, J.O., Gomez, N., Gatzert, S., Schmidt, C.E. ve Korgel, B. A. (2005), "Variation of cadmium sulfide nanoparticle size and photoluminescence intensity with altered aqueous synthesis conditions," *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, **254**, 147-157.
- Wulff, G., Grobe-Einsler, R., Vesper, W. ve Sahran, A. (1977), "Enzyme-analogue built polymers, 5. On the specificity distribution of chiral cavities prepared in synthetic polymers" *Makromol Chem.*, **178**, 2817-2825.
- Xie, H. Y., Liang, J.G., Zhang, Z.L., Liu, Y., He, Z.K. ve Pang, D. W. (2004), "Luminescent CdSe-ZnS quantum dots as selective Cu²⁺ probe," *Spectrochimica Acta Part A*, **60**, 2527-2530.
- Yagisawa, S., Tanimori, H. Ve Kitagawa, T. (1986), "Determination of an antibody-antigen binding constant by enzyme immunoassay and theory for analysis of competitive binding of two ligands to heterogeneous receptor," *J. Biochem.*, **99**, 793-802.
- Yan, B., Chen, D. ve Jiao, X. (2004), "Synthesis, characterization and fluorescence property of CdS/P(N-iPAAm) nanocomposites," *Materials Research Bulletin*, **39**, 1655-2662.
- Yang, H., Huang, C., Li, X., Shi, R. ve Zhang, K. (2005), "Luminescent and photocatalytic properties of cadmium sulfide nanoparticles synthesized via microwave irradiation," *Materials Chemistry and Physics*, **90**, 155-158.
- Yang, M., Tsoi, P.Y., Li, C.W. ve Zhao, J. (2006), "Analysis of interactions of template/primer duplexes with T7 DNA polymerase by oligonucleotide microarray," *Sensors and Actuators B: Chemical*, **115**, 428-433.
- Yao, S.Z. (1997), *Piezoelectric Chemistry and Biosensors*, Hunan Normal University Pres.
- Yoshizako, K., Hosoya, K., Iwakoshi, Y., Kimata, K. ve Tanaka, N. (1998), "Porogen imprinting effects," *Anal. Chem.*, **70**, 386-389.

- Youssoufi, H.K. ve Makrouf, B. (2002), "Electrochemical biosensing of DNA hybridization by ferrocenyl groups functionalized polypyrrole," *Analytica Chimica Acta*, **469**, 85-92.
- Yu, C. ve Mosbach, K. (1997), "Molecular imprinting utilizing an amide functional group for hydrogen bonding leading to highly efficient polymers," *J. Org. Chem.*, **62**, 4057-4064.
- Zayats, M., Kharitonov, A.B., Pogorelova, S.P., Lioubashevski, O., Katz, E. ve Willner, I. (2003), "Probing Photoelectrochemical Processes in Au-CdS Nanoparticle Arrays by Surface Plasmon Resonance: Application for the Detection of Acetylcholine Esterase Inhibitors," *J. Am. Chem. Soc.*, **125** 16006-16014.
- Zhong, N., Byun, H.S. ve Bittman, R. (2001), "Hydrophilic cholesterol-binding molecular imprinted polymers," *Tetrahedron Letters*, **42**, 1839-1841.