



Birden Fazla Biyomolekülün Algılanması İçin Akıllı Nanoyapı Dizileri

Program Kodu: 1001

Proje No: 110T759

Proje Yürütücüsü:
Yrd. Doç. Dr. Hadi M. ZAREİE

Araştırmacı:

Prof. Dr. Volga BULMUŞ

Bursiyer(ler):

Aysel TOMAK

Ekrem ÖZER

Yasin Uğur KAYRAN

Sümeyra KARAKAYA

Ayşegül GÜMÜŞ

KASIM 2014

ANKARA



ÖNSÖZ

Biyolojik maddelerin hızlı, nicel ve paralel bir şekilde algılanabilmesine, biyomedikal, çevre, biyoteknoloji, savunma ve tarım gibi birçok alanda ihtiyaç duyulmaktadır. Birim kütle başına çok geniş yüzey alanına sahip olan nanomalzemeler, boyut ve şekillerine bağlı olarak eşsiz kimyasal ve fiziksel özellikler sergilerler. Bu özellikleri sayesinde nanomalzemeler, biyolojik numunelerin algılanmasında son derece duyarlı, etikete/işaretleme ihtiyacı duymayan, hızlı metotlar geliştirmek için eşsiz fırsatlar sunmaktadır.

Bu projede birden fazla biyolojik maddenin etikete/işaretleme ihtiyacı duymadan, nicel, paralel, hassas ve hızlı bir şekilde algılanması için yeni nanomalzemeler ve metotların geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla; sıcaklık-duyarlı polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş sandviç-benzeri nanoyapıların desenli dizileri üretilmiş ve bu dizilerin çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak lokalize yüzey plazmon rezonansı ve kapasitansı incelenmiştir. Böylece, yeni ve iyileştirilmiş biyosensörlerin tasarımı ve üretimi için yeni nanomalzemeler ve teknikler geliştirilmesine yönelik önemli bulgular elde edilmiştir.

Bu proje kapsamında yapılan bütün çalışmalar TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.



İÇİNDEKİLER

ŞEKİLLER LİSTESİ	v
TABLolar LİSTESİ	ix
ÖZET	x
ABSTRACT	xi
1. GİRİŞ	1
2. LİTERATÜR ÖZETİ	1
2.1. Biyosensörler	1
2.1. Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR)	2
2.3. Kapasitans	4
2.4. Nanoküre litografisi (NSL)	4
2.5. Sıcaklık duyarlı polimerler	5
3. GEREÇ ve YÖNTEM	6
3.1. Gereçler	6
3.2. Cihazlar	6
3.2.1. Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ölçümleri	6
3.2.2. Yüzey plazmon rezonans spektrometresi (SPRS)	7
3.2.3. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	7
3.2.4. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	7
3.2.5. X-Işını fotoelektron spektrometresi (XPS)	7
3.2.6. Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi	8
3.2.7. Jel filtrasyon kromatografisi (GPC)	8
3.2.8. UV-Vis spektrometresi	8
3.2.9. ICP-AES elementel analiz	8
3.2.10. Yüzey geliştirilmiş raman spektrometresi (SERS)	8
3.3. Yöntemler	9
3.3.1. Sıcaklık duyarlı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu	9
3.3.2. Polimerlerin uç grup modifikasyonları ve karakterizasyonu	11
3.3.3. Polimerlerin sıcaklık duyarlı davranışlarının belirlenmesi	13
3.3.4. Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	13
3.3.5. Nanosandviç dizilerinin polimerler ve biyolojik moleküller ile işlevselleştirilmesi	14
3.3.6. Biyomolekül tanıma olaylarının LSPR ve XPS kapasitans ölçümleri ile belirlenmesi	15
4. BULGULAR ve TARTIŞMA	16
4.1. Uç grup fonksiyonel sıcaklık duyarlı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu	16



4.2. Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve karakterizasyonu.....	22
4.3. Nanosandviç dizilerinin polimerler ile işlevselleştirilmesi	26
4.4. Biyotanıma olaylarının belirlenmesi	36
4.5. Nanosandviç yüzeylerin işlevselleştirilmesinin ve biyotanıma olaylarının XPS kapasitans ölçümleri ile belirlenmesi.....	43
SONUÇ	54
KAYNAKLAR.....	55

ŞEKİLLER LİSTESİ

- Şekil 2.1. Biyotinlenmiş gümüş (Ag) nanoparçacıkların hazırlanması ve streptavidin bağlanmasını gösteren LSPR spektrumları: (A) kimyasal modifikasyondan önce Ag nanoparçacıklar, $\lambda_{\max}=561.4$ nm. (B) kimyasal modifikasyon sonrası, $\lambda_{\max}=598.6$ nm (C) biotin modifikasyonu sonrası, $\lambda_{\max}=609.6$ nm (D) streptavidin bağlanması sonrası, $\lambda_{\max}=636.6$ nm (Haes ve Van Duyne 2002)..... **3**
- Şekil 2.2. Nanosandviçlerde yük birikmesinin zamana karşı grafiği (Zareie vd. 2008) **4**
- Şekil 3.1. MEO₂MA and OEGMA monomerlerinin RAFT tekniği ile kopolimerizasyonu şeması
- Şekil 3.2. Kopolimerlerin tiyol uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu **11**
- Şekil 3.3. Kopolimerlerin fosfat uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu **11**
- Şekil 3.4. Kopolimerlerin silan uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu **12**
- Şekil 3.5. Nanoküre litografisi (NSL) ile nanosandviç dizileri hazırlama yönteminin şematik gösterimi. (A) polistiren tanelerin dönele kaplanması, (B) metallerin birikimi, (C) kaldırma, (D) tek altıgen nanosandviç dizisi..... **14**
- Şekil 4.1. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) PDS modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst) ¹H NMR spektrumları..... **19**
- Şekil 4.2. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst), ve DEBrPP bileşiğinin (en üst) ¹H NMR spektrumları **19**
- Şekil 4.3. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası ³¹P NMR spektrumu. İçteki spektrum DEBrPP bileşiğine aittir **20**
- Şekil 4.4. Üst spektrum: CITESi bileşiğinin ¹H NMR spektrumu; Alt spektrum: PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) CITESi ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası alınan ¹H NMR spektrumu..... **20**
- Şekil 4.5. RAFT, PDS, fosfonat ve trietoksisilan uç gruplarına sahip PT-3 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) sıcaklık duyarlı davranışları **22**
- Şekil 4.6. (A) 500 nm çapında polistiren kürelerin altıgen sıkı istif dizisinin SEM görüntüsü. Panel A'nın içindeki ek görüntü, 1.5x1.5 µm tarama alanı ile yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (B) Nanoparçacık dizilerin SEM görüntüsü. Panel B'nin içindeki ek görüntü 800x800 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (C) Cam üzerinde Au nanoparçacık dizilerinin LSPR kayma spektrumları. Spektrumlar, 200 ± 5 nm sabit çaplı ve değişen kalınlıklarda nanoparçacıklara aittir (1) 50 nm, $\lambda_{\max}= 739,1$ nm; (2) 30 nm, $\lambda_{\max}= 763,9$ nm; (3) 20 nm, $\lambda_{\max}= 794,7$ nm. (D) Silikon altta üstünde oluşturulmuş Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin 700x700 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsü..... **24**
- Şekil 4.7. Silikon altta üstünde oluşturulmuş (A) Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin ve (B) Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizisinin AFM görüntüleri; (C) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, $\lambda_{\max}= 700$ nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, $\lambda_{\max}= 835$ nm. D) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, $\lambda_{\max}= 712$ nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, $\lambda_{\max}= 898$ nm **25**
- Şekil 4.8. Cam üstünde oluşturulmuş Ag tek tabaka nanoparçacık dizisinin NSL'de kullanılan PS mikroküre çapına göre LSPR spektrumları: (A) 0.5 µm PS; $\lambda_{\max}= 569$ nm. (B) 1 µm PS $\lambda_{\max}= 880$ nm **26**

Şekil 4.9. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) PDS modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst) ^1H NMR spektrum(A) 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Au katmanının tiyol uç gruplu polimer (PT-2, tiyol uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{\text{max}}= 832.24 \text{ nm}$) ve (b) sonrası ($\lambda_{\text{max}}= 849.66 \text{ nm}$) LSPR kaymaları **27**

Şekil 4.10. (A) 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Al_2O_3 katmanının fosfonat uç gruplu polimer (PT-2 kodlu, fosfonat uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon yüzey üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{\text{max}}= 836.6 \text{ nm}$) ve (b) sonrası ($\lambda_{\text{max}}= 843.13 \text{ nm}$) LSPR kaymaları..... **28**

Şekil 4.11. Cam üzerinde hazırlanmış 20 nm Au / 20 nm HfO_2 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin HfO_2 katmanının silan uç gruplu polimer (PT-6, silan uç grup, Tablo 4.1) ile modifikasyonu (a) öncesi ($\lambda_{\text{max}}= 918.8 \text{ nm}$) ve (b) sonrası ($\lambda_{\text{max}}= 928.8 \text{ nm}$) LSPR spektrumları..... **29**

Şekil 4.12. SPR sensogramı: (a) ultra saf su enjeksiyonu (200 $\mu\text{l}/\text{dk}$, 10 dk), (b) DeBrPP enjeksiyonu (100 $\mu\text{l}/\text{dk}$, 30 dk), (c) ATEs enjeksiyonu (100 $\mu\text{l}/\text{dk}$, 30 dk), (d) tiyol uç gruplu polimer enjeksiyonu (100 $\mu\text{l}/\text{dk}$, 30 dk). Fonksiyonel grupların konsantrasyonu 0.01 mM'da sabit tutulmuştur..... **30**

Şekil 4.13. (A) Al_2O_3 ve (B) HfO_2 tek katmanlı nanodiziler ile tiyol fonksiyonel polimerin inkübasyonu sonrası alınmış Raman spektrumları **31**

Şekil 4.14. (A) 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve fosfonat uç gruplu polimerler (PT-2 fosfonat ve PT-6 tiyol uç gruplu polimerler, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası Si üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler $1.5 \mu\text{m} \times 1.5 \mu\text{m}$ çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{\text{max}}= 831.37 \text{ nm}$) ve (b) fosfonat uç gruplu polimerle ($\lambda_{\text{max}}= 838.78 \text{ nm}$) ve takiben (c) tiyol uç gruplu polimer ($\lambda_{\text{max}}= 853.13 \text{ nm}$) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları **32**

Şekil 4.15. Silikon yüzey üzerinde hazırlanmış 30 nm Au / 30 nm HfO_2 / 30 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve silan uç gruplu polimerler (PT-6 kodlu, silan ve tiyol uçlu polimerler, Tablo 4.1) ile (A) modifikasyon öncesi SEM ve (B ve C) modifikasyon sonrası SEM ve çekim mod AFM görüntüleri. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{\text{max}}= 723 \text{ nm}$), (b) silan uç gruplu polimerle ($\lambda_{\text{max}}= 734 \text{ nm}$) ve takiben (c) tiyol uç gruplu polimer ($\lambda_{\text{max}}= 746 \text{ nm}$) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları **34**

Şekil 4.16. Tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerler ile modifiye edilmiş (A) 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au ve (B) 20 nm Au / 20 nm HfO_2 / 20 nm Au nanosandviç yüzeylerin XPS spektrumları. Üst spektrum (A) sadece fosfonat ve (B) sadece silan uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Orta spektrum tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Alt spektrum (A) fosfonat + tiyol ve (B) silan + tiyol uç gruplu polimerler ile modifikasyon sonrası **35**

Şekil 4.17. (A) Tiyol uç gruplu polimer (PT-6 tiyol uçlu polimer, Tablo 4.1, LCST= 51.5°C , $M_{n\text{GPC}}= 3.2 \text{ kg/mol}$) ve biyotin ile işlevselleştirilmiş nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü olarak SA'nın bağlanmasının şematik olarak gösterimi. a- Nanosandviç yüzeyinin polimer zincirleri ve biyotin molekülleri ile işlevselleştirilmesi, b- ortam sıcaklığının kullanılan polimerin

LCST değeri üstüne çıkarılarak yüzeydeki biyotinler ile çözeltideki SA moleküllerinin etkileşmesinin sağlanması. (B) Nanosandviç yüzeylerin polimer + biyotin ile modifikasyonu öncesi ve (C) sonrası tıklamalı mod AFM görüntüleri. (D) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) oda sıcaklığında SA ile inkübasyon sonrası. (E) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, (d) 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası. (F) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu (mavi pik) öncesi ve (yeşil pik) sonrası, (kırmızı pik) sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası **37**

Şekil 4.18. A) Fosfonat uç grulu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCTS= 35.6 °C, Mn_{GPC} = 3.2 kg/mol) ve dA_8 ile işlevselleştirilmiş 30 nm Au / 30 nm Al_2O_3 / 30 nm Au nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü dT_8 bağlanmasının LSPR ile analizi. Nanosandviçlerin polimer + dA_8 ile modifikasyonu (a) öncesi (λ_{max} = 780 nm) ve (b) sonrası (λ_{max} = 818 nm), (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra (λ_{max} = 833 nm), (d) 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası (λ_{max} = 872 nm). B) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu öncesi (kırmızı pik) ve sonrası (mavi pik), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra, 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası (yeşil pik) **39**

Şekil 4.19. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. Kırmızı spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{max} = 768 nm; Mavi spektrum: fosfonat uçgrulu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCTS= 35.6 °C, Mn_{GPC} = 3.2 kg/mol) + dA_8 karışımı ile Al_2O_3 ara katmanının modifikasyonu, λ_{max} = 774 nm; Yeşil spektrum: tiyol uç grulu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC} = 3.2 kg/mol) + biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{max} = 782 nm; Siyah spektrum: tüm katmanları fonksiyonelleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'de dT_8 ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{max} = 789 nm; Pembe spektrum: tüm katmanları fonksiyonelleştirilmiş ve 42°C'de dT_8 bağlanmış nanodizilerin 55°C'de dT_8 ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{max} = 819 nm **40**

Şekil 4.20. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. A) Yeşil spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm HfO_2 / 30 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{max} = 714 nm; Pembe spektrum: silan uçgrulu polimer (PT-3, Tablo 4.1, LCTS= 44.9 °C, Mn_{GPC} = 4.4 kg/mol) +GLT karışımı ile HfO_2 ara katmanının modifikasyonu, λ_{max} = 721 nm; Siyah spektrum: tiyol uç grulu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC} = 3.2 kg/mol) + biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{max} = 731 nm; Kırmızı spektrum: tüm katmanları fonksiyonelleştirilmiş nanosandviçlerin 50°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{max} = 735 nm; Mavi spektrum: tüm katmanları fonksiyonelleştirilmiş ve 50°C'de GST bağlanmış nanodizilerin 55°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{max} = 755 nm. B) LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{max} = 714 nm) ve sonrası (silan uç grulu polimer + GLT ile modifikasyonu sonrası, yeşil pik λ_{max} = 721 nm, ve tiyol uç grulu polimer + biyotin ile modifikasyon sonrası, mavi pik λ_{max} = 731 nm), işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin oda sıcaklığında, GST ve SA ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{max} = 731 nm). C) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{max} = 723 nm) ve sonrası (tiyol uç grulu polimer, mavi pik λ_{max} = 732 nm), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'de, GST ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{max} = 733 nm) **42**

Şekil 4.21. Au/ Al_2O_3 /Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi **48**



Şekil 4.22. Au/HfO ₂ /Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi.	49
Şekil 4.23. Nanosandviçin şematik gösterimi (Au/ HfO ₂ / Au). Kalınlık= 60 nm, yükseklik= 240 nm ve genişlik= 170 nm	51
Şekil 4.24. Gerçek ve teorik kapasitans değerlerinin hesaplanması	52



TABLolar LİSTESİ

Tablo 3.1. MEO ₂ MA and OEGMA monomerlerinin RAFT tekniği ile kopolimerizasyon deneylerinin şartları.....	10
Tablo 4.1. Çalışmada sentezlenen kopolimerlerin NMR ve GPC ile elde edilmiş sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_{nNMR} ve M_{nGPC}), polimerleşme dereceleri (DP), molekül ağırlık dağılımları (PDI), kompozisyonları, ve uç grup modifikasyonu öncesi ve sonrası LCST değerleri. DP ve kompozisyon saflaştırılmış kopolimerlerin ¹ H NMR analizlerinden elde edilmiştir.....	18
Tablo 4.2. 20 nm Au/20 nm Al ₂ O ₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisinin XPS kapasitans ölçümlerinde kullanılan örnek kodları.....	43
Tablo 4.3. 20 nm Au/20 nm HfO ₂ / 20 nm Au nanosandviç dizisinin XPS kapasitans ölçümlerinde kullanılan örnek kodları.....	44
Tablo 4.4. 20 nm Au/20 nm Al ₂ O ₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisinin (A1 örneği) XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi.....	45
Tablo 4.5. 20 nm Au/20 nm HfO ₂ / 20 nm Au nanosandviç dizisinin (H1 örneği) XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi.....	46
Tablo 4.6. Tüm örnekler için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi.....	46
Tablo 4.7. Au/Al ₂ O ₃ /Au nanosandviçleri için pikler arasındaki hesaplanan bağlanma enerjisi farklarına karşılık gelen frekans değerleri.....	47
Tablo 4.8. Au/HfO ₂ /Au nanosandviçleri için pikler arasındaki hesaplanan bağlanma enerjisi farklarına karşılık gelen frekans değerleri.....	48
Tablo 4.9. 20 nm Au/20 nm Al ₂ O ₃ / 20 nm Au nanosandviç örnekleri için elde edilmiş sınır frekans değerleri.....	50
Tablo 4.10. 20 nm Au/20 nm HfO ₃ / 20 nm Au nanosandviç örnekleri için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş sınır frekans değerleri.....	50
Tablo 4.11. 20 nm Au/20 nm HfO ₃ / 20 nm Au nanosandviç örnekleri için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş gerçek kapasitans ve hesaplanan teorik kapasitans değerleri.....	53



ÖZET

Biyolojik maddelerin hızlı, nicel ve paralel bir şekilde algılanabilmesine, biyomedikal, çevre, biyoteknoloji, savunma ve tarım gibi birçok alanda ihtiyaç duyulmaktadır. Birim kütle başına çok geniş yüzey alanına sahip olan nanomalzemeler boyuta ve şekle bağlı eşsiz kimyasal ve fiziksel özellikler sergilerler. Bu özellikleri sayesinde nanomalzemeler, biyolojik numunelerin algılanmasında son derece duyarlı, etikete/işaretleme ihtiyacı duymayan, hızlı metotlar geliştirmek için eşsiz fırsatlar sunmaktadır.

Bu projede hedefimiz, birden fazla biyolojik maddenin etikete/işaretleme ihtiyacı duymadan, nicel ve paralel şekilde algılanması için duyarlı ve hızlı bir sistemin geliştirilmesine yönelik olarak sıcaklık-duyarlı polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş sandviç-benzeri nanoyapıların desenli dizilerinin üretilmesi ve çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak lokalize yüzey plazmon rezonansının (LSPR) ve kapasitansının incelenmesidir.

Bu amaçla öncelikle sandviç-benzeri nanoyapıların desenli dizileri nanoküre litografisi tekniği ile üretilmiştir. Sandviç-benzeri nanoyapılar, metal-yalıtkan-metal üçlü tabakalardan oluşturulmuştur. Bu nanosandviç dizileri, model biyomoleküller (biyotin, glutatyon ve tek-sarmal oligoadenin) ve sıcaklık-duyarlı polimer ile fonksiyonelleştirilmiştir. Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve yüzey modifikasyonları, taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskopisi, UV-görünür-yakın kızılötesi spektrofotometrisi aracılığıyla LSPR ölçümleri, X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS) gibi farklı teknikler ile doğrulanmıştır. Farklı transdüksiyon mekanizmalarını incelemek için, polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş nanodizilerin lokalize yüzey plazmon rezonansı ve kapasitansı, çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. LSPR ve XPS kapasitans ölçümleri, nanodizilerin işlevselleştirilmesi adımlarını ve daha da önemlisi sıcaklık kontrollü olarak biyotin-streptavidin ve oligoadenin-oligotimin veya biyotin-streptavidin ve glutatyon-glutatyon S-transferaz biyotanıma olaylarını açıkça göstermiştir.

Sonuç olarak, bu projenin çıktısı biyomedikal, çevre, biyoteknoloji, tarım, savunma ve benzer endüstrilerde doğrudan uygulamaları olacak yeni ve iyileştirilmiş biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik yeni nanomalzemeler ve yöntemler olmuştur.

Anahtar kelimeler: nanolitografi, nanocihazlar, nanodiziler, uyarı-cevap polimerleri, lokalize yüzey plazmon rezonans, biyoçip, biyosensör



ABSTRACT

Rapid, quantitative and parallel detection of low concentration of biological substances is required in a broad range of applications including biomedicine, environment, biotechnology, defence and agriculture. Nanostructured materials exhibit unique, size- and shape-dependent chemical and physical properties, and high surface area per unit mass, thus offer unique opportunities for development of ultra-sensitive, label-free, rapid methods for detection of biological substances.

In this project, we intended to produce patterned arrays of sandwich-like nanostructures functionalized with temperature-responsive polymers and multiple biomolecule species and investigate the localised surface plasmon resonance (LSPR) and capacitance of the functionalised nanoarrays as a function of multiple biomolecular binding events towards determination of a sensitive and rapid system for label-free, quantitative, parallel detection of multiple biological substances.

For this purpose, patterned arrays of sandwich-like nanostructures were first prepared using nanosphere lithography. Nanosandwiches were made of triple layers of metal-insulator-metal. These nanosandwich arrays were then functionalized with model biomolecules (biotin, glutathione and single strand oligoadenine) and temperature-responsive polymers. Preparation and functionalization of nanosandwich arrays were verified via a variety of techniques including scanning electron microscopy, atomic force microscopy, Uv-vis-NIR spectroscopy mediated LSPR measurements and X-ray photoelectron spectroscopy (XPS). To investigate different transduction mechanisms, the localised surface plasmon resonance and capacitance of the biomolecule and polymer functionalized nanoarrays was determined as a function of multiple biomolecular binding events. The LSPR and XPS capacitance measurements clearly detected functionalization of nanoarrays and more importantly temperature-controlled biotin-streptavidin and oligoadenine-oligothymine or biotin-streptavidin and glutathione-glutathione S-transferase multiple biorecognition events.

As a conclusion, the outcome of this project is the generation of new nanomaterials and methods towards development of novel and improved biosensors for applications in biomedicine, environment, biotechnology, agriculture, defence and other relevant industries.

Keywords: nanolithography, nanodevices, nanoarrays, temperature-responsive polymers, localized surface plasmon resonance, biochip, biosensor



1. GİRİŞ

Bu projede, duyarlı ve geliştirilmiş biyosensör uygulamaları için bilimsel ve teknolojik olarak önemli yeni nanomalzemeler ve metotlar oluşturulması amaçlanmıştır. Bu amaçla; öncelikle metal ve yalıtkan tabakalardan oluşan sandviç benzeri nanoyapıların desenli dizileri nanoküre litografisi ile üretilmiştir. Nanoküre litografisi, literatürde çok yaygın olarak kullanılan, basit ve ucuz bir teknik olması nedeniyle nanodizilerin oluşturulmasında avantaj sağlamaktadır. Oluşturulan metal-yalıtkan-metal nano-sandviç dizileri daha sonra farklı biyolojik moleküller ve sıcaklık-duyarlı akıllı polimerler ile işlevselleştirilmiştir. Farklı tabakalardan oluşan sandviç-benzeri nanoyapılar, farklı biyolojik bağlanmalar için geniş yüzey alana sahip alt katman görevini üstlenmiştir. Metal ve yalıtkan tabakaların birlikte kullanılması biyolojik bağlanmaların, plazmon rezonans ve kapasitans ölçümlerine dayalı iki farklı dönüştürücü mekanizma ile algılanmasını mümkün kılmıştır. Sıcaklık-duyarlı polimerler, biyolojik tanıma olaylarını açma-kapama mekanizması ile kontrol edebilmeyi sağlamıştır. Biyomoleküller ve polimerler ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin, biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak lokalize yüzey plazmon rezonansı ve kapasitansı belirlenmiştir. Böylece, bu projede işaretleme/etiketlemeye gerek olmadan birden fazla biyomolekülün nicel algılanması amacıyla yeni malzeme ve metotlar geliştirilmesine yönelik önemli bulgular toplanmıştır.

2. LİTERATÜR ÖZETİ

2.1 Biyosensörler

Biyosensörler biyolojik moleküllerin hızlı ve hassas bir şekilde algılanmasına olanak veren cihazlardır. Biyosensör teknolojileri, biyoloji, kimya ve fizik gibi temel bilimler ile malzeme bilimi ve mühendislik yaklaşımlarının bir arada kullanılmasını gerektiren ve son yıllarda çok hızlı gelişim gösteren bir alandır. Bir biyosensör, biyoalıcı ve dönüştürücü olarak iki temel bileşenden oluşur. Biyoalıcı, analiz edilecek biyolojik molekülü seçici olarak tanıyan bir biyomoleküldür. Dönüştürücü ise biyotanıma olayını bir sinyale dönüştürür. Biyosensörler dönüştürücülerin çalışma prensibine bağlı olarak sınıflandırılır:(Mandke vd. 2011) Bu sınıflandırmaya göre en yaygın kullanılan ve aynı zamanda ilk glikoz sensörü olan, elektrokimyasal dönüştürücü mekanizmasına sahip elektrokimyasal biyosensörlerdir(Wang 2001). Kalorimetrik biyosensörler, biyokimyasal tepkime veya biyotanıma sırasında ısı değişiminin miktarını algılayarak sinyal üretirler(Spink ve Wadsö 2006). Optik biyosensörler ise biyotanıma işlemi sonucu ortaya çıkan absorpsiyon, floresans, lüminesans, reflaktans, ışık saçılımı veya kırılma indisi değişimlerini ölçerek sinyale çevirirler(Fan vd. 2008; Passaro vd. 2007; Proll 2005). Piezoelektrik biyosensörler ise piezoelektrik kristalde biyotanıma olayları sonucu kütle değişiminin ölçümüne dayalıdır(Skoog vd. 2006).

Nanomalzemelere ait birçok özellik biyosensör uygulamaları için son derece uygun platformlar oluşturmaktadır. Örneğin, metallere ve metal-yalıtkan kompozit malzemelerden oluşan nanoyapılar,

aynı malzemelerin yığın yapılarının sahip olmadığı eşsiz optik ve elektronik özellikler gösterirler. Bu nedenle bu nanoyapılar, biyosensörler, mikroelektronikler ve optoelektronikler gibi işlevsel ve yenilikçi malzemelerin tasarımı için önemli yapı taşlarıdır(Schatz vd. 2004; Xu vd. 2005). Bu tür nanoyapıların bir araya getirildiği diziler, yüksek yüzey alanı ve yoğunluk ile beraber fonksiyonel bileşenlerin çeşitliliğini sağladığı için ilgili kullanımda verim ve çok yönlülüğü önemli ölçüde artırır(Whitesides vd. 2005).

2.2 Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR)

Son yirmi yılda nanoteknoloji kullanılarak geliştirilen optik biyosensörler, biyoteknoloji, sağlık, gıda, çevre, savunma alanlarında büyük ölçüde kullanılmaktadır. Bu proje kapsamında Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR) ölçümlerine dayanan dönüştürücü mekanizması kullanılarak biyosensörler geliştirilmesine yönelik incelemeler yapılmıştır. Soy metalik nanoparçacıklarda gelen ışığın elektrik alanı kolektif elektron bulutunda titreşim/salınım yaratır. Bu durumda, soy metal nanoparçacıklar yığın kütlelerinde gözlemlenmeyen güçlü bir morötesi-görünür soğurma bandı sergilerler. Bir nanoparçacık üzerindeki titreşimden durağan dalga oluşumu ve oluşan soğurma bandı lokalize yüzey plazmon rezonansı (LSPR) olarak bilinir. LSPR biyomekanik etkileşimleri algılamakta çok basit ve duyarlı bir dönüştürücü mekanizma sergilemektedir.

LSPR, SPR ve yüzey arttırılmış Raman spektroskopisi (SERS) tekniklerine dayalı optik sensörler, etiketleme/işaretleme gerektiren geleneksel sistemlerle karşılaştırıldıklarında daha kullanışlı bulunmaktadır. Son zamanlarda, LSPR spektroskopindeki gelişmeler, bu tekniğin biyolojik molekül etkileşimlerini saptamada son derece hassas kullanılabilmesini sağlamıştır(Van Duyne vd. 2005). Van Duyne ve grubu, LSPR ve SPR tekniklerine dayalı dönüştürücü mekanizmasını kullanarak metal nanoparçacık tabanlı biyolojik sensörleri oluşturan ilk gruplardan biridir. Doğal litografiyle üretilmiş üçgensel gümüş nanoparçacıkların LSPR ölçümlerine dayalı nanobiyosensör yapı taşları olarak kullanılabilmesi yönünde çalışmalar gerçekleştirilmiştir(Van Duyne ve Haynes 2001).

Bu tekniğin yüksek duyarlılığı, işaret kullanmadan anında (gerçek zamanlı) ölçümlere olanak sağlaması, nanoyapı substratları kullanarak yeniden üretilebilirliği ve düşük maliyeti, bu tekniği birçok alanda biyosensör uygulamaları için öne çıkarmaktadır. LSPR tekniğinin biyotanıma olaylarını algılamasına yönelik uygulamalarıyla ilgili bir sayı araştırma rapor edilmiştir. Örneğin; streptavidin(Haes ve Van Duyne 2002), concanavalin(Van Duyne vd. 2004) ve Alzheimer hastalığının biyo-belirleyicilerinin(Klein vd. 2005) algılanmasında kullanılmıştır. Biotin ile streptavidin arasındaki biyotanıma olayının algılandığı LSPR tabanlı biyosensör ölçümüne örnek Şekil 2.1'de verilmektedir. Bilindiği kadarıyla, bundan önceki tüm LSPR temelli biyosensör çalışmalarında tek tip metalden oluşan nanoparçacıkların kullanılmıştır.

Şekil 2.1. Biotinlenmiş gümüş (Ag) nanoparçacıkların hazırlanması ve streptavidin bağlanmasını gösteren LSPR spektrumları: (A) kimyasal modifikasyondan önce Ag nanoparçacıklar, $\lambda_{\max}=561.4$ nm. (B) kimyasal modifikasyon sonrası, $\lambda_{\max}=598.6$ nm (C) biotin modifikasyonu sonrası, $\lambda_{\max}=609.6$ nm (D) streptavidin bağlanması sonrası, $\lambda_{\max}=636.6$ nm (Haes ve Van Duyne 2002).

LSPR'ın biyotanıma olaylarında uygulamalarının yanında birçok araştırmacı, LSPR'ın yalıtkan malzemeler üzerindeki performansını incelemişlerdir. Pinchuk ve arkadaşları tarafından metalik, yarıiletkenler ve yalıtkanların nanoparçacık konumuna göre optik özelliklerinin kıyaslanması farklı yüksekliklerde substrat yüzeyi üzerinde gösterilmiştir(Pinchuk vd. 2004). Van Duyne ve Kreibig ise, substratla etkileşime bağlı olarak plazmon rezonansının kırmızı dalga boyunda kayma olduğunu ve bu kaymanın yüzeylerin yalıtkan sabitleriyle belirlendiğini ortaya koymuştur(Van Duyne vd. 2001). Ayrıca Van Duyne ve grubu, atomik katman alüminyum oksit kaplanmış gümüş nanoparçacıkların uzun ve kısa aralıklı LSPR'ı prob edebildiğini göstermiştir. Zhou ve diğerleri, doğal litografi kullanarak cam substrat üzerinde ürettikleri nanoboşluk dizilerinde sığır serum albümini ve biotin-streptavidin bağlanmalarının LSPR ölçümlerini gerçekleştirmiştir(Zhou vd. 2010).

Sadece soy-metal nanoparçacıklar değil aynı zamanda soy-metal dielektrik nanoyapıların LSPR özellikleri, optoelektronik cihazlar ve biyomedikal sensörler gibi işlevsel malzemelerin geliştirilmesinde önemli rol oynar. Dmitriev ve diğerleri, metal oksit nanosandviçlerin özellikleri ve dizaynını göstermiştir. Bu nanosandviçler, oksit veya dielektrik katmanlar ile ayrılan iki soy metal (altın) tabaka olmak üzere üç katmandan oluşmaktadır. Bu nanoyapıların optiksel özellikleri LSPR ile tanımlanmıştır(Dmitriev vd. 2007).

2.3 Kapasitans

Geleneksel elektrik devrelerinde kapasitörler, elektrik yükü depolama ve doğru akımı engellerken alternatif akımı iletme görevi görürler. Metal/yalıtkan/metal tabakalardan oluşan nanosandviçlerin nanokapasitör olarak kullanılma potansiyelleri literatürde grubumuz tarafından rapor edilmiştir(Zareie vd. 2008). Bu çalışmada, aralarında 100 nm mesafe bulunan, Au/Al₂O₃/Au tabakalardan oluşan nanosandviç dizileri, kapasitör özelliğine sahip devre elemanları olarak hazırlanmış ve bu nanosandviçlerin kapasitansı ölçülmüştür (Şekil 2.2). Bu projenin amaçlarından biri, metal/yalıtkan/metal dizilerinden oluşan nanosandviç dizileri üzerinde gerçekleşen biyomoleküler tanıma olaylarının algılanmasında, kapasitans ölçümlerinin bir transdüksiyon mekanizması olarak kullanılıp kullanılmayacağını araştırılmasıdır. Bilindiği kadarıyla, nanosandviç yapıların kapasitans ölçümleri, biyosensör uygulamalarında olası bir transdüksiyon mekanizması olarak literatürde henüz incelenmemiştir.

Şekil 2.2. Nanosandviçlerde yük birikmesinin zamana karşı grafiği (Zareie vd. 2008)

2.4 Nanoküre litografisi (NSL)

Litografi teknikleri, metal-yalıtkan nanoyapı dizileri üretmek için mükemmel araçlardır. Litografi teknikleri arasında “nanoküre litografisi (NSL) veya doğal litografi”, 1 cm²'den fazla alanda periyodik diziler üretmeye uygun ucuz ve kolay bir tekniktir. Bu tekniğin öncülüğünü doğal litografi adını altında 1980'lerde Deckman ve Dunsmuir(1982, 1983) yapmıştır. 1990'larda ise Van Duyne ve Van Duyne(1995) tekniği geliştirmiş ve nanoküre litografisi olarak yeniden adlandırmıştır. NSL tekniği, opto-elektronik(Van Duyne vd. 2005) ve biyosensörler(Van Duyne vd. 2005a, 2005b) gibi çeşitli uygulamalar için nano-başlık, yarı-kabuk(Halas vd. 2003; Jiang 2004) ve nanokafes(Huang ve Zhu 2007) dizileri üretmede kullanılmıştır. Bununla birlikte, bilindiği kadarıyla, NSL metallerden ve metal-yalıtkan-metal'den oluşan nanosandviçlerin biyosensör uygulamaları için üretiminde daha önce kullanılmamıştır. NSL tekniği elektron ışın litografisi ve fotolitografi gibi diğer yaygın litografi tekniklerine göre daha basit bir alternatif sunarak zaman ve maliyetten tasarruf sağlar. NSL tekniği, metal-yalıtkan-metal kompozit

nanoyapı dizilerinin üretiminde literatürde kullanılmıştır. Bir nanokapasitör gibi çalışabilen nanoyapıların ilk örneklerinden olan metal-yalıtkan-metal nanosandviç yapıları literatürde daha önce NSL tekniği kullanılarak üretilmiş ve bu üretilen nanokapasitörlerin elektron mikroskopunun ışını ile yüklenmesi sonucu düşük voltaj ürettiği rapor edilmiştir(Zareie vd. 2008).

2.5 Sıcaklık duyarlı polimerler

Sıcaklık-duyarlı polimerler, ortam sıcaklığındaki küçük değişikliklere yapısındaki büyük fiziksel değişiklikler ile tepkiler veren polimerlerdir(Minko vd. 2010). Tipik olarak bu tür polimerler kritik sıcaklık değerinin üzerinde bir sıcaklıkta uyarıldığında, çözeltideki polimer zincirlerinin konformasyonunda değişim ve faz ayrışması olur. Benzer olarak, polimer zincirleri bir yüzeye-soğurulmuş veya aşılınmış ise, sıcaklık artışı ile uyarılınca yüzeydeki polimer zincirleri çöker, ara-yüzeyi hidrofilik durumdan görece daha az hidrofilik bir hale getirir.

Faz dönüşümünün olduğu sıcaklığa düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) denir(Hoffman 1995). Bu dönüşüm tersinirdir. Yani ortam sıcaklığı, LCST'nin altına düşürüldüğünde zincirler düzensiz sargı (serbest/genişlemiş) konformasyonlarına geri dönerler. Bu tersinir konformasyon dönüşümleri defalarca sıcaklığın LCST'nin altına ve üstüne getirilmesiyle tekrarlanabilir. Polimerlerin LCST değerleri, polimerin yapısında hidrofilik veya hidrofobik bileşenler eklenerek geniş bir sıcaklık aralığında değiştirilebilir. Poli(N-izopropil akrilamid)(Chen ve Hoffman 1995) ve poli(etilen glikol metakrilat)(Lutz 2009) (PEGMA) polimerleri, biyolojik uygulamalar için uygun sıcaklık aralığında (10°C ve 50°C arasında) LCST değerlerine sahip olmaları nedeniyle en yaygın kullanılan sıcaklık duyarlı polimerlerdendir. Poli(etilen glikol) (PEG) temelli sıcaklık duyarlı polimerler ayrıca protein itici özelliğe sahip olmaları nedeniyle biyolojik uygulamalarda spesifik bağlanmaları önler veya azaltır. Sıcaklık duyarlı polimerler biyomalzemeler ve nanoteknoloji alanlarında "akıllı" malzemeler üretiminde yaygın olarak kullanılmıştır(Minko vd. 2010). Grubumuz, sıcaklık duyarlı PEG temelli moleküller kullanarak kendi kendine organize olan tek katman (self-assembled monolayer, SAM) ile modifiye edilmiş yüzeylerde avidin-biyotin bağlanmasının sıcaklık ile kontrol edilebildiğini göstermiştir(Zareie vd. 2008).

Proje kapsamında sıcaklık duyarlı PEGMA polimerleri, tersinir katılma ayrışma zincir transfer (reversible addition fragmentation chain transfer, RAFT) polimerizasyonu tekniği ile üretilmiştir. Bu polimerizasyon tekniği, kontrollü moleküler ağırlıklarda ve dar molekül ağırlık dağılımında, istenilen uç gruba sahip polimerlerin sentezlenmesi amacıyla yaygın olarak kullanılan bir yaşayan/kontrollü polimerizasyon tekniğidir(Perrier vd. 2009). Projede iyi tanımlanmış SAM'lerin hazırlanması için kullanılmış olan polimerlerin üretilmesi için RAFT tekniği en uygun tekniktir. RAFT tekniğinin polimer fırçaların(Guiquan vd. 2009) ve polimer kaplı yüzeylerin(Zhao vd. 2009) üretilmesinde son derece etkili bir teknik olduğu kanıtlanmıştır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereçler

Dietilenglikol metileter metakrilat (MEO₂MA) (sayıca ortalama molekül ağırlığı $M_n=188$ g/mol) (%95) ve oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat (OEGMA) (sayıca ortalama molekül ağırlığı $M_n=300$ g/mol) Sigma-Aldrich'ten satın alındı ve kullanmadan önce bir bazik alüminyum oksit kolonundan geçirilerek inhibitörleri uzaklaştırıldı. 2,2 –Azobisisobütironitril (AIBN) Wako Kimyasal'dan satın alındı ve kullanımdan önce iki defa metanolde yeniden kristallendirildi. 4-siyano-4-(tiyobenzoil)pentanoik asit (CDTB, %97) and tris(2-karboksiyetil)fosfin hidroklorür (TCEP, %98), 2,2'-ditiyopiridin (DTDP), dietilbromopropilfosfonat (DEBrPP, %97), (3-kloropropil)trietoksilan (CITESi, %95), trietilamin (TEA, >%99), heksilamin (HEA, %99), potasyum karbonat (K₂CO₃) Aldrich'ten satın alındı ve alındığı gibi kullanıldı. Dietileter (Sigma, >%99.7), asetonitril (Sigma-Aldrich, >%99.9), diklorometan (Sigma-Aldrich, >%99.8), dimetilformamid (DMF, Sigma-Aldrich, >%99.9), kloroform-d (Sigma-Aldrich, >%99.8), N,N-dimetilasetamid (DMAc, Sigma-Aldrich, HPLC grade >%99.9, Alfa Aesar HPLC grade >%99.5) alındıkları gibi kullanıldılar. 1000 nm, 500 nm, 200 nm (suda ağırlıkça % 10'luk çözelti, Sigma) ve 400 nm (suda ağırlıkça % 4'lük çözelti, Interfacial Dynamics) çaplı polistiren nanoküreler süspansiyon olarak alındı. Saf etanol, metanol, hidrojen peroksit (%30), sülfürik asit, amonyum hidroksit (%32) Merck'ten temin edildi. Triton X-100, tuzlu fosfat tamponu (PBS, pH=7.4), streptavidin, glutatyon, glutatyon S-transferaz (at karaciğerinden) Sigma'dan temin edildi. EZ-Link HPDP-Biotin (%99) Pierce firmasından satın alındı. Uç grupları silan ve maleimid grupları ile fonksiyonelleştirilmiş poli(etilen glikol) (silan-PEG₂₀₀₀-maleimid, M_n 2000) NANOCS firmasından satın alındı. 5'-Fosfat sonlanmış adenin dizisi (dA₈) ve eşleniği olan timin dizisi (dT₈) IDT DNA firmasından temin edildi. Silikon (Si, p-type; 100, Silicon Inc.) alındığı gibi kullanıldı. Cam alttaşlar, No. 2 Fisherbrand (18 x 18 mm) lameller Fisher Scientific'ten satın alındı. Deiyonize (DI) su (18.2 MΩcm⁻¹) ters osmoz sistemi (Thermo Scientific) ile saflaştırıldı. Cr (kaplı tungsten çubuklar), gümüş (Ag), aliminyum oksit (Al₂O₃) (%99.99) ve hafnium oksit (HfO₂) (%99.99) Kurt J. Lesker Şirketi'nden satın alındı. Altın (Au) (%99.99) kuyumcudan alındı.

3.2 Cihazlar

3.2.1 Lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ölçümleri

Nanodev Ltd. (Bilkent, Cyberpark) tarafından imal edilmiş yerli malı bir spektrometre düzeneği kullanılmıştır. Tungsten-halojen lamba ile polarize olmayan beyaz ışık yardımı ile mikroskoba optiksel bir şekilde bağlanan fiber Ocean Optics HR2000 spektrometre ile sönümlenme hesaplamaları alınmıştır. Bu çalışmada, bütün spektrumlar standart transmisyon geometri-mod ile alınmıştır. 40X (NA=0.65) veya 100X (NA=1.25) mikroskop objektifleri kullanılmıştır. Mikroskop objektifi ışığı toplarken, geçen ışık 400 µm çapındaki optik fiber kabloya odaklanıp, 450 nm ile 1100 nm aralığında çalışan spektrometreye yönlendirilmiştir. Uç-ışık nokta dedektör çapı yaklaşık 4 mm'dir. LSPR spektrumu düzeltici ve 1000 ms'lik



biriktirme süreli 10 farklı noktadan alınan ortalama ölçümler veri işleyici bir yazılım programı (SpectraSuite, Ocean Optics Inc.) yardımıyla görüntülenmiştir.

3.2.2 Yüzey plazmon rezonans spektrometresi (SPRS)

Yüzey plazmon rezonans (SPR) spektrokopisi ölçümleri Nanodev Ltd. (Bilkent, Cyberpark) tarafından imal edilmiş yerli malı SPR sistemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

3.2.3 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Topografik görüntüler oda sıcaklığında Nanomagnetics Instrument çoklumod ve Nanosurf Flex Taramalı Uç Mikroskobu ile havada ve tıklamalı (tapping) modda alınmıştır. Bütün görüntü alma işlemleri değişik tarama hızlarında 512 x 512 veri ile elde edilmiştir. Bütünleştirilmiş manivelaya sahip ve nominal yay sabiti 42 N/m olan oksit-keskinleştirilmiş silikon nitrür tipler kullanılmıştır. Bu tipler 204 ile 497 kHz rezonans frekansına ve 7 nm'den az efektif yarıçapa sahiptir. AFM görüntüleri Scanning Probe Image Processor (SPIP) yazılımı kullanılarak düzeltilmiştir.

3.2.4 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

SEM görüntüleri örnek yüklenmesine bağlı olarak 2-20 KV aralığında çalışan mercekle içi ikincil-elektron detektörlü Zeiss Ultra Plus High Resolution FE-SEM ile alınmıştır. Örnekler silikon yüzeylere damlatılıp desikatörde kurumaya bırakılmıştır.

3.2.5 X-Işını fotoelektron spektrometresi (XPS)

Kapasitans belirlemede gerçekleştirilen XPS ölçümleri için Perkin Elmer PHI 5600 ESCA sistemi kullanıldı. Bu deneyler için, XPS'in yanı sıra bir osiloskop ve fonksiyon jeneratörü kullanıldı. Örnekler, bir aktarma kolu ile donatılmış bir yük kilit bölmesi boyunca XPS haznesine yüklendi. Küçük giriş çemberindeki taban basınç 10^{-8} Torr olacak şekilde vakum uygulandı. Numuneyi UHV ana haznesine koyduktan sonra, taban basınç 5 dakika içinde 10^{-10} Torr aralığına getirildi ve veri toplama esnasında sabit bırakıldı. Her numune için topraklanmış numune ile bir harita taraması yapılmıştır (hiçbir voltaj uygulamadan). Üretilen fotoelektronlardan dolayı oluşan yüzey yükü etkisini önlemek ve numuneyi çok düşük enerjili elektronlarla yıkamak için akışkan tabancası açıldı. Daha sonra, numune taramaları üzerinde mevcut olan farklı türlerin spesifik enerji odaklama alanı kaydedildi. C1s için 265-305 eV, O1s için 515-550 eV, Si2p için 80-120 eV, Au4f için 65-105 eV. Bu taramalar sırasında 0.1 Hz'ten 250kHz'e kadar farklı frekanslar (özellikle: 0.1 Hz, 150kHz, 160, 170, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250 kHz) $\pm 10V$ 'luk genlik ile kare dalga jeneratörü (SQW) kullanılarak numuneye uygulanmıştır. Her bir frekanstaki sinyal genliği osiloskop kullanılarak ölçülmüştür (numunelere SQW jeneratör bağlamadan önce). SQW jeneratörü numunelere bağlamadan önce, sinyal frekans ve gerilim genlik osiloskop kullanılarak ölçüldü ve kare dalga üretici ile doğru değerlere ayarlandı. Daha sonra, kablo fonksiyon jeneratöründen XPS haznesi ($\pm 10V$ uygulamak için) üzerinde belirli bir bağlayıcı üzerinden farklı

frekanslar için numuneye bağlandı. Örneklerin değişik frekanslar ile $\pm 10V$ uygulanarak kapasitans özellikleri gösterildikten sonra, bir RC devresi örneklerin kapasitans değerlerinin hesaplanması için kullanılmıştır. Bu amaçla, basit bir RC devresi fonksiyon jeneratör ve XPS girişi arasında harici bir direnç bağlayarak oluşturuldu. $\pm 10V$ 'un altında SQW farklı frekanslardaki sinyaller ile koaksiyal kablonun bir yanı 10M Ω harici direnç XPS'in girişine bağlandı. Kablonun diğer tarafı fonksiyon jeneratörüne bağlandı (akışkan tabanca açık iken). Numuneler ve fonksiyon jeneratör arasına 10 MQ harici direnç bağlayarak $\pm 10V$ SQW sinyaller ve 0.1 Hz-10 kHz frekanslar uygularken XPS analizleri gerçekleştirildi.

3.2.6 Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektrometresi

Sıcaklık-duyarlı polimerlerin kimyasal karakterizasyonu için 1H NMR veya ^{31}P NMR (Varian As400-400MHz) spektrometresi kullanıldı.

3.2.7 Jel filtrasyon kromatografisi (GPC)

Üretilen polimerlerin moleküler ağırlıkları ve molekül ağırlık dağılımları ışık saçılım ve refraktif index detektörler, ve Kromatek LCC 1150 GPC kolonu (7,8 mm x 300 mm) ile donatılmış bir Viscotek GPCmax VE2001 sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Kolonların ve dedektörlerin derecesi 28 °C'de sabit tutuldu. Dimetilformamid (DMF) mobil faz olarak kullanıldı. Akış hızı 0.8 ml/dk idi. Kalibrasyon için tek standart (polistiren, Mw= 99878, PDI=1.02) kullanıldı. Moleküler ağırlık hesaplamaları için OmniSEC 4.1 yazılımı kullanıldı.

3.2.8 UV-Vis spektrometresi

Polimerin düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) Perkin-Elmer Lambda 45 Uv-vis spektrofotometre kullanılarak karakterize edildi.

3.3.9 ICP-AES elementel analiz

Polimerlerin silan uç grup modifikasyonu ICP-AES atomik emisyon spektroskopisi (Varian ICP-AES Libert Seies II) ile analiz edildi.

3.2.10. Yüzey geliştirilmiş raman spektroskopisi (SERS)

Nanodev Ltd. (Bilkent, Cyberpark) tarafından yapılan toplama RAMAN sisteminde uyarma ışık kaynağı olarak 532 nm sürekli dalga boyunda diyot-pompalanmış katı hal lazeri ve lazer kuvveti olarak 15 mW kullanılmıştır. Lazer irradiasyonu 100 μm merkez yarıçaplı lazer ile birleştirilmiş ve uygun yüksek geçiren, alçak geçiren, çentik filtreleri (Thorlabs) ışının yoluna yerleştirilmiştir. Raman detektörü olarak Ocean Optics'ten alınan 2048 piksel Lineer CCD tabakalara sahip HR2000 Spektrometreler kullanılmıştır. Bu spektrometrenin spektral tepkisi 0 ile 4000 cm^{-1} aralığındadır. SERS sinyalleri 40x objektif ile 180° gerisaçınım geometrisi ile biriktirme süresi her örnek için 1 saniye olacak şekilde elde edilmiştir. Raman

spektrumu Ocean Optics veri yakalama yazılımı SpectraSuite ilke toplanmıştır. SERS spektrumu örneklerin üzerindeki 10 farklı noktadan oda koşullarında ölçülmüştür.

3.3 Yöntemler

3.3.1 Sıcaklık duyarlı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

Dietilenglikol metileter metakrilat (MEO₂MA) ve oligo(etilen glikol) metil eter metakrilat (OEGMA) monomerlerinin homo- ve ko-polimerleri, RAFT polimerizasyonu ile üretildiler. Polimerizasyonlar 65 °C'de radikal başlatıcı olarak AIBN, zincir transfer ajanı (CTA) olarak CDTB, çözügen olarak asetonitril kullanarak gerçekleştirildi. Şekil 3.1 polimerizasyon reaksiyonunu göstermektedir. Polimerizasyonlar beslemede değişen [Toplam Monomer]/[CTA]/[AIBN] ve monomer oranları kullanılarak gerçekleştirildi. Toplam monomer konsantrasyonu, tüm polimerizasyonlar için 1 M idi. Tablo 3.1 gerçekleştirilen polimerizasyonların deney şartlarını özetlemektedir. Polimerizasyon sonrası monomer dönüşüm değerleri, ¹H NMR spektroskopisi ile belirlendi.

Şekil 3.1. MEO₂MA and OEGMA monomerlerinin RAFT tekniği ile kopolimerizasyonu şeması.

Tablo 3.1. MEO₂MA and OEGMA monomerlerinin RAFT tekniği ile kopolimerizasyon deneylerinin şartları.

Polimer Kodu	[Toplam Monomer]/ [CDTB]/[AIBN]	Besleme Kompozisyonu (mol%)		Polimerizasyon Süresi (saat.dk)
		MEO ₂ MA	OEGMA	
PT-1	[20]/[1]/[0.25]	100	0	3.00
PT-2	[50]/[1]/[0.25]	100	0	2.45
PT-3	[100]/[1]/[0.25]	100	0	3.15
PT-4	[200]/[1]/[0.25]	100	0	3.45
PT-5	[20]/[1]/[0.25]	75	25	3.00
PT-6	[20]/[1]/[0.25]	75	25	3.00
PT-7	[50]/[1]/[0.25]	75	25	3.30
PT-8	[200]/[1]/[0.25]	75	25	3.30
PT-9	[20]/[1]/[0.25]	50	50	2.30
PT-10	[20]/[1]/[0.25]	50	50	2.40
PT-11	[50]/[1]/[0.25]	50	50	3.30
PT-12	[200]/[1]/[0.25]	50	50	3.45
PT-13	[20]/[1]/[0.25]	25	75	2.15
PT-14	[40]/[1]/[0.25]	25	75	2.15
PT-15	[50]/[1]/[0.25]	25	75	3.30
PT-16	[200]/[1]/[0.25]	25	75	3.00
PT-17	[20]/[1]/[0.25]	0	100	2.00
PT-18	[50]/[1]/[0.25]	0	100	2.40
PT-19	[30]/[1]/[0.25]	0	100	5.00
PT-20	[50]/[1]/[0.25]	0	100	5.00

Üretilen kopolimerler, OEGMA içeriklerine bağlı olarak, üç farklı yöntem ile saflaştırıldı. Yüksek OEGMA içeriğine sahip kopolimerler, polimerizasyon karışımının dietileter içinde çöktürülmesi ile saflaştırıldı. Düşük miktarda OEGMA içeren kopolimerler, su/eter ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. OEGMA içermeyen poli(MEO₂MA) polimerleri, termal çöktürme yöntemi ile saflaştırıldı. Bu yöntemde polimerin sulu çözeltisi 80 °C'ye ısıtıldıktan sonra, 40 °C'de 15000 rpm'de 1 dakika süre ile santrifüj edildi. Toplanan çökelti ile aynı yöntem takip edilerek 10 kez çözme-çöktürme işlemleri tekrarlandı. Son ürün liyofilizatör ile kurutulduktan sonra elde edildi.

Saflaştırma sonrası toplanan tüm polimerlerin saflığı, polimerizasyon derecesi ve kompozisyonu ¹H-NMR spektroskopisi, molekül ağırlığı ve dağılımı ise jel filtrasyon kromatografisi ile belirlendi.

3.3.2 Polimerlerin uç grup modifikasyonları ve karakterizasyonu

Üretilen polimerler, tiyol (Şekil 3.2), fosfat (Şekil 3.3) ve silan (Şekil 3.4) fonksiyonel uç gruplara sahip olacak şekilde modifiye edildiler.

Şekil 3.2. Kopolimerlerin tiyol uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.

Şekil 3.3. Kopolimerlerin fosfat uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.

Şekil 3.4. Kopolimerlerin silan uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.

Tiyol uç grup modifikasyonu için izlenen yöntem şöyledir: Polimer, ditiyodipiridin (DTDP), heksilamin (HEA) ve trietilamin (TEA), sırasıyla 1/10/10/10 mol oranında asetonitril içinde çözüldüler. Reaksiyon çözeltisi, 30 dakika boyunca azot ile süpürüldükten sonra ağzı kapatılarak 3 saat karıştırıldı. Reaksiyon sonrası piridildisülfid (PDS) modifiye polimer eter çöktürmesi veya su/eter ekstraksiyonu ile saflaştırıldı. Polimer ¹H-NMR spektroskopisi ile analiz edildi.

Fosfonat uç grup modifikasyonu 2 adımlı bir yöntem izlenerek gerçekleştirildi. Yöntem kısaca şöyledir: İlk adımda, oda sıcaklığında polimer, heksilamin (HEA) ve trietilamin (TEA), sırasıyla 1/10/10 mol oranında asetonitril içinde çözüldüler. Karışım azot atmosferi altında 3 saat karıştırılarak aminoliz reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon sonrası eter çöktürmesi ile elde edilen tiyol-uç gruplu polimer (60 mM), asetonitril içinde potasyum karbonat (1.8 mol eşdeğer) varlığında dietilbromopropilfosfonat (DEBrPP) (1.2 mol eşdeğer) ile 24 saat boyunca Michael-katılma reaksiyonuna sokuldu. Reaksiyon sonrası karışım eter içinde çöktürülerek fosfonat-uç gruplu polimerler elde edildi. Modifiye olmuş polimerlerin karakterizasyonu ¹H-NMR ve ³¹P-NMR spektrometreleri ile yapıldı.

Silan uç grup modifikasyonu fosfonat modifikasyonuna benzer şekilde 2 adımlı bir yöntem izlenerek gerçekleştirildi. Yöntem kısaca şöyledir: İlk adımda, oda sıcaklığında polimer, heksilamin (HEA) ve

triethylamin (TEA), sırasıyla 1/10/10 mol oranında asetonitril içinde çözüldüler. Karışım azot atmosferi altında 3 saat karıştırılarak aminoliz reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu reaksiyon sonrası eter çöktürmesi ile elde edilen tiyol-uç gruplu polimer (60 mM), asetonitril içinde potasyum karbonat (3 mol eşdeğer) varlığında (3-kloropropil)trioksilan (CITESi) (2 mol eşdeğer) ile 24 saat boyunca Michael-katılma reaksiyonuna sokuldu. Reaksiyon sonrası karışım eter içinde çöktürülerek silan-uç gruplu polimerler elde edildi. Modifiye olmuş polimerlerin karakterizasyonu ¹H-NMR spektrometresi ve ICP-AES elemental analiz ile yapıldı. ICP-AES için örnekler (10 mg/ml) nitrik asit çözeltisi (%2.5 v/v) ile muamele edildikten sonra nitrik asit kör çözeltisine karşı ölçüldü.

3.3.3 Polimerlerin sıcaklık duyarlı davranışlarının belirlenmesi

Modifiye edilmiş ve edilmemiş polimerlerin düşük kritik çözelti sıcaklığı (LCST) UV-vis spektrofotometre kullanılarak belirlendi. 1 mg/ml konsantrasyonda polimerlerin su içinde çözeltileri hazırlanmıştır. Çözeltinin sıcaklık artışı ile absorbans değişimi 3°C/dk bir ısıtma hızı ile 500 nm dalga boyunda kaydedilmiştir. Maksimum absorbansın % 10'unda gözlenen sıcaklık değeri polimerin LCST değeri olarak kabul edilmiştir.

3.3.4 Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve karakterizasyonu

İzlenen yöntem Şekil 3.5'de şematik olarak sunulmuştur. İlk adımda dizilerin oluşturulacağı alttaşlar hazırlandı. Bu amaçla, öncelikle cam ve silikon alttaşlar 65°C 'de 30 dk piranha çözeltisine (3:1, 30% H₂SO₄: H₂O₂ DİKKAT!) daldırıldı. Alttaşlar oda sıcaklığında soğutuldu, cam alttaşlar yüzeyi hidrofilik yapmak için DI su ile yıkandı ve sonra 5:1:1 H₂O:NH₄OH:30% H₂O₂ içerisinde 60 dakika ultrasonik banyoda tutuldu. Alttaşlar bol miktarda su ile yıkandı ve kullanılıncaya kadar su içerisinde saklandı. Kullanım öncesi alttaşlar azot gazı altında kurutuldu, takiben 75°C'de etüvde 30 dakika süre ile tutuldular.

Dönel kaplama öncesinde iyi bir istifleme için polistiren kürelerin sulu süspansiyonu metanol içinde Triton X-100 (1:400 v/v) çözeltisi ile seyreltildi. Nanoküre litografisi (NSL) maskelerini üretmek için, nanoküreler altıgen sıkı istifli tek tabaka şeklinde oluşturuldu. Bunun için öncelikle süspansiyon kullanılmadan önce ultrasonik banyoda tutuldu ve vorteks ile karıştırıldı. Daha sonra, süspansiyondan 10 µL alttaş üzerine damlatıldı. Nanokürelerin boyutuna göre 2000 rpm 'de 40 saniye(Zareie vd. 2010) veya 3-basamak(Cheung vd. 2006) metodunda dönel kaplama sistemi (Laurell) kullanılarak altıgen sıkı istifli tek tabaka nanoküre maskesi oluşturuldu.

Nanoküre maskesi taşıyan alttaşlar, minimum 4 saat süre ile vakumlanmış, $\approx 8 \times 10^{-6}$ Torr'luk temel basınçta tutulan kaplama cihazının vakum biriktirme haznesinde sabitleştirildi. Tek Au tabakası ve Au / Al₂O₃ / Au çokkatmanlı yapılar Au için NANOVAK termal buharlaştırıcı ve Al₂O₃ (Alumina) için RF magnetron saçılım kullanılarak nanoküre maske üzerine biriktirildi. Au / HfO₂ / Au, HfO₂ (Hafniyum Oksit)

çokkatmanlı yapılar hazırlamak için saçılım 20 mTorr basınçta Ar akışı varlığında gerçekleştirilirken, sadece RF magnetron saçılım sistemiyle donanımlı Vaksis birikim haznesinde çöktürüldü. Birikim hızı ve film kalınlığı kuartz kristalli mikro terazi ile izlendi. Her tabakanın kalınlığı 20 ile 50 nm arasında değiştirildi. Metal birikiminden sonra, nanoküreleri kaldırmak için her örnek kaplanan metalin kalınlığına göre 2 ila 5 dakika arasında ultrasonik banyoya yerleştirilmiş diklorometan çözeltisi içinde tutuldu. Daha sonra örnekler diklorometan ile yıkanarak azot gazı altında kurutuldu. Sonuçta oluşturulan nanosandviç dizileri, XPS, AFM ve SEM ile karakterize edildi.

Şekil 3.5. Nanoküre litografisi (NSL) ile nanosandviç dizileri hazırlama yönteminin şematik gösterimi. (A) polistiren tanelerin dönele kaplaması, (B) metallerin birikimi, (C) kaldırma, (D) tek altıgen nanosandviç dizisi

3.3.5 Nanosandviç dizilerinin polimerler ve biyolojik moleküller ile işlevselleştirilmesi

Nanodiziler öncelikle kontrol amaçlı sadece üretilen polimerler ile işlevselleştirilmiştir. Bu deneylerde izlenen yöntem şöyledir: Sadece tek katman içeren nanodiziler (sadece Au, Al₂O₃ veya HfO₂ katmanı) veya Au / Al₂O₃ / Au ve Au / HfO₂ / Au nanosandviç dizilerin öncelikle ara katmanları (Al₂O₃ ve HfO₂), ilgili uç gruba sahip polimer ile 24-48 saat inkübe edildi. Au, Al₂O₃ ve HfO₂ katmanlarının işlevselleştirilmesi için sırasıyla, tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerler kullanıldı. Tiyol ve fosfonat uç gruplu polimerler (0.01 mM) etanol içinde yüzey ile inkübe edilirken, silan uç gruplu polimer (0.5 mM) %3 DI su içeren etanol içinde yüzey ile inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, yüzeyler etanol ile defalarca yıkandı ve azot akışı ile kurutuldu. Nanosandviç dizilerinin dış Au katmanlarının işlevselleştirilmesi için ara katmanı polimerler ile bağlanmış yüzeyler etanol içinde tiyol uç gruplu polimer (0.01 mM) ile 24-48 saat süresince inkübe edildi. Sonuçta elde edilen yüzeyler etanol ile yıkanıp azot akışı altında kurutuldu. Bütün deneyler havasız ortam kabininde gerçekleştirildi. İşlevselleştirme işlemleri her bir katmanın modifikasyonundan sonra AFM, XPS, LSPR ve/veya SPR analizleri ile doğrulandı.

Bir sonraki adımda nanosandviç dizileri, polimer ve ilgili biyolojik moleküllerin karışımı ile işlevselleştirildi. Bu amaçla, Au / Al₂O₃ / Au veya Au / HfO₂ / Au nanokatmanlı diziler, öncelikle ara katmanlarının

modifikasyonu için (Al_2O_3 ve HfO_2 katmanı), sırasıyla fosfonat uç gruplu polimer ve oligo(adenin) (dA_8) veya silan uç gruplu polimer ve silan-PEG₂₀₀₀-maleimid karışımı (toplam konsantrasyon= 0.1 mM; polimer:dA veya polimer:PEG mol oranı= 9:1) ile 24 saat süre ile inkübe edildi. Al_2O_3 modifikasyonu için DI su, HfO_2 modifikasyonu için hacimce %3 su içeren etanol çözeltisi dağıtıcı ortam olarak kullanıldı. İnkübasyon sonrası yüzeyler etanol veya soğuk su ile yıkandılar. HfO_2 katman içeren yüzey, bağlanmış PEG-maleimid moleküllerine glutatyon bağlanması amacıyla, fosfat tampon (pH 7.4) içinde, glutatyon (0.1 mM) ve TCEP (1 mM) ile 5 saat boyunca azot atmosferi altında reaksiyona sokuldu. Bunu takiben çözeltiye eşdeğer miktarda TCEP eklenip, çözelti azot ile tekrar süpürüldü. Ertesi gün yüzey DI su ile yıkandı. İkinci adımda, ara katmanları işlevselleştirilmiş yüzeylerin Au katmanları, tiyol uç gruplu polimer ve EZ-Link HPDP-biotin karışımı (toplam konsantrasyon= 0.1 mM; polimer:biotin mol oranı= 9:1) ile 24 saat süre inkübe edilerek modifiye edildi. İnkübasyon sonrası yüzeyler etanol ile yıkandı ve kurutuldu. İşlevselleştirme işlemleri her bir katmanın modifikasyonundan sonra XPS, LSPR ve/veya SPR analizleri ile doğrulandı.

Ayrıca kontrol deneylerinde yukarıda verilen yöntemler takip edilerek, tek katman içeren nanodizilere (sadece Au, Al_2O_3 veya HfO_2 katmanı); (1) biyomoleküllerin (EZ-Link HPDP-biotin; dA_8 ; silan-PEG-maleimid ve glutatyon) seçici olan ve olmayan bağlanmaları; ve (2) tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerlerin seçici olmayan bağlanmaları gözlenmeye çalışıldı. Spesifik bağlanmalar ve spesifik olmayan bağlanmaların olup olmadığı, Au yüzeylerde SPR ve/veya LSPR; Al_2O_3 ve HfO_2 yüzeylerde ise SERS ve/veya XPS ile karakterize edildi.

3.3.6 Biyomolekül tanıma olaylarının LSPR ve XPS kapasitans ölçümleri ile belirlenmesi

Öncelikle polimer ve biyomoleküller (biotin, dA_8 veya glutatyon) ile işlevselleştirilmiş tek katman yüzeyler veya nanosandviç yüzeylerin sadece tek katmanları kullanılarak biyomolekül tanıma olayları ölçüldü. Bu deneylerde PBS içinde yüzeyler, kullanılan polimerin LCST değerinin 5-6 °C üzerinde bir sıcaklığa ulaşacak şekilde ısıtıldılar. Daha sonra, aynı sıcaklık değerine ısıtılmış ligand çözeltisi (streptavidin, dT_8 veya glutatyon S-transferaz) (2 μM , PBS içinde) 30 dakika süresince yüzeyler ile inkübe edildi. Yüzeyler biyobağlanma olayı öncesi ve sonrası LSPR ve/veya XPS kapasitans ölçümleri ile analiz edildi.

Sonraki adımda işlevselleştirilmiş Au / Al_2O_3 / Au nanokatmanlı dizilere sahip yüzeyler, PBS içinde, ara katman modifikasyonu için kullanılan polimerin LCST değerinin 5-6 °C üzerinde bir sıcaklığa ulaşacak şekilde ısıtıldılar. Aynı sıcaklık değerine ısıtılmış ligand çözeltisi (streptavidin veya dT_8 veya her ikisinin karışımı) (2 μM , PBS içinde) eklenerek, 30 dakika süresince yüzeyler ile inkübe edildi. Yüzeyler PBS ile yıkandıktan sonra LSPR ile ölçümleri alındı. Bu işlemi takiben yüzeyler Au katmanı modifikasyonu için kullanılan tiyol uç gruplu polimerin LCST değerinin 5-6 °C üzerinde bir sıcaklığa ulaşacak şekilde ısıtıldılar. Daha sonra aynı sıcaklıkta ikinci ligand çözeltisi (streptavidin veya dT_8 veya her ikisinin

karışımı) (2 μM , PBS içinde) ile 30 dakika süresince inkübe edildiler. Son olarak yüzeyler PBS ile yıkandıktan sonra LSPR ile analiz edildiler.

İşlevselleştirilmiş Au / HfO_2 / Au nanokatmanlı dizilere sahip yüzeylerde biyotanıma olayları yukarıdaki yöntemlerin aynısı takip edilerek incelendi. Ancak bu durumda dT_8 yerine glutatyon S-transferaz ligand olarak kullanıldı.

Kontrol deneylerinde yukarıda verilen yöntemler takip edilerek, nanosandviç dizilere ligandların seçici olmadan bağlanıp bağlanmadıkları ayrıca kontrol edildi. Bu deneylerde, ilgili biyomolekülü içermeyen yüzeyler yukarıda verilen yöntem takip edilerek ligandlar ile inkübe edildiler. Örneğin dA_8 içermeyen Au / Al_2O_3 / Au nanokatmanlı yüzey, uygun ısıtma rejimi altında dT_8 ile inkübe edilerek LSPR ile spesifik olmayan bağlanmaların olup olmadığı test edildi.

4. BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Uç grup fonksiyonel sıcaklık duyarlı polimerlerin sentezi ve karakterizasyonu

Öncelikle değişen sıcaklıklarda açma-kapama mekanizmasına sahip sıcaklık duyarlı polimerlerin sentezi için, 5 farklı besleme kompozisyonu kullanılarak 4 farklı polimerleşme derecesi (DP) ($\overline{DP} \approx 10$, $\overline{DP} \approx 20$, $\overline{DP} \approx 30$, $\overline{DP} \approx 5$) hedeflenerek bir seri iyi-tanımlanmış polimerin sentezi RAFT polimerizasyonu ile gerçekleştirildi. Tablo 4.1, bu polimerizasyonlar sonucu sentezlenen kopolimerlerin özelliklerini göstermektedir. Tablodan görüleceği üzere, değişen molekül ağırlıklarda, dar molekül ağırlık dağılımına (<1.2) ve değişen kompozisyona sahip iyi-tanımlanmış kopolimerler üretilmiştir. Yüzeylerin modifikasyonunda sterik engellemeler nedeniyle sorun yaşanmaması için özellikle 10000 g/mol ağırlığının altında kalacak şekilde kısa polimerler üretilmiştir. Kopolimerlerin uç grup modifikasyonu öncesi LSCT değerleri ölçülmüştür. Beklendiği gibi kopolimerlerin OEGMA içeriği arttıkça LCST değerleri artmıştır. OEGMA, hidrofilik bir monomer olduğu için, kopolimerin OEGMA içeriği arttıkça kopolimer daha hidrofilikleşir ve su içinde çökmesi zorlaşır. Bu durum LCST'nin yükselmesine neden olur. Tablodan görüleceği üzere 20°C ile 70°C arasında geniş bir sıcaklık aralığında faz değiştirme özelliğine sahip kopolimerler değişen molekül ağırlıklarda başarıyla üretilmiştir.

Bir sonraki adımda, kopolimerlerin ω -zincir ucunda bulunan RAFT grupları, yöntem kısmında ayrıntılı bir şekilde anlatıldığı gibi piridildisülfid (PDS) korumalı tiyol, fosfonat veya trietoksisilan fonksiyonel gruplarına çevrildi. PDS uç grup modifikasyonu ^1H NMR ile doğrulandı. Şekil 4.1'de verilen ^1H NMR spektrumunda polimerin RAFT uç grubunun PDS ile değiştiği açık bir şekilde gözlenmektedir. RAFT uç grubunun 7.4, 7.5 ve 7.9 ppm'de olan fenil proton kaymaları, uç grup modifikasyonu sonrası kaybolmuş ve PDS grubunun proton kaymaları açıkça görülmüştür.

Kopolimerlerin RAFT uç grubu ayrıca, Al_2O_3 yüzeylere bağlandığı bilinen fosfonat grubu ile modifiye edildi. Bu amaçla kopolimerlerin, aminoliz reaksiyonu ile RAFT uç grupları tiyole çevrildi. Bunu takiben tiyol uç gruplu polimerler dietil bromopropil fosfonat (DEBrPP) ile reaksiyona sokuldu. Uç grubun fosfonat ile modifikasyonu 1H NMR ve ^{31}P NMR spektroskopisi ile doğrulandı. Şekil 4.2 PT-1 kodlu (Tablo 4.1) kopolimerin fosfonat modifikasyonu öncesi ve sonrası 1H -NMR spektrumlarını göstermektedir. RAFT uç grubunun uzaklaştığı 7.3-7.9 ppm arasındaki sinyallerin kaybolmasıyla açıkça gözlenmiştir. Aynı kopolimerin modifikasyon sonrası ^{31}P NMR spektrumu Şekil 4.3'de verilmiştir. Aynı şekilde modifikasyon ajanı DEBrPP'nin spektrumu da verilmektedir. DEBrPP'nin 30.4'de tek bir karakteristik ^{31}P sinyali vardır. Aminoliz olmuş tiyol uç gruplu polimer ile DEBrPP'nin tiyol-brom reaksiyonu sonrası saflaştırılmış kopolimerin ^{31}P NMR spektrumunda 31.0 ppm'de tek bir pike rastlanmıştır. Bu bulgu kopolimerin RAFT uç grubunun fosfonat grubu ile başarıyla modifiye olduğunu ispatlamıştır.

Kopolimerlerin RAFT uç grubu son olarak, HfO_2 yüzeylere bağlandığı bilinen trietoksisilan grubu ile modifiye edildi. Bu amaçla fosfonat grubu modifikasyonuna benzer bir sentetik yol izlendi: Kopolimerlerin, önce aminoliz reaksiyonu ile RAFT uç grupları tiyole çevrildi. Bunu takiben tiyol uç gruplu polimerler, (3-kloropropil)trietoksisilan (CITESi) ile tiyol-klor katılma reaksiyonuna sokuldu. Uç grubun silan ile modifikasyonu 1H NMR spektroskopisi ve elementel analiz ile doğrulandı. Şekil 4.4 PT-1 kodlu (Tablo 4.1) kopolimerin silan modifikasyonu ve saflaştırma sonrası alınmış 1H NMR spektrumunu göstermektedir. RAFT uç grubunun uzaklaştığı 7.3-7.9 ppm arasındaki sinyallerin kaybolmasıyla gözlenmiştir. Ayrıca aynı spektrumda modifiye olmuş kopolimerin saf olduğu ve uzaklaştırılmamış CITESi bileşenin olmadığı gözlenmiştir. Örnek, daha sonra ICP-AES elementel analiz ile de incelenmiştir. Bu analiz sonucu örneğin yaklaşık %80 (molce) Si içerdiği ortaya çıkmıştır. Genel olarak polimerin molekül ağırlığına bağlı olarak Si modifikasyonun molce %20 ile 80 arasında değiştiği bulunmuştur. Molekül ağırlık arttıkça modifikasyon derecesi azalmıştır. Silan ile modifiye edilmiş polimerlerin ^{29}Si NMR spektroskopisi ile analizinin de yapılmaya çalışıldığı, ancak polimer örneklerinin genel olarak sinyallerinin az olması ve buna bağlı olarak çok miktarda örneğe ihtiyaç duyulması nedeniyle analizlerden sonuç alınmadığı not edilmelidir. Sonuç olarak, üretilen kopolimerlerin uç grup modifikasyonları için yöntemler başarıyla oturtulmuştur.

Tablo 4.1. Çalışmada sentezlenen kopolimerlerin NMR ve GPC ile elde edilmiş sayıca ortalama molekül ağırlıkları (M_{nNMR} ve M_{nGPC}), polimerleşme dereceleri (DP), molekül ağırlık dağılımları (PDI), kompozisyonları, ve uç grup modifikasyonu öncesi ve sonrası LCST değerleri. DP ve kompozisyon saflaştırılmış kopolimerlerin 1H NMR analizlerinden elde edilmiştir.

Örnek Kodu	M_{nNMR}	DP	M_{nGPC}	PDI	Kopolimer Kompozisyonu (mol%)		LCST (°C)			
					MEO ₂ MA	OEGMA	Modifikasyon Öncesi	Tiyol Uç Grubu	Fosfonat Uç Grubu	Silan Uç Grubu
PT-1	2.3K	11	2.4K	1.15	100%	0%	<14.0	34.9±0.6	35.5±0.5	48.4±0.7
PT-2	3.6K	18	3.2K	1.14	100%	0%	22.4±0.2	38.1±0.6	35.6±0.8	51.0±0.6
PT-3	5.8K	29	4.4K	1.22	100%	0%	25.8±0.2	35.8±0.2	32.8±0.4	44.9±0.3
PT-4	9.7K	53	8.6K	1.18	100%	0%	30.9±0.9	31.6±0.3	31.1±0.7	39.3±0.2
PT-5	2.4K	10	2.0K	1.20	77%	23%	19.3±0.8	58.8±0.7	53.0±1.4	Ölçülmedi
PT-6	4.3K	19	3.2K	1.08	74%	26%	42.8±0.8	51.5±0.5	49.1±0.4	61.7±0.8
PT-7	6.1K	27	4.7K	1.08	75%	25%	47.5±0.5	51.4±0.3	51.5±0.1	62.1±0.7
PT-8	11.7K	53	9.6K	1.21	75%	25%	46.3±0.2	47.5±0.5	47.2±0.1	55.1±0.5
PT-9	3.4K	12	2.9K	1.08	51%	49%	51.1±1.0	60.3±0.7	61.4±0.9	Ölçülmedi
PT-10	4.9K	19	3.4K	1.14	50%	50%	54.7±0.6	65.3±0.6	62.2±0.2	Ölçülmedi
PT-11	7.5K	29	4.9K	1.18	51%	49%	57.2±0.2	59.6±0.8	61.5±0.5	Ölçülmedi
PT-12	13.7K	55	10.3K	1.29	51%	49%	56.7±0.6	56.9±0.7	57.7±0.5	Ölçülmedi
PT-13	3.2K	11	2.6K	1.09	25%	75%	57.0±0.7	Ölçülmedi	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-14	4.9K	17	3.0K	1.15	25%	75%	64.7±0.3	Ölçülmedi	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-15	8.2K	29	5.2K	1.23	25%	75%	66.4±0.2	Ölçülmedi	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-16	13.0K	47	9.0K	1.21	26%	74%	68.3±0.3	Ölçülmedi	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-17	3.3K	10	2.2K	1.20	0%	100%	66.5±0.5	76.0±1.6	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-18	5.6K	18	3.5K	1.15	0%	100%	72.8±0.6	81.0±0.9	Ölçülmedi	Ölçülmedi
PT-19	8.7K	28	6.0K	1.17	0%	100%	73.7±0.3	75.0±0.4	Ölçülmedi	Ölçülmedi

Şekil 4.1. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) PDS modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst) ^1H NMR spektrumları.

Şekil 4.2. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst), ve DEBrPP bileşiğinin (en üst) ^1H NMR spektrumları.

Şekil 4.3. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası ^{31}P NMR spektrumu. İçteki spektrum DEBrPP bileşiğine aittir.

Şekil 4.4. Üst spektrum: CITESi bileşiğinin ^1H NMR spektrumu; Alt spektrum: PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) CITESi ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası alınan ^1H NMR spektrumu.

Üretilen sıcaklık duyarlı polimerlerin uç grup modifikasyonları öncesi ve sonrası sıcaklık duyarlı davranışları UV-vis spektrometresi ile 500 nm'de incelenmiştir. Polimer çözeltisinin (1 mg/ml) maksimum absorbansının % 10'unda gözlenen sıcaklık değeri polimerin LCST değeri olarak kabul edilmiştir. Her bir ölçüm en az 2 kere tekrarlanıp, ölçümlerin ortalaması rapor edilmiştir. Polimer zincirleri, LCST değerinin altında bir sıcaklık değerinde genişlemiş halde rasgele sargı konformasyonundadırlar. Sıcaklık LCST değerine ulaştığında, polimer zincirleri içe geçerek yoğun globular konformasyona geçerler. Bu faz değişimi, polimer çözeltisinin bulanıklığında artışa sebep olur. LCST değerinin üstündeki sıcaklıklarda polimer çözeltisinin absorbansı önemli şekilde keskin bir artış gösterir. Bu davranış, Şekil 4.5'de açıkça görülmektedir. Tablo 4.1'de üretilen kopolimerlerin uç grup modifikasyonu öncesi ve sonrası LCST değerleri verilmiştir. Tablodan görüleceği üzere, düşük molekül ağırlığına sahip kopolimerlerde uç grup modifikasyonu LCST değerlerinde önemli değişikliklere sebep olurken, molekül ağırlık arttıkça uç gruptaki değişikliklerin LCST üzerine etkisi azalmıştır. Uç grubun hidrofilik veya hidrofobik yapısındaki değişiklik, polimer zincirinin uzunluğu arttıkça polimerin toplam hidrofilikliğine etki göstermemektedir. Polimerleşme derecesi (DP) yaklaşık 10 olan düşük molekül ağırlığına sahip polimerlerde RAFT uç grubunun daha hidrofilik yapıda olan PDS grubuyla yerdeğiştirmesi sonucu polimerlerin LCST değerleri yaklaşık 20°C, DP değeri yaklaşık 20 olan polimerlerde LCST değerleri yaklaşık 15°C, DP değeri 30 olan polimerlerde yaklaşık 10°C artış gösterirken, DP değeri 50 olan polimerlerde değişiklik gözlenmemiştir. Fosfonat ve trietoksisilan grubu modifikasyonları benzer şekilde LCST değerlerini etkilemiştir. Ancak PDS grubuna göre fosfonat uç grubuna sahip polimerlerin LCST değerleri, DP'nin 50'den daha az olduğu durumlarda, polimerin molekül ağırlığı ve kompozisyonuna bağlı olarak 0 ila 5 °C arasında daha düşük bulunmuştur. Trietoksisilan grupları ise, polimerlerin DP değerlerine bağlı olarak, PDS uç grubuna göre 6 ila 14 °C LCST'de artışa sebep olduğu gözlenmiştir. Silan grubunun hidrofobik karakterine karşılık trietoksi gruplarının güçlü hidrofilik karakteri nedeniyle LCST'deki artışın olduğu düşünülmektedir. Sonuç olarak LCST değerleri yaklaşık 31 ila 65 °C arasında değişen, farklı molekül ağırlıklarda, PDS korumalı tiyol, fosfonat ve trietoksisilan fonksiyonel sıcaklık duyarlı polimerler başarıyla üretilmiştir.

Şekil 4.5. RAFT, PDS, fosfonat ve trietoksisilan uç gruplarına sahip PT-3 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) sıcaklık duyarlı davranışları.

4.2 Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve karakterizasyonu

Nanoparçacık (tek katmanlı) ve nanosandviç (üç katmanlı) dizileri yöntem kısmında ayrıntılı şekilde anlatıldığı gibi nanoküre litografisi (NSL) kullanılarak hazırlanmıştır. NSL, 200-1000 nm aralığında çapa sahip polistiren (PS) küreler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Altıgenler oluşturarak sıkı şekilde yüzeyde istiflenmiş olan PS küreler, metal ve yalıtkanların (Au, Al₂O₃ ve HfO₂) yüzeyde birikmesi için bir maske olarak kullanılmıştır. Buhar biriktirme teknikleri kullanılarak maske üzerine kaplanmış metal ve yalıtkan malzeme, altıgen sıkı istifler şeklinde yüzeyi kaplamış PS kürelerin aralarında kalan üçgen boşlukların üzerini de kaplar. PS nanokürelerin yüzeyden kaldırılması sonucu 200 nm ile 400 nm arasında boyutları değişen üçgen nanoyapıların dizileri oluşturulmuştur. Şekil 4.6A ve B, PS nanokürelerin kaldırma işleminden önce ve sonra hazırlanan Au kaplı yüzeylerin SEM ve AFM mikrograflarını göstermektedir. AFM ile alınan çizgi profile PS nanokürelerin boyutlarını 500 nm olarak göstermiştir. Nanoküreleri kaldırma işleminden sonra AFM görüntüsü çizgi profili, üçgen nanoyapıların birikme işlemi boyunca bir kuartz kristal mikrobalsan yardımıyla ölçülen 50 nm kalınlıkta Au tabakasıyla uyumlu şekilde yaklaşık 50 nm yükseklikte tabakanın varlığını göstermiştir (çizgi profilleri gösterilmemiştir). Şekil 4.6D, silikon alttaş üstünde oluşturulmuş Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin AFM görüntüsünü göstermektedir. Yüzeyde oluşan nanoparçacık kalınlığına (yüksekliğine) göre LSPR maksimum dalga boyu (λ_{max}) değişimi, Şekil 4.6C'deki LSPR spektrumlarının kıyaslanması ile açıklanabilir. Aynı şekil ve çap değerleriyle fakat 50, 30 ve 20 nm gibi farklı kalınlıklara sahip üçgen nanoparçacıkların spektrumları sırasıyla 739,1 nm (Şekil 4.6C, 1 no'lu pik), 764.0 nm (Şekil 4.6C, 2 no'lu pik) ve 794,7 nm'lik (Şekil 4.6C, 3 no'lu pik) LSPR λ_{max} değerleriyle kırmızı bir kayma göstermiştir.

Beklendiği gibi, nanoparçacıkların kalınlığı (yüksekliği) azaldıkça, LSPR kayma artmıştır. Bu kayma düşük yükseklikteki nanoparçacıkların elektromanyetik alanlarının büyüklüğündeki artış nedeniyledir.

Au tek katman nanoparçacık dizileri ile Au / Al₂O₃ / Au üç katman nanosandviç dizilerinin karşılaştırılması amacıyla alınmış AFM görüntüleri Şekil 4.7 A ve B'de verilmektedir. AFM görüntülerinde farklı katmanların oluşumu açıkça gözlenmiştir. Benzer şekilde Au tek katman nanoparçacık dizileri ile Au / Al₂O₃ / Au ve Au / HfO₂ / Au üç katman nanosandviç dizilerinin LSPR spektrumları, sırasıyla, Şekil 4.7 C ve D'de verilmektedir. Görüleceği üzere tek katman nanoyapılar ile çok katman nanoyapılar karşılaştırıldığında LSPR spektrumlarında kırmızı kayma gözlenmiştir. Ayrıca özdeş şekil ve çapa sahip olmalarına rağmen, nanoyapıların bileşiminden ve katman kalınlıklarından kaynaklanan tepe oluşumları gözlenmiştir. Nanoyapıların yüksekliği azaldığında, beklenildiği gibi, gelen ışığın absorpsiyonuna göre sönümlenme azalır. Şekil 4.7D'de 20 nm Au/ 20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviçler ile tek katmanlı Au nanodotlarının kıyaslamasının LSPR λ_{max} değerini göstermektedir. Tek katmanlı 50 nm Au nanodotların LSPR λ_{max} değeri 712 nm iken, 20 nm Au/ 20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviçlerin LSPR λ_{max} değeri 898 nm'yi göstermektedir. Bu kaymalar, daha büyük olanlara kıyasla daha az yükseklikteki nanoparçacıkların elektromanyetik alanlarının yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Ek olarak, yüzeydeki kırılma indisinin değişimi ve buna direkt olarak bağlı olan dielektrik sabitleri arasındaki fark orta katmanları sırasıyla HfO₂ ve Al₂O₃ olan örneklerdeki kırmızıya kayma miktarları arasındaki farka neden olmaktadır. Kırılma indisinde artma olduğu zaman elektronların salınım frekansında azalma olur ve LSPR λ_{max} değerinde kırmızıya kayma görülmesine neden olur. Dolayısıyla, beklenildiği gibi dielektrik sabiti Al₂O₃'e göre 4-5 kat büyük olan HfO₂'nin LSPR λ_{max} değeri Al₂O₃'ninkine göre daha yüksektir.

Son olarak kontrol deneyi olarak, nanoküre litografisinde PS nanokürelerin çaplarının oluşan nanodizilerin LSPR kaymalarına etkileri belirlendi. Bu amaçla gümüş (Ag) tek katman nanoparçacık dizileri, 0.5 veya 1 μ m çapa sahip PS nanoküreler kullanılarak gerçekleştirilen litografi ile hazırlandı. Şekil 4.8, hazırlanan nanoparçacık dizilerinin LSPR spektrumlarını göstermektedir. Görüleceği üzere, NSL maskesinde nanokürelerin çapının büyümesi, dizilerin UV-vis absorpsiyonunu kırmızı ötesi bölgeye doğru kaydırmıştır. Maskeyi oluşturan nanoküre boyutu büyüdükçe, dizide oluşan üçgen nanoparçacıkların boyutları büyür. Bu da LSPR kaymasını daha yüksek dalga boyuna kaydırır.

Şekil 4.6. (A) 500 nm çapında polistiren kürelerin altıgen sıkı istif dizisinin SEM görüntüsü. Panel A'nın içindeki ek görüntü, 1.5x1.5 μm tarama alanı ile yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (B) Nanoparçacık dizilerin SEM görüntüsü. Panel B'nin içindeki ek görüntü 800x800 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (C) Cam üzerinde Au nanoparçacık dizilerinin LSPR kayma spektrumları. Spektrumlar, 200 ± 5 nm sabit çaplı ve değişen kalınlıklarda nanoparçacıklara aittir (1) 50 nm, $\lambda_{\text{max}} = 739,1$ nm; (2) 30 nm, $\lambda_{\text{max}} = 763,9$ nm; (3) 20 nm, $\lambda_{\text{max}} = 794,7$ nm. (D) Silikon alttaşı üstünde oluşturulmuş Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin 700x700 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsü.

Şekil 4.7. Silikon alttaş üstünde oluşturulmuş (A) Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin ve (B) Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizisinin AFM görüntüleri; (C) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, λ_{\max} = 700 nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 835 nm. D) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, λ_{\max} = 712 nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 898 nm.

Şekil 4.8. Cam üstünde oluşturulmuş Ag tek tabaka nanoparçacık dizisinin NSL’de kullanılan PS mikroküre çapına göre LSPR spektrumları: (A) 0.5 μm PS; $\lambda_{\text{max}}= 569$ nm. (B) 1 μm PS $\lambda_{\text{max}}= 880$ nm.

Özetle, NSL kullanılarak, tek katman nanoparçacık ve metal / yalıtkan/ metal üç katman nanosandviç dizileri kontrollü kalınlık, şekil ve büyüklük ile başarıyla farklı alttaşlar üzerinde hazırlanmıştır.

4.3 Nanosandviç dizilerinin polimerler ile işlevselleştirilmesi

Şekil 4.9A, Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizilerinin Au katmanının tiyol uç gruplu polimer (PT-2 kodlu, tiyol uçlu, Tablo 4.1, LCST: 38.1°C, MnGPC: 3.2 kg/mol) ile modifikasyonunu şematik olarak göstermektedir. Modifikasyon öncesi ve sonrası AFM görüntüleri, sırasıyla, Şekil 4.9B ve C’de verilmektedir. Modifikasyon öncesi nanosandviçlerin ortalama yüksekliği, çizgi profil analizinden 55 nm olarak ölçülmüştür. Dikkat çekici şekilde modifikasyon öncesi nanosandviç dizilerinin çevresinde halkalar görünmektedir. Bunların üçgen dizilerinin orta katmanında bulunan Al₂O₃ tabakasının emisyonu nedeniyle olduğu düşünülmektedir. Tiyol uç gruplu polimerin modifikasyonundan sonra nanosandviçlerin ortalama yüksekliği 58 nm olarak ölçülmüştür. Modifikasyon öncesi ve sonrası yükseklik farkı polimer bağlanmasına atfedilmiştir. Polimer bağlanması sonucu üçgenler daha yuvarlak bir şekil almışlardır. Şekil 4.9D’de modifikasyon sonrası nanosandviç dizilerinin LSPR kayması gösterilmektedir. Modifikasyon öncesi λ_{max} 832.24 nm iken modifikasyon sonrası 849.66 nm olmuştur. 17.42 nm’lik kırmızı kayma yüzeye polimerin bağlandığını ispatlamaktadır.

Şekil 4.9. (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Au katmanının tiyol uç gruplu polimer (PT-2, tiyol uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 µm x 1.5 µm çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 832.24 nm) ve (b) sonrası (λ_{\max} = 849.66 nm) LSPR kaymaları.

Şekil 4.10A, Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizilerinin Al₂O₃ katmanının fosfonat uç gruplu polimer (PT-2 kodlu, fosfonat uçlu, Tablo 4.1, LCST: 35.6°C, MnGPC: 3.2 kg/mol) ile modifikasyonunu şematik olarak göstermektedir. Modifikasyon öncesi ve sonrası AFM görüntüleri, sırasıyla, Şekil 4.10B ve C'de verilmektedir. Görüntüler, Şekil 4.9'da gösterilenlerden farklı olup, modifikasyon sonrası nanosandviçlerin yan yüzlerinde polimer

zincirlerinin varlığı gözlenebilmektedir. Şekil 4.10D'de modifikasyon sonrası nanosandviç dizilerinin LSPR kayması gösterilmektedir. Modifikasyon öncesi λ_{\max} 836.6 nm iken modifikasyon sonrası 843.13 nm olmuştur. 6.53 nm'lik kırmızı kayma yüzeye polimerin bağlandığını ispatlamaktadır. Önemli nokta, fosfonat uç gruplu polimer ile modifiye edilmiş nanosandviçlerin LSPR kayması (6.53 nm), tiyol uç gruplu polimer ile modifiye edilmiş nanosandviçlerin LSPR kaymasından (17.42 nm) çok daha düşüktür. Bu nanosandviç yapısında Al_2O_3 ara katmanının yüzey alanının, Au üst ve alt katmanlarının toplam yüzeylerinden çok daha küçük olmasından kaynaklanmaktadır ve fosfonat uçlu polimerin, tiyol uçlu polimere göre daha az miktarda bağlandığını göstermektedir. Fosfonat ve tiyol uçlu polimerlerin LSPR kaymalarındaki farklılık, nanosandviçlerin farklı katmanlarının ilgili polimerler ile modifiye edildiğini güçlü bir şekilde göstermektedir.

Şekil 4.10. (A) 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Al_2O_3 katmanının fosfonat uç gruplu polimer (PT-2 kodlu, fosfonat uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon yüzey üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 μm x 1.5 μm

çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{\max}=836.6$ nm) ve (b) sonrası ($\lambda_{\max}=843.13$ nm) LSPR kaymaları.

Şekil 4.9 ve 10'da Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizileri için ayrı ayrı tiyol ve fosfonat uç gruplu polimerler ile gerçekleştirilmiş olan deneylerin aynısı, 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç dizileri için silan uç gruplu polimer (PT-6 kodlu, silan uçlu, Tablo 4.1, LCST: 61.7°C, M_nGPC: 3.2 kg/mol) ile gerçekleştirilmiştir. Bu deneylerde gerçekleştirilen LSPR kaymaları silan uç gruplu polimerlerin bağlanmasından sonra sırasıyla Şekil 4.11'de gösterilmektedir. Silan uç gruplu polimer ile modifikasyon öncesi λ_{\max} 918.8 nm iken modifikasyon sonrası 928.8 nm olmuştur. 10 nm'lik kırmızı kayma yüzeye silan uç gruplu polimerin bağlandığını ispatlamaktadır.

Şekil 4.11. Cam üzerinde hazırlanmış 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin HfO₂ katmanının silan uç gruplu polimer (PT-6, silan uç grup, Tablo 4.1) ile modifikasyonu (a) öncesi ($\lambda_{\max}=918.8$ nm) ve (b) sonrası ($\lambda_{\max}=928.8$ nm) LSPR spektrumları.

Kontrol deneyleri olarak, öncelikle altın yüzeye tiyol fonksiyonel polimerin seçiciliği ve polimerlerin uç grubunda bulunan diğer fonksiyonel grupların bağlanma ilgisinin olup olmadığı incelendi. Bu amaçla, Au çip yüzeyine, tiyol uç gruplu polimer ile birlikte, fosfonat ve trietoksisilan fonksiyonel gruplarını içeren, sırasıyla, DeBrPP ve aliltrioksisilan (ATES) bileşiklerinin bağlanması SPR ile test edildi. Burada fosfonat ve trietoksisilan fonksiyonel polimerler yerine DeBrPP ve ATES kullanılmasının temel sebebi bu moleküllerin polimerlerin uç gruplarındaki fonksiyonel grupların aynısını taşımaları ve küçük molekül olmaları nedeniyle yüzey ile varsa eğer bağlanma ilgilerinin polimerik yapıda bekleneceği şekilde sterik engellemeler ile önlenmemesidir. Şekil 4.12, SPR deneyinin sonucunu göstermektedir.

Görüleceği üzere, moleküllerin adsorpsiyonunu gösteren SPR cevabı sadece tiyol fonksiyonel polimerin enjeksiyonu sonrası elde edilmiştir. DeBrPP ve ATES enjeksiyonu sonrası hiçbir SPR sinyali alınmamıştır. Bu da altın yüzeye sadece tiyol fonksiyonel grubunun bağlanma ilgisinin olduğunu gösterir. Benzer kontrol deneyleri, Al_2O_3 ve HfO_2 tek katmanlı nanoparçacık dizileriyle de gerçekleştirildi. Bu durumda tiyol fonksiyonel polimerin bu dizilere bağlanması Raman ölçümleriyle incelendi. Şekil 4.13 A ve B sırasıyla Al_2O_3 ve HfO_2 tek katmanlı nanodiziler ile tiyol fonksiyonel polimerin inkübasyonu sonrası alınmış Raman spektrumlarını göstermektedir. Şekil 4.13'de görüleceği üzere Al_2O_3 ve HfO_2 yüzeyler sadece tiyol uç gruplu polimer ile inkübe edildikten sonra herhangi bir organik bileşeni işaret edecek karbon vb elementlere ve bağlanmalara rastlanmamıştır. Bu sonuç, nanosandviç yüzeylerinde tiyol uç gruplu polimerin ara katmana bağlanmayacağını açıkça göstermiştir.

Şekil 4.12. SPR sensogramı: (a) ultra saf su enjeksiyonu (200 μ l/dk, 10 dk), (b) DeBrPP enjeksiyonu (100 μ l/dk, 30 dk), (c) ATES enjeksiyonu (100 μ l/dk, 30 dk), (d) tiyol uç gruplu polimer enjeksiyonu (100 μ l/dk, 30 dk). Fonksiyonel grupların konsantrasyonu 0.01 mM'da sabit tutulmuştur.

Şekil 4.13. (A) Al_2O_3 ve (B) HfO_2 tek katmanlı nanodiziler ile tiyol fonksiyonel polimerin inkübasyonu sonrası alınmış Raman spektrumları.

Sonraki adımda, 20 nm Au / 20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au üç katmanlı nanodizilerin tüm katmanlarının fosfat ve tiyol uç gruplu polimerler ile işlevselleştirilmesi gerçekleştirildi (Şekil 4.14 a). Bu işlemde önce ara katman (Al_2O_3) fosfonat uç gruplu polimer ile bağlandı. Bu işlemi tiyol uç gruplu polimerin Au katmanına bağlanması izledi. Şekil 4.14 b ve c, nanodizilerin modifikasyon öncesi ve sonrası AFM görüntüleridir. Tüm katmanların polimer ile bağlanması sonucu nanoüçgen şekillerinin kaybolduğu gözlenmiştir. Bu sonuç tamamen nanoüçgen yüzeylerinin polimer tabaka ile kaplanmasıyla uyumludur. Şekil 4.14D, her bir tabakası polimerler ile işlevselleştirilen nanosandviç dizilerinin LSPR λ_{max} ölçümlerini göstermektedir. Modifikasyon öncesi nanodizilerin LSPR λ_{max} değeri 831.37 nm'dir (a). Al_2O_3 tabakasının fosfonat uç gruplu polimer ile modifikasyonundan sonra LSPR λ_{max} değeri 838.78 nm olmuştur (b). 7.41 nm'lik kırmızı kayma etkili şekilde polimer adsorpsiyonunu göstermiştir. Bu sonuç Şekil 4.10'da sunulan sonuçlar ile uyumludur. Bundan sonra nanodiziler, tiyol uç gruplu polimer ile inkübe edilmiştir. Sonrasında alınan LSPR ölçümünde λ_{max} değerinin 853.13 nm olduğu gözlenmiştir. Bu 14.35 nm'lik bir kaymayı göstermektedir. Bu sonuç Şekil 4.9'da gösterilen LSPR sonucuna göre daha düşüktür. Bu durum ara katmana bağlanan polimer zincirlerinin sterik engellemelerinden kaynaklanmış olabilir. Sonuç, ayrıca nanosandviç dizilerinin çevresindeki lokal dielektrik çevreye de atfedilebilir.

Şekil 4.14. (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve fosfonat uç gruplu polimerler (PT-2 fosfonat ve PT-6 tiyol uç gruplu polimerler, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası Si üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 µm x 1.5 µm çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 831.37 nm) ve (b) fosfonat uç gruplu polimerle (λ_{\max} = 838.78 nm) ve takiben (c) tiyol uç gruplu polimer (λ_{\max} = 853.13 nm) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları.

Sonraki adımda, 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au üç katmanlı nanodizilerin tüm katmanlarının silan ve tiyol uç gruplu polimerler ile işlevselleştirilmesi gerçekleştirildi (Şekil 4.15). Bu deneylerde işlevselleştirmeleri kullanılan UV-Vis aralığında takip edebilmek için 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanodizi kalınlıkları seçildi. Önce ara katman (HfO₂) silan uç gruplu polimer (PT-6 kodlu, silan uçlu, Tablo 4.1, LCST: 61.7°C, M_{nGPC}: 3.2 kg/mol) ile bağlandı. Bu işlemi tiyol uç gruplu polimerin (PT-6 kodlu, tiyol uçlu, Tablo 4.1, LCST: 51.5°C, M_{nGPC}: 3.2 kg/mol) Au katmanına bağlanması izledi. Şekil 4.15 a, b ve c, nanodizilerin modifikasyon öncesi ve sonrası SEM (a ve b) ve AFM (c) görüntüleridir. Şekil 4.14'dekine benzer şekilde tüm katmanların polimer ile bağlanması sonucu nanoüçgen yapıların kaybolduğu gözlenmiştir. Şekil 4.15D, HfO₂ tabakası silan uç gruplu polimer ile işlevselleştirilen Au / HfO₂ / Au nanosandviç dizilerinin LSPR λ_{max} ölçümlerini göstermektedir. Modifikasyon öncesi nanodizilerin LSPR λ_{max} değeri 723 nm'dir (a). HfO₂ tabakasının silan uç gruplu polimer ile modifikasyonundan sonra LSPR λ_{max} değeri 734 nm olmuştur (b). 11 nm'lik kırmızı kayma etkili şekilde silan fonksiyonel polimerin yüzeye adsorpsiyonunu göstermiştir. Bu sonuç, Şekil 4.11'de sunulan sonuçları destekler niteliktedir. Bundan sonra nanodiziler, tiyol uç gruplu polimer ile inkübe edilmiştir. Sonrasında alınan LSPR ölçümünde λ_{max} değerinin 746 nm olduğu gözlenmiştir (c). Bu 12 nm'lik bir kaymayı göstermektedir. Bu sonuç Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizileriyle elde edilen sonuçlar ile uyum içindedir.

Son olarak; silikon alttaş üzerinde hazırlanmış 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au ve 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç dizilerine tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerlerin bağlanması XPS ile analiz edildi. Şekil 4.16A, Au / Al₂O₃ / Au nanosandviçlerin, sırasıyla (üst spektrum) fosfonat ve (orta spektrum) tiyol uç gruplu polimerlerin ayrı ayrı bağlandıktan sonra alınmış XPS spektrumlarını göstermektedir. Spektrumlarda ayrı ayrı P2s ve S2p piklerinin varlığı polimerlerin yüzeye bağlandığı göstermektedir. Aynı nanosandviçlere sırasıyla fosfonat ve tiyol uç gruplu polimerlerin birlikte bağlanmasından sonra alınan spektrum (alt) ise hem P2s hem de S2p piklerini göstermektedir. Böylece yüzeylerin hem fosfonat hem de tiyol uç gruplu polimerler ile modifiye edilebildiği gösterilmiştir. Benzer şekilde Şekil 4.16B, Au / HfO₂ / Au nanosandviçlerin, sırasıyla (üst spektrum) silan ve (orta spektrum) tiyol uç gruplu polimerlerin ayrı ayrı bağlandıktan sonra alınmış XPS spektrumlarını göstermektedir. Üst spektrumda, kullanılan silikon alttaştan gelen Si2s ve Si2p piklerinin yanı sıra N1s pikinin varlığı gözlenmiştir. N1s pikinin varlığı kullanılan polimerin alfa uç grubundaki CN grubundan (Şekil 3.4) kaynaklanmakta olup silanlı polimerin yüzeye bağlandığını göstermektedir. Orta spektrumda ise S2p pikinin varlığı tiyol uç gruplu polimerin nanosandviç yüzeyine bağlandığını gösterir. Alt spektrum ise nanosandviçlere sırasıyla silan ve tiyol uç gruplu polimerlerin birlikte bağlanmasından sonra alınan

spektrumdur. Bu spektrumda ayrı ayrı N1s ve S2p piklerinin varlığı polimerlerin yüzeye bağlandığı göstermektedir.

Şekil 4.15. Silikon yüzey üzerinde hazırlanmış 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve silan uç gruplu polimerler (PT-6 kodlu, silan ve tiyol uçlu polimerler, Tablo 4.1) ile (A) modifikasyon öncesi SEM ve (B ve C) modifikasyon sonrası SEM ve çekiç mod AFM görüntüleri. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 723 nm), (b) silan uç gruplu polimerle (λ_{\max} = 734 nm) ve takiben (c) tiyol uç gruplu polimer (λ_{\max} = 746 nm) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları.

Şekil 4.16. Tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerler ile modifiye edilmiş (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au ve (B) 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç yüzeylerin XPS spektrumları. Üst spektrum (A) sadece fosfonat ve (B) sadece silan uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Orta spektrum tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Alt spektrum (A) fosfonat + tiyol ve (B) silan + tiyol uç gruplu polimerler ile modifikasyon sonrası.

Özet olarak, Au / Al₂O₃ / Au ve Au / HfO₂ / Au nanosandviç dizilerindeki her üç tabaka seçici olarak ilgili uç grup fonksiyonel polimerler ile başarılı bir şekilde kaplanmıştır.

4.4 Biyotanıma olaylarının belirlenmesi

Bu bölümde öncelikle sadece Au katmanı polimer ve biyotin ile modifiye edilmiş Au / Al₂O₃ / Au nanosandviçlere sıcaklık kontrollü streptavidin (SA) bağlanması deneyleri gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.17A, biyotanıma olayını şematik olarak göstermektedir. Ortamın sıcaklığının kullanılan polimerin LCST değerinin üstüne çıkmasıyla, biyotin molekülleri yanında yer alan polimer zincirleri, kendi içlerine geçerek yanlarındaki biyotin moleküllerinin çözelti içindeki SA molekülleri ile etkileşmesine olanak verirler. Böylece SA molekülleri biyotin ligandlarına bağlanır. Şekil 4.17B ve C, nanosandviç yüzeylerinin polimer (PT-6 tiyol uçlu polimer, Tablo 4.1, LCST= 51.5°C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + biyotin ile modifikasyonundan önce ve sonra alınmış AFM görüntülerini sunmaktadır. Görüntülerde yüzey morfolojisinin modifikasyondan sonra değiştiği görülmektedir. Şekil 4.17D, oda sıcaklığında SA çözeltisi ile inkübe edilmiş nanosandviç dizisinin LSPR spektrumunu göstermektedir. Bu deneyde işlevselleştirilmemiş nanosandviç dizilerinin LSPR λ_{max} değeri 816.11 nm (a) olarak ölçülmüştür. Dizilerin polimer + biyotin ile modifikasyonundan sonra LSPR λ_{max} değeri 822.22 nm (b) olmuştur. 6.11 nm'lik kırmızı kayma yüzeyin polimer + biyotin ile bağlandığını gösterir. İşlevselleştirilmiş nanodizi SA (2 μ M) ile 30 dakika süresince oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra alınan LSPR spektrumu 823.88 nm'lik bir λ_{max} değeri göstermiştir. Ortam sıcaklığı polimerin LCST değerinin (51.5°C) altında iken SA moleküllerinin yüzeye bağlanması ve buna uygun şekilde LSPR spektrumunda kaydedeğer bir kayma görülmesi beklenmez. Oldukça az sayılabilecek 1.66 nm'lik kayma cihazdan kaynaklanan gürültü veya SA moleküllerinin yüzeye spesifik olmayan etkileşiminden kaynaklanmış olabilir. Şekil 4.17E, nanosandviçlerin polimer + biyotin ile işlevselleştirilmesinden önce ve sonra LSPR λ_{max} değerlerini 765.28 nm (a) ve 772.22 nm (b) olarak göstermektedir. 6.94 nm'lik kırmızı kayma yüzeyin polimer + biyotin ile bağlandığını göstermektedir. Nanosandviç dizisi, kullanılan polimerin LCST değerinin (51.5°C) üstünde olan 55°C'ye ısıtıldığında LSPR λ_{max} değerinin 781 nm olduğu kaydedilmiştir (c). 8.78 nm'lik kırmızı-kayma, yüzeydeki polimer zincirlerinin sıcaklık artışı nedeniyle içe göçmüş yoğun konformasyonlarının sonucu oluştuğu düşünülmektedir. Bu şekilde 55°C'de tutulan nanosandviç dizileri, SA çözeltisi ile 30 dakika süresince inkübe edildikten sonra LSPR λ_{max} değeri 800 nm olarak kaydedilmiştir (d). 19 nm'lik kırmızı kaymanın SA moleküllerinin biyotin moleküllerine spesifik bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Şekil 4.17F ise, Şekil 4.17E'de gerçekleştirilen deneyin yüzeyde biyotin kullanılmadan gerçekleştirilen tekrarıdır. Görüleceği üzere yüzeyde biyotin olmadığı durumda sadece polimerle etkileştirilmesi sonucu LSPR λ_{max} değeri 695 nm'den 710 nm'ye ve 55°C'de nanosandviç dizilerinin SA çözeltisi ile 30 dakika süresince inkübe edildikten sonra LSPR λ_{max} değeri 710 nm'den 711 nm'ye kaydığı kaydedilmiştir. 1 nm'lik önemsiz kırmızı kayma çökmüş polimer zincirlerine spesifik olmadan bağlanmış SA moleküllerinden ve cihazdaki gürültüden kaynaklanmış olabilir.

Şekil 4.17. (A) Tiyol uç gruplu polimer (PT-6 tiyol uçlu polimer, Tablo 4.1, LCST= 51.5°C, M_{nGPC} = 3.2 kg/mol) ve biyotin ile işlevselleştirilmiş nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü olarak SA'nın bağlanmasının şematik olarak gösterimi. a- Nanosandviç yüzeyinin polimer

zincirleri ve biyotin molekülleri ile işlevselleştirilmesi, b- ortam sıcaklığının kullanılan polimerin LCST değeri üstüne çıkarılarak yüzeydeki biyotinler ile çözültedeki SA moleküllerinin etkileşmesinin sağlanması. (B) Nanosandviç yüzeylerin polimer + biyotin ile modifikasyonu öncesi ve (C) sonrası tıklamalı mod AFM görüntüleri. (D) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) oda sıcaklığında SA ile inkübasyon sonrası. (E) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, (d) 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası. (F) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu (mavi pik) öncesi ve (yeşil pik) sonrası, (kırmızı pik) sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası.

Bir sonraki adımda, Al_2O_3 katmanı polimer ve dA_8 ile modifiye edilmiş $Au / Al_2O_3 / Au$ nanosandviçlere sıcaklık kontrollü şekilde oligoadenin eşleniği olan oligotimin (dT_8) bağlanması incelenmiştir. Şekil 4.18, 30 nm $Au / 30$ nm $Al_2O_3 / 30$ nm Au nanosandviç dizisi kullanılarak alınan LSPR ölçümlerini göstermektedir. Nanosandviçlerin fosfonat uç gruplu polimer (PT-2 fosfonat uçlu polimer, Tablo 4.1, LCST= 35.6°C, M_{nGPC} = 3.2 kg/mol) + dA_8 ile işlevselleştirilmesinden önce ve sonra LSPR λ_{max} değerleri 780 nm (a) ve 818 nm (b) olarak ölçülmüştür. 38 nm'lik kırmızı kayma yüzeyin polimer + dA_8 ile bağlandığını göstermektedir. Nanosandviç dizisi, kullanılan polimerin LCST değerinin üstünde bir sıcaklık olan 42°C'ye ısıtıldığında LSPR λ_{max} değerinin 833 nm olduğu kaydedilmiştir (c). 15 nm'lik kırmızı-kayma, yüzeydeki polimer zincirlerinin sıcaklık artışı nedeniyle içe göçmüş yoğun konformasyonlarının sonucu olduğu düşünülmektedir. Bu şekilde 42°C'de tutulan nanosandviç dizileri, dT_8 çözültisi ile 30 dakika süresince inkübe edildikten sonra LSPR λ_{max} değeri 872 nm olarak kaydedilmiştir (d). 39 nm'lik kırmızı kaymanın dT_8 dizisinin eşleniği olan dA_8 dizisine spesifik bağlanmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Kontrol deneyi olarak yüzeyde dA_8 kullanmadan aynı deney tekrarlanmıştır (Şekil 4.18B). Bu durumda sadece polimerle etkileştirilmesi sonucu LSPR λ_{max} değerinin 695 nm'den 708 nm'ye ve 42 °C'de nanosandviç dizilerinin, dT_8 dizisi ile 30 dakika süresince inkübasyonundan sonra LSPR λ_{max} değerinin 708 nm'den 710 nm'ye kaydığı kaydedilmiştir. Bu sonuç yüzeyde dA_8 kullanılmadığı durumda dT_8 dizisinin nanosandviç yüzeyine spesifik olmayan bir şekilde dahi bağlanmadığını göstermiştir.

Şekil 4.18. A) Fosfonat uç gruplu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCST= 35.6 °C, M_{GPC} = 3.2 kg/mol) ve dA_8 ile işlevselleştirilmiş 30 nm Au / 30 nm Al_2O_3 / 30 nm Au nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü dT_8 bağlanmasının LSPR ile analizi. Nanosandviçlerin polimer + dA_8 ile modifikasyonu (a) öncesi (λ_{max} = 780 nm) ve (b) sonrası (λ_{max} = 818 nm), (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra (λ_{max} = 833 nm), (d) 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası (λ_{max} = 872 nm). B) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu öncesi (kırmızı pik) ve sonrası (mavi pik), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra, 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası (yeşil pik).

Bir sonraki adımda, 30 nm Au / 30 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin hem Al_2O_3 hem de Au katmanları, sırasıyla, fosfonat uç gruplu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCST= 35.6 °C, M_{GPC} = 3.2 kg/mol) + dA_8 ve tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCST= 51.5 °C, M_{GPC} = 3.2 kg/mol) + biyotin ile işlevselleştirilmiş ve bu nanodizilerin SA ve dT_8 içeren karışım ile biyotanimaya olayları LSPR ölçümleri ile analiz edilmiştir. Şekil 4.19 bu deneyde alınmış LSPR spektrumlarını göstermektedir. İlk olarak fonksiyonelleştirilmemiş nanosandviç dizilerin LSPR değeri 768 nm olarak ölçülmüştür. Daha sonra, nanodizilerin fosfonat uçgruplu polimer + dA_8 karışımı ile Al_2O_3 ara katmanı modifiye edilmiştir. Bu bağlanma olayından dolayı LSPR λ_{max} = 774 nm olarak ölçülmüştür. 6 nm'lik kayma ara katmanının polimer ve dA_8 dizisine bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Bunu takiben, ara katmanı fonksiyonelleştirilmiş olan nanosandviç diziler tiyol uç gruplu polimerler + biyotin karışımı ile modifiye edilmiştir. Bu işlemden sonra LSPR λ_{max} = 782 nm olarak ölçülmüştür. 8 nm'lik LSPR dalga boyu kayması Au tabakalara tiyol uç gruplu polimer + biyotin bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Kullanılan fosfonat ve tiyol uç gruplu polimerlerin LCST değerleri sırasıyla 35.6 ve 51.5°C'dir. Nanosandviç dizilerin yüzeylerinde algılayıcı moleküllere ligandların biyoafinite bağlanması, kademeli olarak çözelti sıcaklığının artırılarak yüzeydeki her polimer organizasyonunun LCST değeri üzerinde gerçekleştirildi. Isıtma işlemi, polimer

zincirlerinin çökmesine, ve böylece aynı tabakada bulunan algılayıcı moleküllerin spesifik ligandları ile etkileşmesine olanak sağladı. Öncelikle 42°C'de inkübe edilen yüzeyler aynı sıcaklıkta bulunan dT₈ ve SA karışımı ile 30 dakika etkileştirildi. Bu durumda LSPR pikinin 789 nm'ye kaydığı gösterildi. 7 nm'lik kayma, dT₈ dizilerinin Al₂O₃ katmanında bulunan polimerlerin çökmesi sonucu ortaya çıkan dA₈ dizilerine bağlanması sonucu görülmüştür. Daha sonra aynı yüzey 55°C'ye ısıtılmış ve aynı sıcaklıktaki SA çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Bu durumda LSPR piki 819 nm'ye kaymış olup 20 nm'lik kayma SA moleküllerinin Au katmanlarında bulunan polimerlerin çökmesi sonucu ortaya çıkan biyotin moleküllerine bağlanmasına atfedilmiştir.

Şekil 4.19. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. Kırmızı spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 768 nm; Mavi spektrum: fosfonat uçgruplu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCTS= 35.6 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + dA₈ karışımı ile Al₂O₃ ara katmanının modifikasyonu, λ_{\max} = 774 nm; Yeşil spektrum: tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{\max} = 782 nm; Siyah spektrum: tüm katmanları foksiyonelleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'de dT₈ ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 789 nm; Pembe spektrum: tüm katmanları foksiyonelleştirilmiş ve 42°C'de dT₈ bağlanmış nanodizilerin 55°C'de dT₈ ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 819 nm.

Bir sonraki adımda, 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizileri hem HfO₂ hem de Au katmanları, sırasıyla, silan uç gruplu polimer (PT-3, Tablo 4.1, LCTS= 44.9 °C, Mn_{GPC}= 4.4 kg/mol) + glutatyon (GLT) ve tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + biyotin ile işlevselleştirilmiş ve bu nanodizilerin glutatyon S-transferaz (GST) ve SA içeren karışım ile biyotanıma olayları LSPR ölçümleri ile analiz edilmiştir. Şekil

4.20A bu deneyde alınmış LSPR spektrumlarını göstermektedir. İlk olarak fonksiyonelleştirilmemiş nanosandviç dizilerin LSPR λ_{\max} değeri 714 nm olarak ölçülmüştür. Daha sonra, nanodizilerin silan uçgruplu polimer + GLT karışımı ile HfO₂ ara katmanı modifiye edilmiştir. Bu bağlanma olayından dolayı LSPR λ_{\max} = 721 nm olarak ölçülmüştür. 7 nm'lik kayma ara katmanın polimer ve GLT ile bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Bunu takiben, ara katmanı fonksiyonelleştirilmiş olan nanosandviç diziler tiyol uç gruplu polimerler + biyotin karışımı ile modifiye edilmiştir. Bu işlemde sonra LSPR λ_{\max} = 731 nm olarak ölçülmüştür. 10 nm'lik LSPR dalga boyu kayması Au tabakalara tiyol uç gruplu polimer + biyotin bağlanmasından kaynaklanmaktadır. Kullanılan silan ve tiyol uç gruplu polimerlerin LCST değerleri sırasıyla 44.9 ve 51.5°C'dir. Öncelikle 50°C'de inkübe edilen yüzeyler aynı sıcaklıkta bulunan GST ve SA karışımı ile 30 dakika etkileştirildi. Bu durumda LSPR pikinin 735 nm'ye kaydığı gösterildi. 4 nm'lik kayma, GST moleküllerinin HfO₂ katmanında bulunan polimerlerin çökmesi sonucu ortaya çıkan GLT moleküllerine bağlanması sonucu görülmüştür. Daha sonra aynı yüzey 55°C'ye ısıtılmış ve aynı sıcaklıktaki SA çözeltisi ile inkübe edilmiştir. Bu durumda LSPR piki 755 nm'ye kaymış olup 5 nm'lik kayma SA moleküllerinin Au katmanlarında bulunan polimerlerin çökmesi sonucu ortaya çıkan biyotin moleküllerine bağlanmasına atfedilmiştir. Şekil 4.20B yukarıdaki deneyde kullanılan polimerler, GLT ve biyotin ile işlevselleştirilmiş yüzey ile GST ve SA karışımının oda sıcaklığında etkileştirilmesiyle alınan LSPR spektrumlarını göstermektedir. Bu durumda oda sıcaklığında nanosandviç dizilerinin, GST ve SA karışımı ile 30 dakika süresince inkübe edildikten sonra LSPR λ_{\max} değeri 731 nm'den kaymadığı kaydedilmiştir. Bu sonuç yüzeyde polimer zincirlerinin açık olduğu durumda proteinlerin nanosandviç yüzeyine spesifik olmayan bir şekilde dahi bağlanmadığını göstermiştir. Böylece LCST'nin üzerinde gerçekleştirilen deneylerde görülen bağlanmaların yüzeydeki polimer zincirleri ile kontrol edilebildiği ispatlanmıştır.

Son kontrol deneyi olarak, yüzeyde GLT ve biyotin kullanmadan, 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizileri sadece tiyol uç gruplu polimer ile modifiye edildikten sonra 55 °C'de GST proteinin spesifik olmayan bağlanması incelenmiştir (Şekil 4.20 C). LSPR maksimum dalga boyunda sadece 1 nm'lik bir kayma gözlenmiştir. Bu sonuç yüzeyde GLT kullanılmadığı durumda GST proteininin yüksek sıcaklıkta nanosandviç yüzeyine spesifik olmayan bir şekilde bağlanmadığını göstermiştir.

Şekil 4.20. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. A) Yeşil spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 714 nm; Pembe spektrum: silan uçgruplu polimer (PT-3, Tablo 4.1, LCTS= 44.9 °C, Mn_{GPC}= 4.4 kg/mol) +GLT karışımı ile HfO₂ ara katmanının modifikasyonu, λ_{\max} = 721 nm; Siyah spektrum: tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) +

biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{\max} = 731 nm; Kırmızı spektrum: tüm katmanları foksiyonelleştirilmiş nanosandviçlerin 50°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 735 nm; Mavi spektrum: tüm katmanları foksiyonelleştirilmiş ve 50°C'de GST bağlanmış nanodizilerin 55°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 755 nm. B) LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{\max} = 714 nm) ve sonrası (silan uç gruplu polimer + GLT ile modifikasyonu sonrası, yeşil pik λ_{\max} = 721 nm, ve tiyol uç gruplu polimer + biyotin ile modifikasyon sonrası, mavi pik λ_{\max} = 731 nm), işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin oda sıcaklığında, GST ve SA ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{\max} = 731 nm). C) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{\max} = 723 nm) ve sonrası (tiyol uç gruplu polimer, mavi pik λ_{\max} = 732 nm), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'de, GST ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{\max} = 733 nm).

4.5 Nanosandviç yüzeylerin işlevselleştirilmesinin ve biyotanıma olaylarının XPS kapasitans ölçümleri ile belirlenmesi

LSPR tekniği ile ayrıntılı bir şekilde tanımlanmış nanosandviç yüzeyler ve bu yüzeylerle gerçekleştirilen biyotanıma olayları ayrıca XPS kapasitans ölçümleri ile de incelenmiştir. Bilindiği kadarıyla literatürde ilk defa XPS kapasitans ölçümleri ile biyotanıma olayları belirlenmeye çalışılmıştır. Bu amaçla öncelikle polimer ve biyomoleküller ile işlevselleştirilmiş nanosandviç dizilerinin tek katmanının polimerler ile foksiyonelleştirilmesi veya biyotanıma olayları XPS kapasitans ölçümleri ile incelenmiştir. Bu deneylerde silikon yüzeyler üzerinde hazırlanmış 20 nm Au/20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au ve 20 nm Au/ 20 nm HfO₂ /20 nm Au nanosandviç dizileri kullanılmıştır. Örnek kodları Tablo 4.2 ve 4.3'de verilmektedir.

Tablo 4.2. 20 nm Au/20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au nanosandviç dizisinin XPS kapasitans ölçümlerinde kullanılan örnek kodları

Örnek Kodu	Açıklama
A1	İşlevselleştirilmemiş 20 nm Au/20 nm Al ₂ O ₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisi
A2	Fosfonat uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası
A3	Tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası
A4	Fosfonat ve tiyol uç gruplu polimer ile tüm katmanların modifikasyonu sonrası
A5	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin dT ₈ ile biyobağlanmasından sonra
A6	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin SA ile biyobağlanmasından sonra

Tablo 4.3. 20 nm Au/20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviç dizisinin XPS kapasitans ölçümlerinde kullanılan örnek kodları

Örnek Kodu	Açıklama
H1	İşlevselleştirilmemiş 20 nm Au/20 nm HfO ₂ / 20 nm Au nanosandviç dizisi
H2	Tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası
H3	Silan uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası
H4	Silan ve tiyol uç gruplu polimer ile tüm katmanların modifikasyonu sonrası
H5	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin GST ile biyobağlanmasından sonra
H6	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin SA ile biyobağlanmasından sonra

Nanoüçgenlerin kapasitanslarının ölçülmesi için XPS cihazının X-ışını uyarıcı olarak kullanılmıştır. X-ışının en üst tabakata altını negatif yükler. P-tipi silisyum wafer üzerindeki alt tabaka altın ise wafer ile temas halinde olduğu için pozitif yüklüdür. Bu iki iletken plaka arasındaki yalıtkan tabaka sayesinde nanoüçgenler birer kapasitör gibi işlev görürler. Öncelikle örneklerin yüklenme/boşalma özellikleri XPS ölçümleri ile analiz edilmiştir. Genel olarak manoyapıların yüklenme/boşalma özellikleri ve yüklerin dielektrik tabakalarda toplanması biyosensör ve farklı cihaz üretiminde oldukça önemlidir. Genel olarak materyallerin yüklenmesi iletken olmayan örneklerde bağlanma enerjisi tanımlamasında sorun olarak görülebilir. Bununla birlikte, çoklu yüzey yapısı içeren örneklerin elektriksel parametrelerinin tanımlanmasında yüklenme/boşalma işlemi çok yararlı bir tekniktir. Bu yüzden, bu teknik çok katmanlı nanosandviç örneklerinin elektriksel ve kapasitans özelliklerinin araştırılmasında kullanılmıştır. Öncelikle nanosandviçlerin yüklenme/boşalma dinamiğini görüntülemek için frekans aralığı 150 ile 250 arasında olan ± 10 V yoğunluğundaki SQW sinyalleri ile XPS ölçümleri her bir örnek için analiz edilmiştir. Yüzeyle yansıyan elektronlar ile elektron tabancasından gönderilen düşük enerjili serbest elektronları kontrol etmek amacıyla yüzeylere özellikle ± 10 V harici bias uygulanmıştır. Tablo 4.4 ve 4.5'de bu ölçümler fonksiyonelleştirilmemiş nanosandviçler için örnek olarak verilmiştir. Örneklenen bağlanma enerji ölçümleri yukarıda belirtilen 12 örnek için gerçekleştirilmiş ve Tablo 4.6'da tüm sonuçlar özetlenmiştir. Bu tablodan görüleceği üzere yüzeylerin işlevselleştirilmesi ve biyobağlanmalar sonucu en yüksek bağlanma enerjilerinde azalmalar görülmüştür. Yüzeylere polimerlerin ve biyomoleküllerin bağlanması nanoyapıların diferensiyel yüklenmesini etkilemiştir. Yüzeyle bağlı herhangi bir biyomolekül ya da polimer olmadığı durumda örneğin en yüksek bağlanma enerjisi farkına sahip olduğu dolayısıyla da yüklenme kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir. Polimer ve biyomolekül ile kaplanınca yüzeylerin en yüksek

bağlanma enerji farkları (aynı zaman da yüklenme kapasitesi) azalır. Moleküllerin bağlanması yayılan elektronları azaltır böylelikle yüzeyin diferansiyel yüklenmesini azaltır. Al_2O_3 ve HfO_2 farklı dielektrik materyaller olup, bu tabakaların dielektrik sabitleri sırasıyla 9.4 ve 25'dir. HfO_2 'nin dielektrik sabitinin Al_2O_3 'ten büyük olması onun daha geniş frekans aralığında kapasitans özelliği göstereceğini belirtir. HfO_2 içeren örneklerin frekans aralığı 185-215 kHz iken Al_2O_3 içeren nanosandviç yapıların frekans aralığı 185-200 kHz'dir. Genel olarak bağlanma enerji değişimleri ile elde edilen sonuçlar, örneklerin kapasitans potansiyellerini ortaya koymuştur. Bir sonraki adımda örneklerin kapasitans değerleri hem deneysel hem de teorik olarak hesaplanmıştır. Bu bölümde, farklı frekanslardaki SQW sinyalleri ($\pm 10V$) ile 10 M Ω 'luk harici bir direnç örneklere bağlanmıştır. Basit bir RC devresi direnç ve fonksiyon jeneratörü yardımıyla yapılmıştır. XPS ile SQW sinyali ($\pm 10V$) ve frekans değerleri altında örnekler ile fonksiyon jeneratörü arasında 10 M Ω 'luk bir direnç bağlanarak tekrar ölçülmüştür. Şekil 4.20 ve Şekil 4.21'de görüldüğü gibi, frekanslar 0.1 Hz'den, 1000 Hz'e çıkarıldığında ayrılan iki XPS piki arasındaki mesafenin azaldığı gözlenmiştir. Pikler arasındaki bu mesafe $Au/Al_2O_3/Au$ ve $Au/HfO_2/Au$ nanosandviç yapıları için sırasıyla Tablo 4.7 ve 4.8'teki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 4.4. 20 nm Au/20 nm Al_2O_3 / 20 nm Au nanosandviç dizisinin (A1 örneği) XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi

Frekans (kHz)	B.E Değişimi (eV)
150	20
160	20
170	20
180	20
185	21.662
190	23.809
195	25.539
200	28.009
210	20
220	20
230	20
240	20
250	20.349

Tablo 4.5. 20 nm Au/20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviç dizisinin (H1 örneği) XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi

Frekans (kHz)	B.E Değişimi (eV)
150	20
160	20
170	20
180	20
185	21.67
190	23.3
195	25.57
200	25.7
205	26.58
210	25.7
215	24.01
220	20
230	20
240	20
250	20

Tablo 4.6. Tüm örnekler için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş bağlanma enerjilerinin farklı frekans değerlerindeki değişimi

Frekans (kHz)	Bağlanma Enerjisi Değişimi (eV)											
	A1	A2	A3	A4	H1	H2	H3	H4	A5	A6	H5	H6
150	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
160	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
170	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
180	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
185	21.662	21.57	21.69	21.97	21.67	21.42	20.59	21.94	21.61	21.23	21.57	21.77
190	23.809	23.676	23.63	23.91	23.3	22.37	21	22.17	22.49	22.01	22.11	22.35
195	25.539	25.796	25.52	25.79	25.57	23.06	23.23	22.79	23.31	23.59	22.51	22.78
200	28.009	27.619	27.26	27.45	25.7	24.36	24.05	25.2	24.28	24.33	23.16	23.21
205	20	20	20	20	26.58	26.15	25.68	25.85	24.81	24.78	24.02	23.79
210	20	20	20	20	25.7	25.22	24.45	25.41	26.41	26.36	24.74	24.52
215	20	20	20	20	24.01	23.09	22.99	22.4	20	20	25.08	25.17
220	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
230	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
240	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
250	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20

Tablo 4.7. Au/Al₂O₃/Au nanosandviçleri için pikler arasındaki hesaplanan bağlanma enerjisi farklarına karşılık gelen frekans değerleri.

Frequency (Hz)	Distance of Peaks (eV)
0.1	12.599
1	12.727
10	12.733
100	11.581
200	11.227
300	10.663
400	9.932
500	9.028
600	8.04
700	7.358
800	7.263
900	6.532
1000	5.987

Şekil 4.21. Au/Al₂O₃/Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi.

Tablo 4.8. Au/HfO₂/Au nanosandviçleri için pikler arasındaki hesaplanan bağlanma enerjisi farklarına karşılık gelen frekans değerleri.

Frequency(Hz)	Distance of Peaks (eV)
0.1	12.745
1	12.474
10	11.631
100	11.501
200	11.142
300	10.49
400	9.756
500	8.921
600	8.152
700	7.437
800	6.881
900	6.39
1000	5.888

Şekil 4.22. Au/HfO₂/Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi.

Örnekler, Al₂O₃ ve HfO₂ olmak üzere iki farklı tip dielektrik materyalden oluşmuştur. Bu dielektrik materyaller, dielektrik sabitlerinden dolayı farklı frekans karşılıkları verirler. Piklerin arasındaki mesafenin her dielektrik materyal için farklı olduğu gözlemlenmiştir. Tüm örneklerdeki Au4f, C1, Si2p ve O1 bölgelerinin 1 Hz'den 10 kHz'e kadar olan bütün frekans değerlerindeki XPS ölçümleri yapılmıştır. Örneklerin frekansları 1000 Hz üzerine çıktığında, pikler arasındaki mesafenin azaldığı görülmüştür ve 2000 Hz civarında mesafe sıfıra düşmüştür. Böylelikle, 2000 Hz'de iki pik birleşip maksimum yoğunluğa (CPS) sahip tek bir pik olarak gözlenmiştir. Buna sınır frekansı (fc) denir. Tablo 4.9 ve 4.10'da listelendiği gibi her örnek için farklı sınır frekans değerleri gözlenmiştir. Sınır frekansı değerinden sonra da frekansı 10 kHz'e kadar arttırmaya devam ettiğimizde, pikin sabit kaldığı gözlenmiştir. 10 MΩ

direnç yardımı ile belirlenen sınır frekansları örneklerimizin deneysel ve teorik kapasitans değerlerini hesaplamak için kullanılmıştır.

Tablo 4.9. 20 nm Au/20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au nanosandviç örnekleri için elde edilmiş sınır frekans değerleri

Örnek Kodu	Açıklama	Sınır Frekans Değerleri (kHz)
A1	İşlevselleştirilmemiş 20 nm Au/20 nm Al ₂ O ₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisi	2000
A2	Fosfonat uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası	2010
A3	Tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası	2005
A4	Fosfonat ve tiyol uç gruplu polimer ile tüm katmanların modifikasyonu sonrası	2008
A5	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin dT ₈ ile biyobağlanmasından sonra	2017
A6	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin SA ile biyobağlanmasından sonra	2025

Tablo 4.10. 20 nm Au/20 nm HfO₃/ 20 nm Au nanosandviç örnekleri için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş sınır frekans değerleri

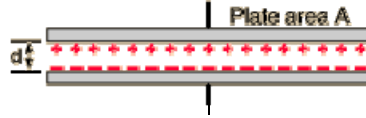
Örnek Kodu	Açıklama	Sınır Frekans Değerleri (kHz)
H1	İşlevselleştirilmemiş 20 nm Au/20 nm HfO ₂ / 20 nm Au nanosandviç dizisi	1800
H2	Tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası	1805
H3	Silan uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası	1815
H4	Silan ve tiyol uç gruplu polimer ile tüm katmanların modifikasyonu sonrası	1810
H5	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin GST ile biyobağlanmasından sonra	1823
H6	Tüm katmanları polimer + biyomolekül ile işlevselleştirilmiş nanodizilerin SA ile biyobağlanmasından sonra	1827

Örneklerin kapasitansının hesabı için öncelikle nanosandviçlerin alanları hesaplandı (Şekil 4.23, Denklem 4.1).

Şekil 4.23. Nanosandviçin şematik gösterimi (Au/ HfO₂/ Au). Kalınlık= 60 nm, yükseklik= 240 nm ve genişlik= 170 nm

$$\text{Alan} = \frac{1}{2} \times b \times h \quad \text{Denklem 4.1}$$

Nanoüçgenlerin alanı Denklem 4.1'den 20,400 nm² bulunmuştur. Örnek üzerindeki tüm nanosandviçlerin toplam alanı 8,16×10⁻¹⁰ m² olarak hesaplanmıştır. Örneklerin teorik kapasitans değerleri (C) (Farad) Denklem 4.2 ile hesaplanmıştır. Dielektrik malzemenin kalınlığı “d” 2,0×10⁻⁸ m, kapasitör levhasının alanı “A” is 8,16×10⁻¹⁰ m², vakumun elektrik alan geçirgenliği “ε₀” 8,854×10⁻¹² F/m, malzemelerin dielektrik katsayıları “k” Al₂O₃ ve HfO₂ için sırasıyla 9,4 ve 25'dir(Lide 2004).



$$C = \frac{\epsilon A}{d} = \frac{k\epsilon_0 A}{d} \quad \text{Denklem 4.2}$$

Bu teorik kapasitans değerleri, deneysel bulunan kapasitans değerleriyle karşılaştırılmıştır. Deneysel olarak kapasitans değerleri her bir örnek için ölçülen sınır frekans değerlerinden Denklem 4.3 kullanılarak hesaplanmıştır.

$$f_c = \frac{1}{2\pi RC} = \frac{1}{2\pi\tau} \quad \text{Denklem 4.3}$$

Sınır frekans değerleri “f_c” her bir örnek için farklıdır ve “Hz” birimindedir. Dışarıdan uygulanan 10⁷Ω (ohm)'luk bir direnç “R” sayesinde örneklerin gerçek kapasitans değerleri hesaplanmıştır. Bu şekilde her bir örneğin, kullanılan yalıtkan malzemeye ve değişen sınır frekans değerlerine bağlı olarak gerçek ve teorik kapasitans değerleri hesaplanmıştır (Şekil 4.24). Sonuçlar, Tablo 4.11'de verilmektedir. Au/Al₂O₃/Au nanosandviç yapılarının deneysel ve teorik kapasitans değerlerinin Au/HfO₂/Au nanosandviç yapılarından farklı olduğu görülmektedir. Dielektrik materyaller iki Au tabakasının arasına yerleştirildiğinde yüzeyin

yüklenmesini arttırabilir. Au/HfO₂/Au yapısının teorik kapasitans değeri 9.03E-12 F olarak hesaplanmıştır ve bu değer 3.40E-12 F olarak hesaplanan Au/Al₂O₃/Au yapısınıninkinden daha büyüktür. Bu iki malzemenin dielektrik sabitlerinin birbirinden farklı olmasından kaynaklıdır. HfO₂'nin dielektrik sabitinin daha büyük olması nedeniyle hesaplanan kapasitans değeri de daha büyüktür. Sonuçlar genel olarak incelendiğinde, fonksiyonelleşmemiş örneğin kapasitans değerinin, polimer ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirildikten sonra azaldığı görülür. Bu sonuç, bağlanma enerji değişimleri sonuçları ile uyum içindedir ve nanosandviç yapılarında kapasitans ölçümlerinin yüzeyde biyotanıma olaylarının göstergesi olarak potansiyel kullanımı olabileceği hipotezini desteklemektedir.

Şekil 4.24. Gerçek ve teorik kapasitans değerlerinin hesaplanması.

Tablo 4.11. 20 nm Au/20 nm HfO₃/ 20 nm Au nanosandviç örnekleri için XPS kapasitans ölçümleri ile elde edilmiş gerçek kapasitans ve hesaplanan teorik kapasitans değerleri

Örnek Kodu	Gerçek Kapasitans (Farad)	Teorik Kapasitans (Farad)
A1	7.96E-12	3.40E-12
A2	7.91E-12	3.40E-12
A3	7.93E-12	3.40E-12
A4	7.92E-12	3.40E-12
A5	7.89E-12	3.40E-12
A6	7.86E-12	3.40E-12
H1	8.84E-12	9.03E-12
H2	8.81E-12	9.03E-12
H3	8.76E-12	9.03E-12
H4	8.79E-12	9.03E-12
H5	8.73E-12	9.03E-12
H6	8.71E-12	9.03E-12

5. SONUÇ

Bu projede potansiyel biyosensör uygulamaları için sıcaklık-duyarlı polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş, metal-yalıtkan-metal sandviç-benzeri nano yapıların desenli dizileri üretilmiş ve çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak lokalize yüzey plazmon rezonans (LSPR) ve kapasitansı incelenmiştir. Öncelikle metal-yalıtkan-metal üçlü tabakalardan oluşan sandviç-benzeri nano yapıların desenli dizinleri nanoküre litografisi tekniği ile üretilmiştir. Bu nanosandviç dizinleri, biyotin, glutatyon ve/veya tek-sarmal oligoadenin biyomolekülleri ve oligoetilenglikol esaslı sıcaklık-duyarlı polimer ile fonksiyonelleştirilmiştir. Herbir nanosandviç katmanı farklı sıcaklıkta faz değişimi gösteren bir polimer ve belirli bir tür biyomolekül ile işlevselleştirilmiştir. Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve yüzey modifikasyonları, taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskopisi, UV-görünür-yakın kızılötesi spektrofotometrisi aracılığıyla LSPR ölçümleri, X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS) gibi farklı teknikler ile doğrulanmıştır. Daha da önemlisi, nanosandviç dizinleri üzerindeki biyomolekül-ligand tanıma olaylarının polimerlerin sıcaklığa bağlı faz değişimleri ile kontrol edilebildiği yapılan ölçümler ile doğrulanmıştır. Farklı transdüksiyon mekanizmalarını incelemek için, polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş nanodizinlerin lokalize yüzey plazmon rezonansı ve kapasitansı, ikili biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. LSPR ölçümleri ile nanodiziler üzerinde biyotin-streptavidin ve oligoadenin-oligotimin veya biyotin-streptavidin ve glutatyon-glutatyon S-transferaz biyotanıma olayları açık bir şekilde algılanabilmiştir. Ayrıca bildiğimiz kadarıyla literatürde ilk defa XPS ile gerçekleştirilen kapasitans ölçümleri ile biyotanıma olaylarının algılanabileceği gösterilmiştir. Nanosandviçlerin bağlanma enerji farklarının, aynı zamanda da yüklenme kapasitesilerinin, yüzeylerindeki biyobağlanma olaylarına bağlı olarak değiştiği XPS ölçümleri ile gösterilmiştir.

Sonuç olarak bu proje ile biyosensör uygulamaları için faydalı olabilecek sıcaklık duyarlı polimerler ile işlevselleştirilmiş nanosandviç yapıları üretilmiş ve bu yeni nano-biyo-çipler ile gerçekleştirilen LSPR ve kapasitans ölçümlerinin çoklu biyotanıma olaylarında transdüksiyon mekanizmaları olarak potansiyelleri ortaya konmuştur. Böylece projede işaretleme/etiketlemeye gerek olmadan birden fazla biyomolekülün nicel algılanması amacıyla yeni ve iyileştirilmiş biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik yeni nanomalzeme ve yöntemler geliştirilmesine yönelik önemli bulgular toplanmıştır.

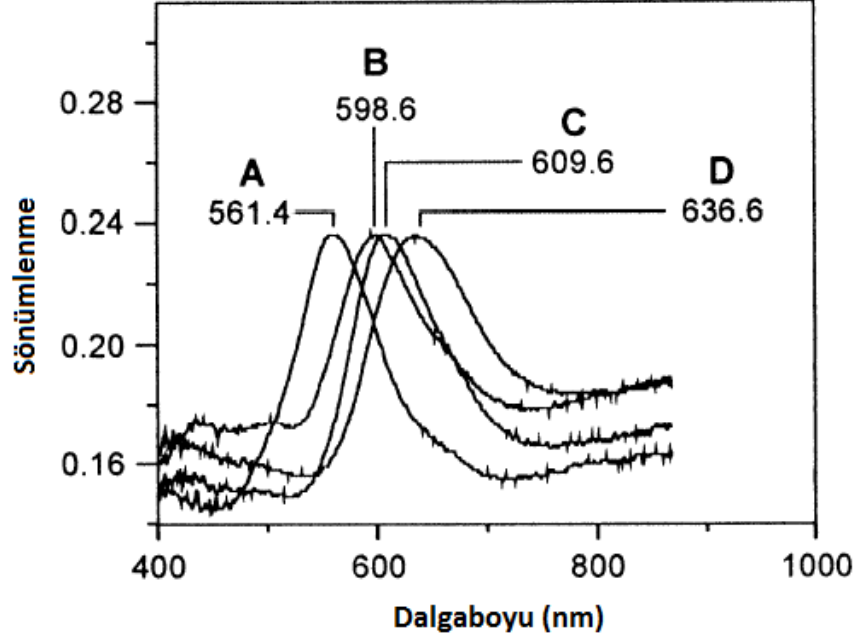


KAYNAKLAR

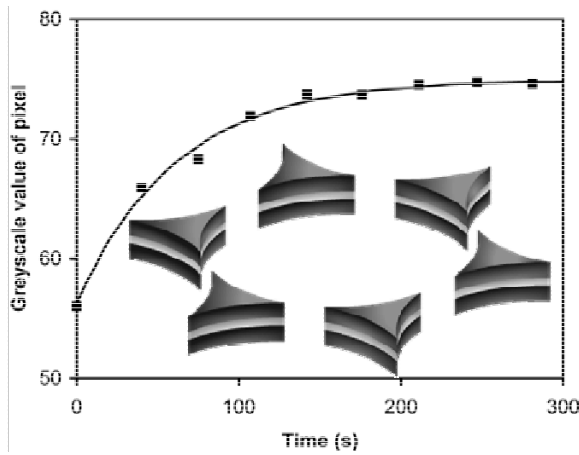
- Boyer, C., Bulmus, V., Davis, T. P., Ladmiral, V., Liu, J., Perrier, S. 2009. "Bioapplications of RAFT Polymerization", *Chemical Reviews*, 109 (11), 5402-5436.
- Charnay, C., Lee, A., Man, S.-Q., Moran, C. E., Radloff, C., Bradley, R. K., Halas, N. J. 2003. "Reduced Symmetry Metallodielectric Nanoparticles: Chemical Synthesis and Plasmonic Properties", *The Journal of Physical Chemistry B*, 107 (30), 7327-7333.
- Chen, G.H., Hoffman, A.S. 1995. "Temperature-induced phase-transition behaviors of random vs graftcopolymers of N-isopropylamide and acrylic acid", *Mac.Rap. Comm.*, 16, 175-182.
- Cheung, C. L., Nikolić, R. J., Reinhardt, C. E., Wang, T. F. 2006. "Fabrication of nanopillars by nanosphere lithography", *Nanotechnology*, 17 (5), 1339-1343.
- Coutts, M. J., Zareie, H. M., Cortie, M. B., Phillips, M. R., Wuhler, R., McDonagh, A. M. 2010. "Exploiting Zinc Oxide Re-emission to Fabricate Periodic Arrays", *ACS Applied Materials & Interfaces*, 2 (6), 1774-1779.
- Deckman, H. W., Dunsmuir, J. H. 1982. "Natural lithography", *Applied Physics Letters*, 41 (4), 377-379.
- Deckman, H. W., Dunsmuir, J. H. 1983. "Applications of surface textures produced with natural lithography", *Journal of Vacuum Science & Technology B*, 1 (4), 1109-1112.
- Dmitriev, A., Pakizeh, T., Käll, M., Sutherland, D. S. 2007. "Gold-Silica-Gold Nanosandwiches: Tunable Bimodal Plasmonic Resonators", *Small*, 3 (2), 294-299.
- Fan, X., White, I. M., Shopova, S. I., Zhu, H., Suter, J. D., Sun, Y. 2008. "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review", *Analytica Chimica Acta*. 620 (1-2), 8-26.
- Guiquan, G., Limin, W., Changchun, W., Junfeng, F. 2009. "Functionalization of Carbon Nanotubes through Free Radical Reaction", *Progress in Chemistry*, 21 (10), 2084-2092.
- Haes, A. J., Van Duyne, R. P. 2002. "A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles", *Journal of the American Chemical Society*, 124 (35), 10596-10604.
- Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L., Van Duyne, R. P. 2005. "Detection of a Biomarker for Alzheimer's Disease from Synthetic and Clinical Samples Using a Nanoscale Optical Biosensor", *Journal of the American Chemical Society*, 127 (7), 2264-2271.
- Haes, A. J., Zou, S., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. 2004. "Nanoscale Optical Biosensor: Short Range Distance Dependence of the Localized Surface Plasmon Resonance of Noble Metal Nanoparticles", *J. Phys. Chem. B*, 108, 6961-6968.

- Haynes, C. L., Van Duyne, R. P. 2001. "Nanosphere Lithography: A Versatile Nanofabrication Tool for Studies of Size-Dependent Nanoparticle Optics", *The Journal of Physical Chemistry B*, 105 (24), 5599-5611.
- Hoffman, A. S. 1995. "'intelligent" polymers in medicine and biotechnology", *Macromolecular Symposia*, 98 (1), 645-664.
- Huang, Y., Liu, Q., Zhou, X., Perrier, S., Zhao, Y. 2009. "Synthesis of Silica Particles Grafted with Well-Defined Living Polymeric Chains by Combination of RAFT Polymerization and Coupling Reaction", *Macromolecules*, 42 (15), 5509-5517.
- Huang, Z., Zhu, J. 2007. "Growth and enhanced emission of silicon-germanium hemisphere shell arrays", *Applied Physics Letters*, 91 (1), 013108.
- Hulteen, J. C., Van Duyne, R. P. 1995. "Nanosphere lithography: A materials general fabrication process for periodic particle array surfaces", *Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films*, 13 (3), 1553-1558.
- Jiang, P. 2004. "Surface-Templated Nanostructured Films with Two-Dimensional Ordered Arrays of Voids", *Angewandte Chemie International Edition*, 43 (42), 5625-5628.
- Liang, Y., Zhai, L., Zhao, X., Xu, D. 2005. "Band-Gap Engineering of Semiconductor Nanowires through Composition Modulation", *J. Phys. Chem. B*, 109 (15), 7120-7123.
- Lide, D.R. 2004. *CRC Handbook of Chemistry and Physics* (84. Basım). Boca Raton: CRC press.
- Love, J. C., Estroff, L. A., Kriebel, J. K., Nuzzo, R. G, Whitesides, G. M. 2005. "Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of Nanotechnology", *Chem. Rev.*, 105 (4), 1103-1170.
- Lutz, J-F., Hoth, A., Schade, K. 2009. "Design of oligo(ethylene glycol)-based thermoresponsive polymers: an optimization study", *Designer Monomers and Polymers*, 12, 343-353.
- Mandke, R., Layek, B., Sharma, G., Singh, J. 2011. "Fabrication and Evaluation of Nanoparticle-Based Biosensors". *Biosensor Nanomaterials*. Editörler: Li, S., Singh, J., Li, H., Banerjee, I. A. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- Passaro, V. M. N., Dell'Olio, F., Casamassima, B., De Leonardis, F. 2007. "Guided-Wave Optical Biosensors", *Sensors*, 7 (4), 508-536.
- Pinchuk, A., Hilger, A., Plessen, G. v., Kreibig, U. 2004. "Substrate effect on the optical response of silver nanoparticles", *Nanotechnology*, 15 (12), 1890-1896.
- Proll, G. 2005. "Optical Sensors:Industrial, Environmental and Diagnostic Applications". *Springer Series on Chemical Sensors and Biosensors*. Editörler: Narayanaswamy, R., Wolfbeis, O.S. Heidelberg: Springer-Verlag.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. 2006. *Principles of Instrumental Analysis* (6. Basım). Boston: Cengage Learning.

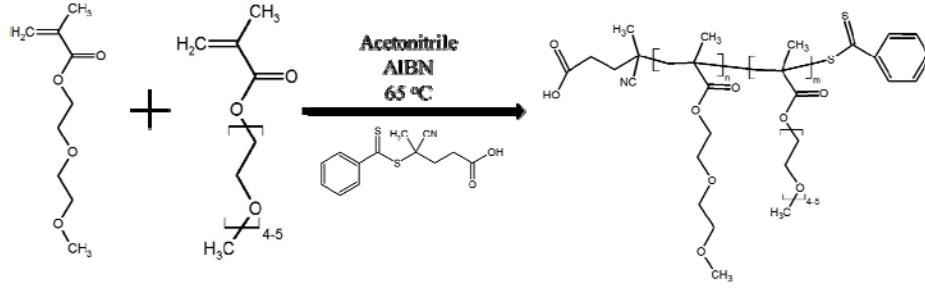
- Spink, C., Wadsö, I. 2006. "Calorimetry as an Analytical Tool in Biochemistry and Biology". *Methods of Biochemical Analysis*. Editör: Glick, D. Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.
- Stuart, D. A., Yonzon, C. R., Zhang, X., Lyandres, O., Shah, N. C., Glucksberg, M. R., Walsh, J. T., Van Duyne, R. P. 2005. "Glucose sensing using near-infrared surface-enhanced Raman spectroscopy: gold surfaces, 10-day stability, and improved accuracy", *Anal Chem*, 77 (13), 4013-4019.
- Stuart, M. A. C., Huck, W. T. S., Genzer, J., Muller, M., Ober, C., Stamm, M., Sukhorukov, G. B., Szleifer, I., Tsukruk, V. V., Urban, M., Winnik, F., Zauscher, S., Luzinov, I., Minko, S. 2010. "Emerging applications of stimuli-responsive polymer materials", *Nat Mater*, 9 (2), 101-113.
- Wang, J. 2001. "Glucose Biosensors: 40 Years of Advances and Challenges", *Electroanalysis*, 13 (12), 983-988.
- Whitney, A. V., Elam, J. W., Zou, S., Zinovev, A. V., Stair, P. C., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. 2005. "Localized surface plasmon resonance nanosensor: a high-resolution distance-dependence study using atomic layer deposition", *J Phys Chem B*, 109 (43), 20522-20528.
- Xiang, G., Zhang, N., Zhou, X. 2010. "Localized Surface Plasmon Resonance Biosensing with Large Area of Gold Nanoholes Fabricated by Nanosphere Lithography", *Nanoscale Research Letters*, 5 (5), 818-822.
- Yonzon, C. R., Jeoung, E., Zou, S., Schatz, G. C., Mrksich, M., Van Duyne, R. P. 2004. "A Comparative Analysis of Localized and Propagating Surface Plasmon Resonance Sensors: The Binding of Concanavalin A to a Monosaccharide Functionalized Self-Assembled Monolayer", *Journal of the American Chemical Society*, 126 (39), 12669-12676.
- Yonzon, C. R., Stuart, D. A., Zhang, X., McFarland, A. D., Haynes, C. L., Van Duyne, R. P. 2005. "Towards advanced chemical and biological nanosensors—An overview", *Talanta*, 67 (3), 438-448.
- Zareie, H. M., Boyer, C., Bulmus, V., Nateghi, E., Davis, T.P. 2008. "Temperature-Responsive Self-Assembled Monolayers of Oligo(ethylene glycol): Control of Biomolecular Recognition", *ACS Nano*, 2 (4), 757-765.
- Zareie, H. M., Morgan, S. W., Moghaddam, M., Maaroo, A. I., Cortie, M. B., Phillips, M. R. 2008. "Nanocapacitive Circuit Elements", *ACS Nano*, 2 (8), 1615-1619.
- Zhang, X., Yonzon, C. R., Young, M. A., Stuart, D. A., Van Duyne, R. P. 2005. "Surface-enhanced Raman spectroscopy biosensors: excitation spectroscopy for optimisation of substrates fabricated by nanosphere lithography", *IEE Proc Nanobiotechnol*, 152 (6), 195-206.



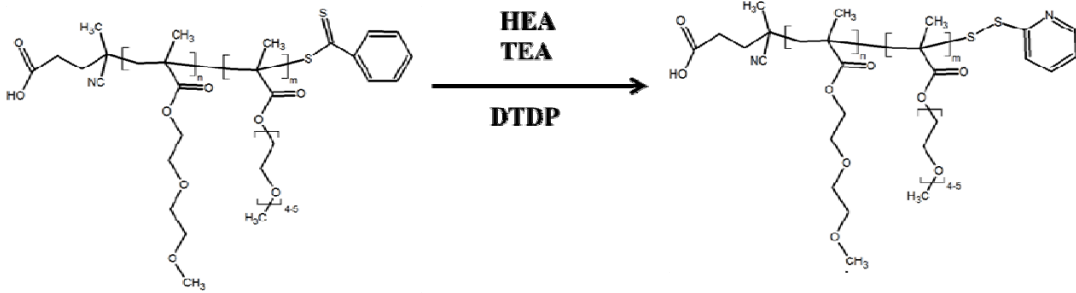
Şekil 2.1. Biotinlenmiş gümüş (Ag) nanoparçacıkların hazırlanması ve streptavidin bağlanmasını gösteren LSPR spektrumları: (A) kimyasal modifikasyondan önce Ag nanoparçacıklar, λ_{max} =561.4 nm. (B) kimyasal modifikasyon sonrası, λ_{max} =598.6 nm (C) biotin modifikasyonu sonrası, λ_{max} =609.6 nm (D) streptavidin bağlanması sonrası, λ_{max} =636.6 nm (Haes ve Van Duyne 2002).



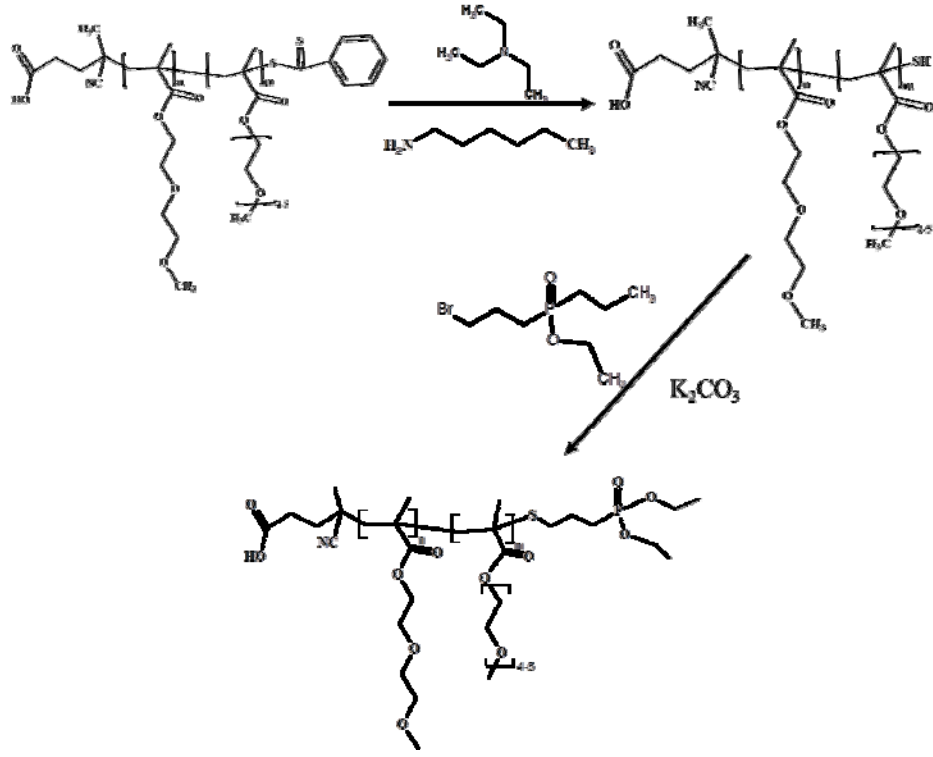
Şekil 2.2. Nanosandviçlerde yük birikmesinin zamana karşı grafiği (Zareie vd. 2008)



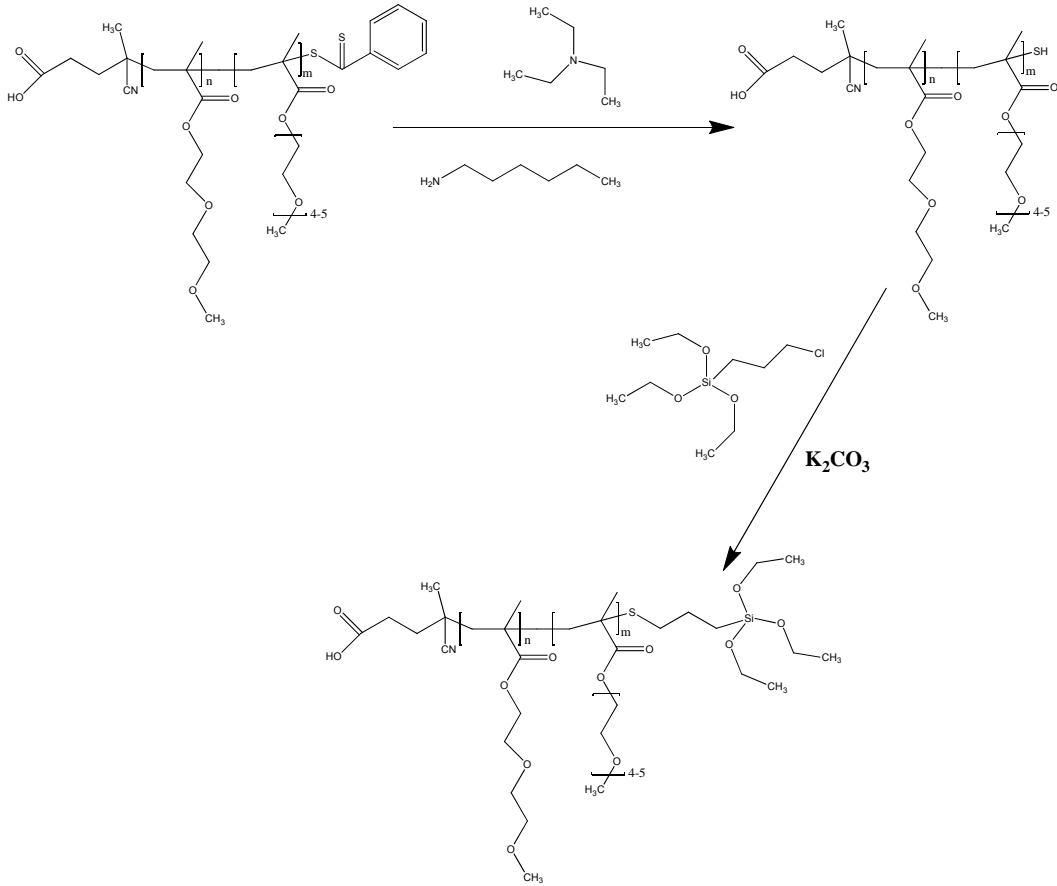
Şekil 3.1. MEO₂MA and OEGMA monomerlerinin RAFT tekniği ile kopolimerizasyonu şeması.



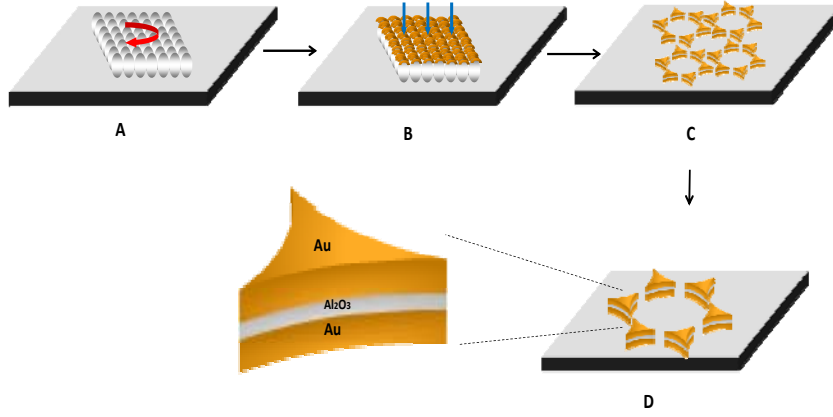
Şekil 3.2. Kopolimerlerin tiyol uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.



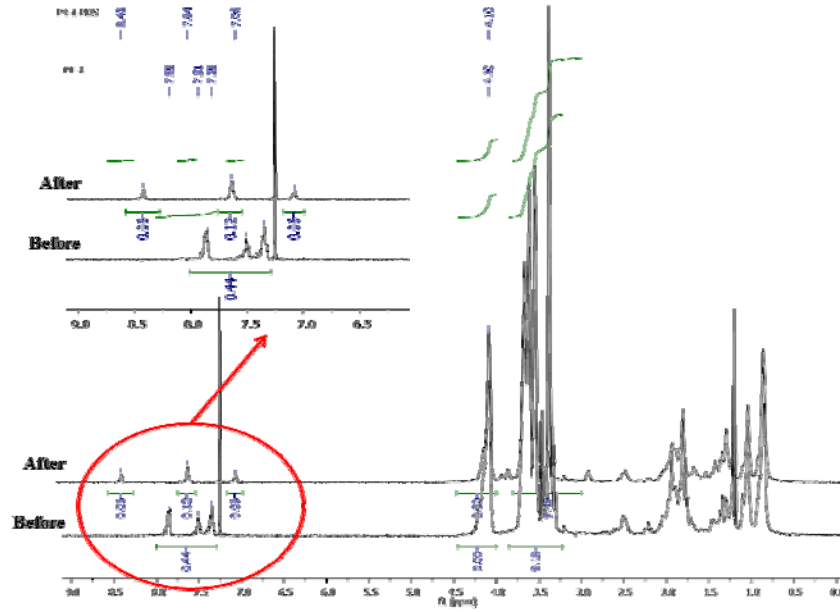
Şekil 3.3. Kopolimerlerin fosfat uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.



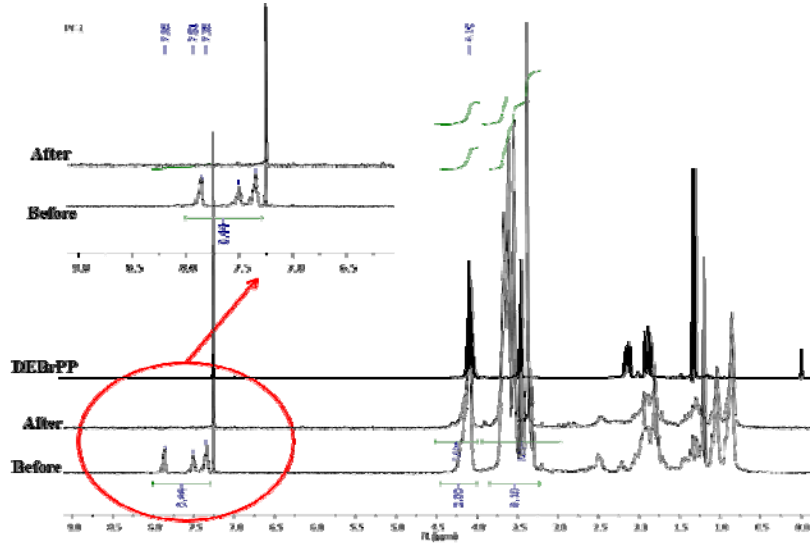
Şekil 3.4. Kopolimerlerin silan uç-grup ile modifiye edilmesi reaksiyonu.



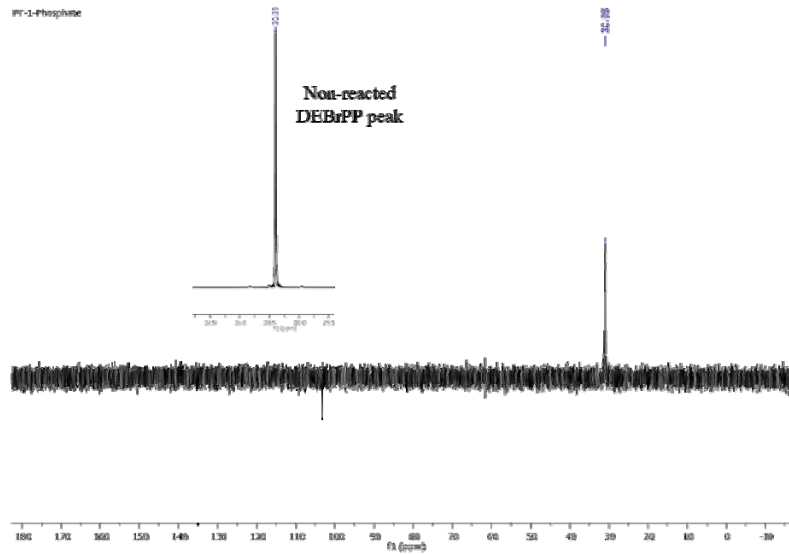
Şekil 3.5. Nanoküre litografisi (NSL) ile nanosandviç dizileri hazırlama yönteminin şematik gösterimi. (A) polistiren tanelerin dönele kaplaması, (B) metallerin birikimi, (C) kaldırma, (D) tek altıgen nanosandviç dizisi



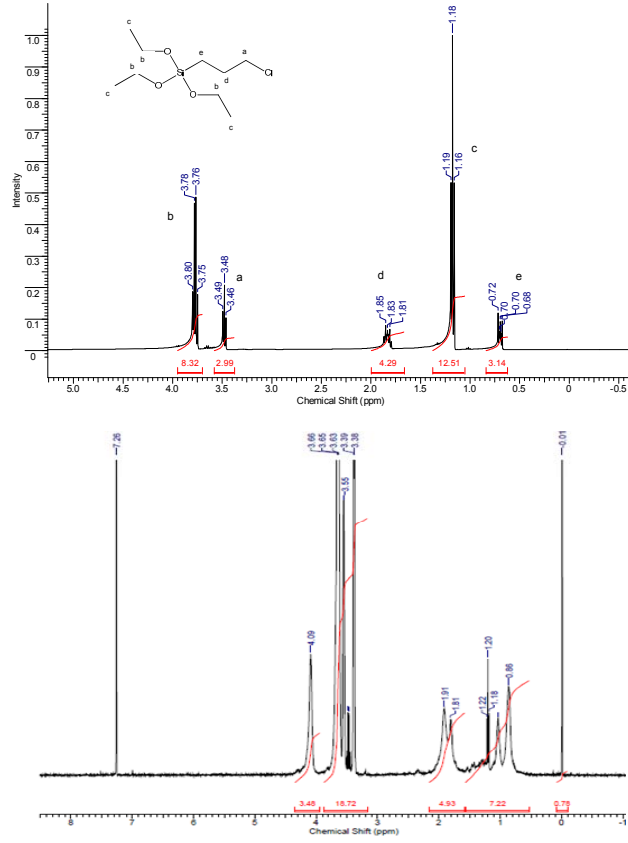
Şekil 4.1. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) PDS modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst) ^1H NMR spektrumları.



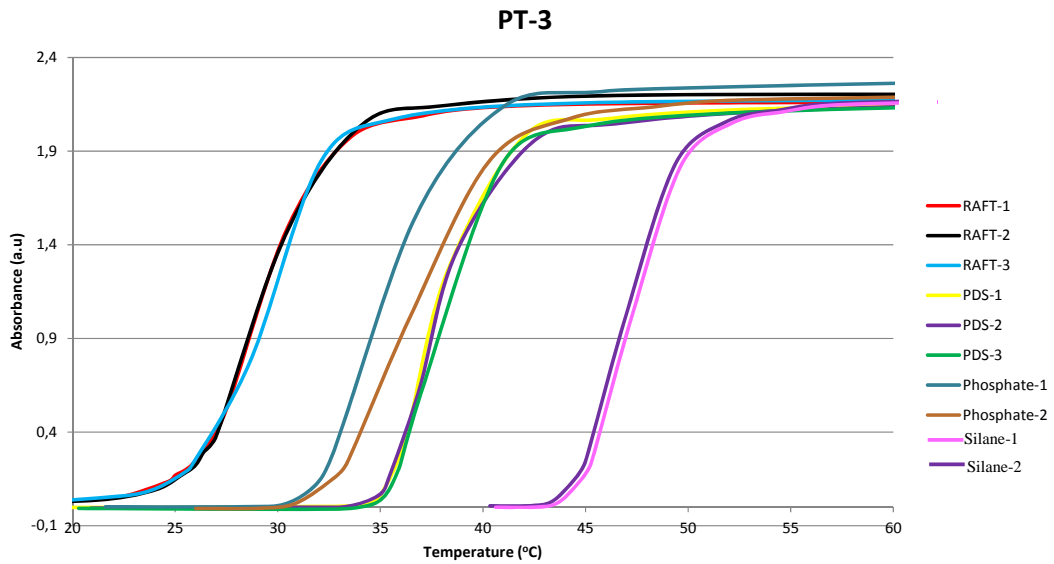
Şekil 4.2. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP modifikasyonu öncesi (alt) ve sonrası (üst), ve DEBrPP bileşiğinin (en üst) ¹H NMR spektrumları.



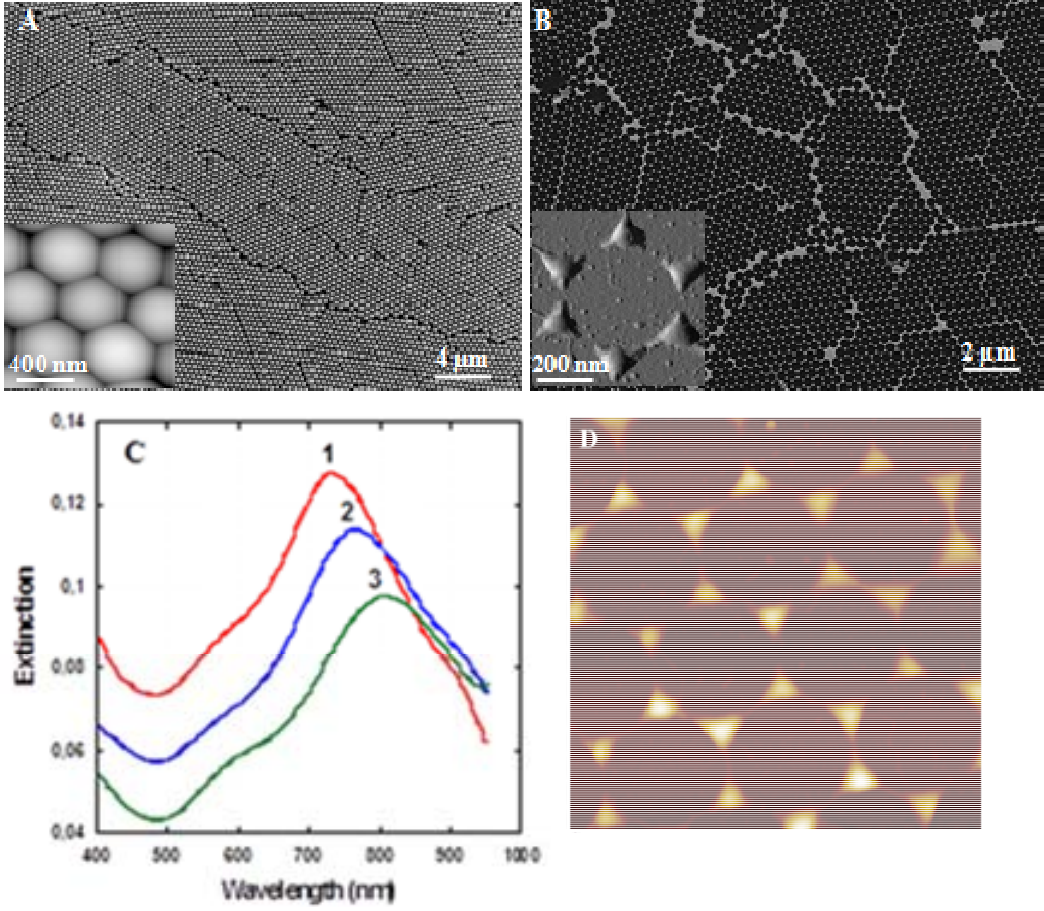
Şekil 4.3. PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) DEBrPP ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası ³¹P NMR spektrumu. İçteki spektrum DEBrPP bileşiğine aittir.



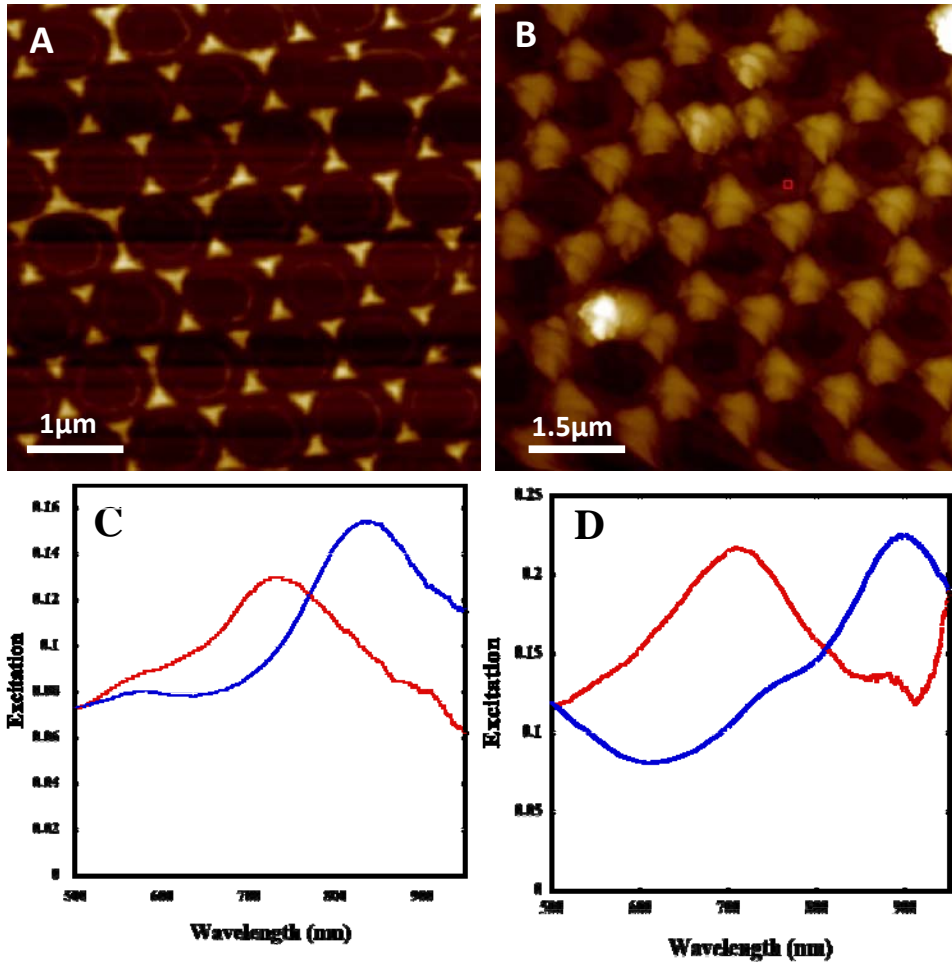
Şekil 4.4. Üst spektrum: CITESi bileşiğinin ¹H NMR spektrumu; Alt spektrum: PT-1 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) CITESi ile modifikasyonu ve saflaştırma sonrası alınan ¹H NMR spektrumu.



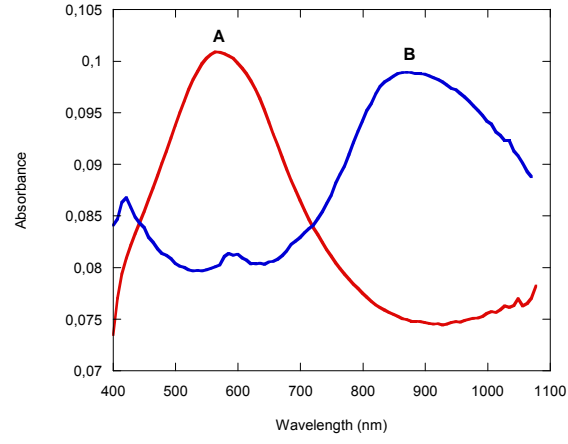
Şekil 4.5. RAFT, PDS, fosfonat ve trietoksisilan uç gruplarına sahip PT-3 kodlu kopolimerin (Tablo 4.1) sıcaklık duyarlı davranışları.



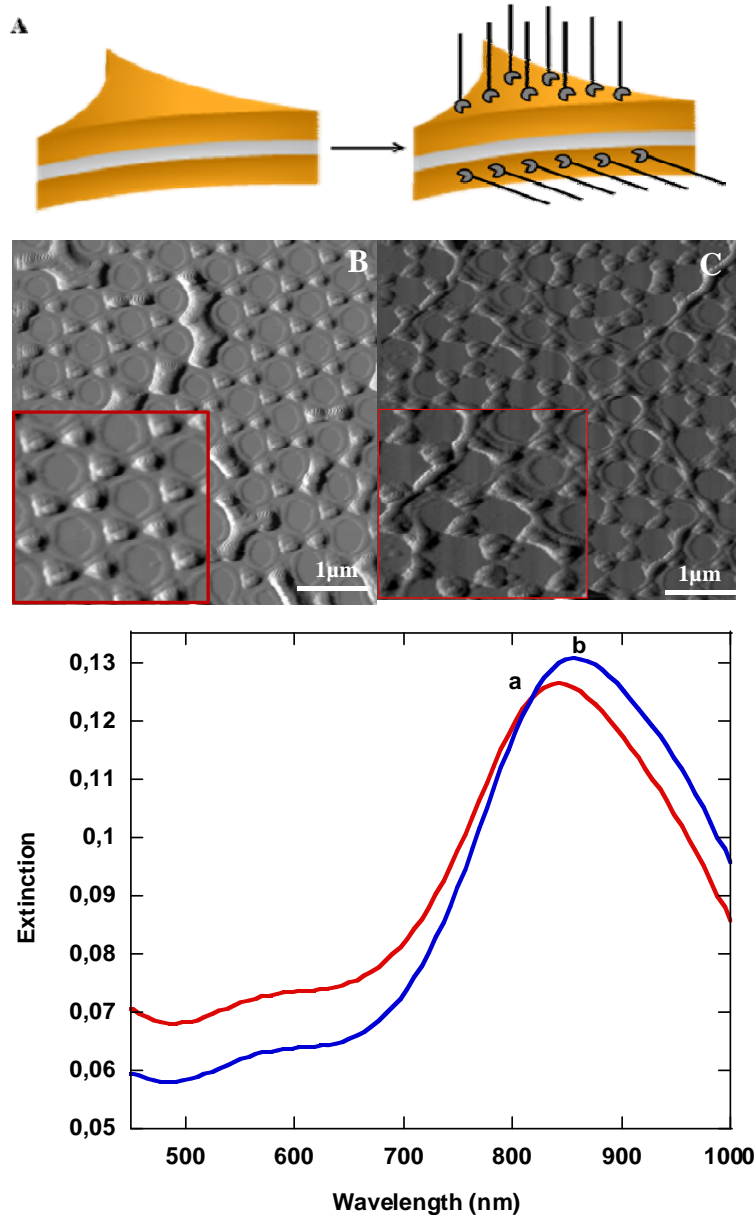
Şekil 4.6. (A) 500 nm çapında polistiren kürelerin altıgen sıkı istif dizisinin SEM görüntüsü. Panel A'nın içindeki ek görüntü, 1.5x1.5 μm tarama alanı ile yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (B) Nanoparçacık dizilerin SEM görüntüsü. Panel B'nin içindeki ek görüntü 800x800 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsüdür. (C) Cam üzerinde Au nanoparçacık dizilerinin LSPR kayma spektrumları. Spektrumlar, 200 ± 5 nm sabit çaplı ve değişen kalınlıklarda nanoparçacıklara aittir (1) 50 nm, $\lambda_{max}= 739,1$ nm; (2) 30 nm, $\lambda_{max}= 763,9$ nm; (3) 20 nm, $\lambda_{max}= 794,7$ nm. (D) Silikon alttaşı üzerinde oluşturulmuş Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin 700x700 nm'deki yüksek çözünürlükte AFM görüntüsü.



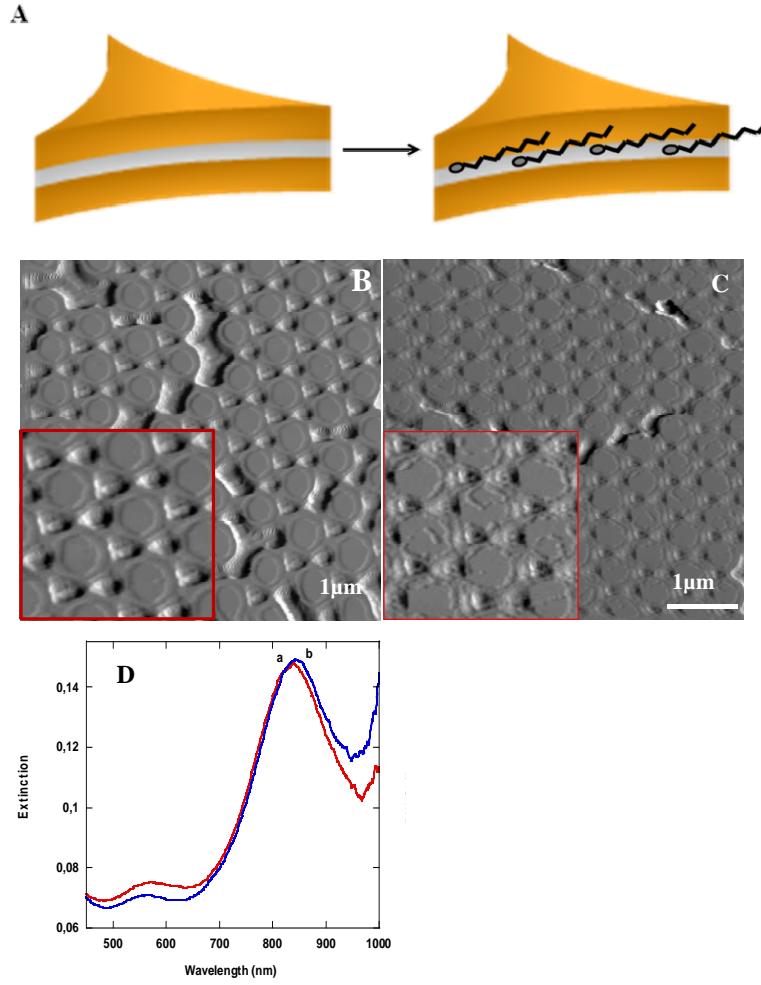
Şekil 4.7. Silikon alttaş üstünde oluşturulmuş (A) Au tek tabaka nanoparçacık dizisinin ve (B) Au / Al₂O₃ / Au nanosandviç dizisinin AFM görüntüleri; (C) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, λ_{\max} = 700 nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm Al₂O₃/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 835 nm. D) Cam üzerinde oluşturulmuş (a) 50 nm Au nanoparçacık dizisi, λ_{\max} = 712 nm ve (b) 20 nm Au/ 20 nm HfO₂/ 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 898 nm.



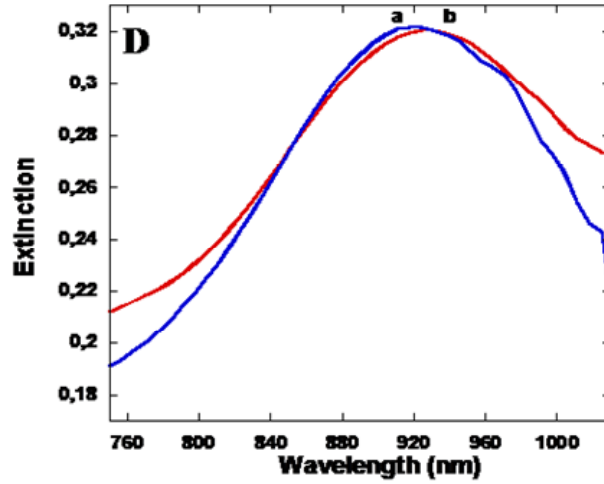
Şekil 4.8. Cam üstünde oluşturulmuş Ag tek tabaka nanoparçacık dizisinin NSL’de kullanılan PS mikroküre çapına göre LSPR spektrumları: (A) 0.5 μm PS; $\lambda_{\text{max}}= 569$ nm. (B) 1 μm PS $\lambda_{\text{max}}= 880$ nm.



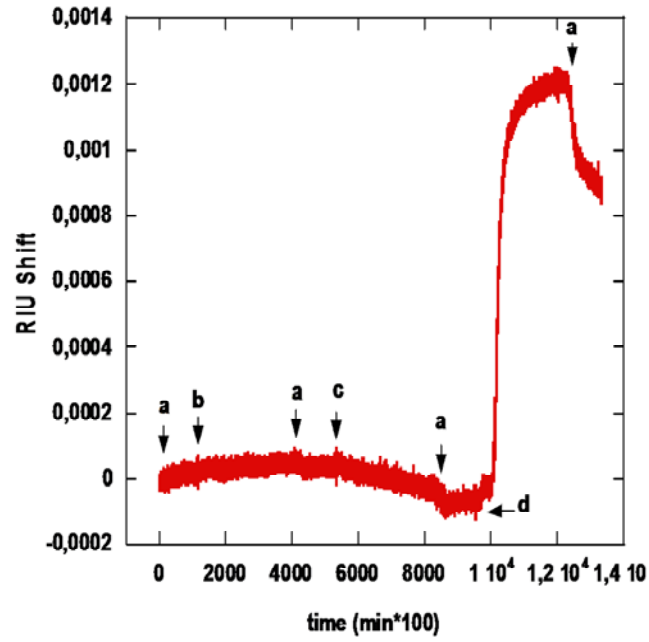
Şekil 4.9. (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Au katmanının tiyol uç gruplu polimer (PT-2, tiyol uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 μm x 1.5 μm çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 832.24 nm) ve (b) sonrası (λ_{\max} = 849.66 nm) LSPR kaymaları.



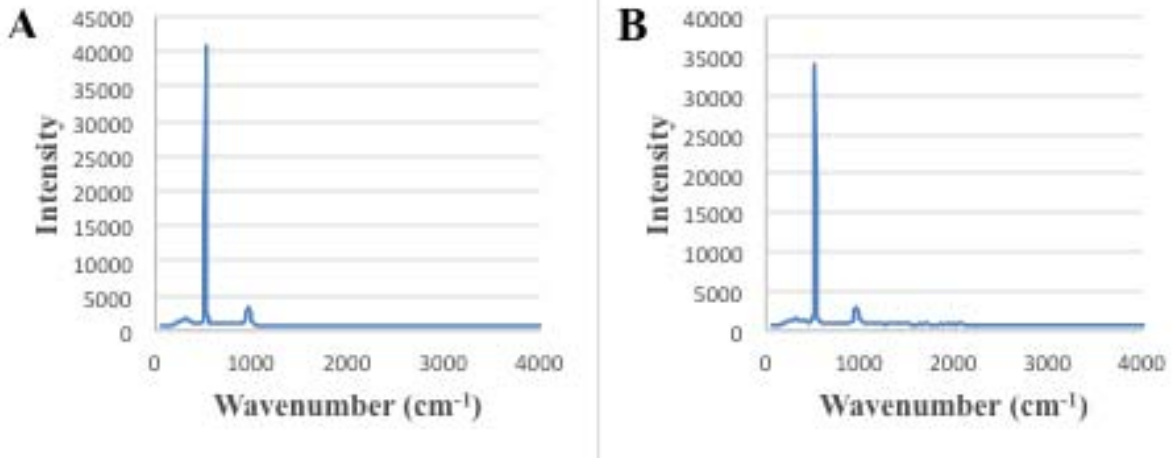
Şekil 4.10. (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin Al₂O₃ katmanının fosfonat uç gruplu polimer (PT-2 kodlu, fosfonat uçlu, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası silikon yüzey üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 μm x 1.5 μm çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 836.6 nm) ve (b) sonrası (λ_{\max} = 843.13 nm) LSPR kaymaları.



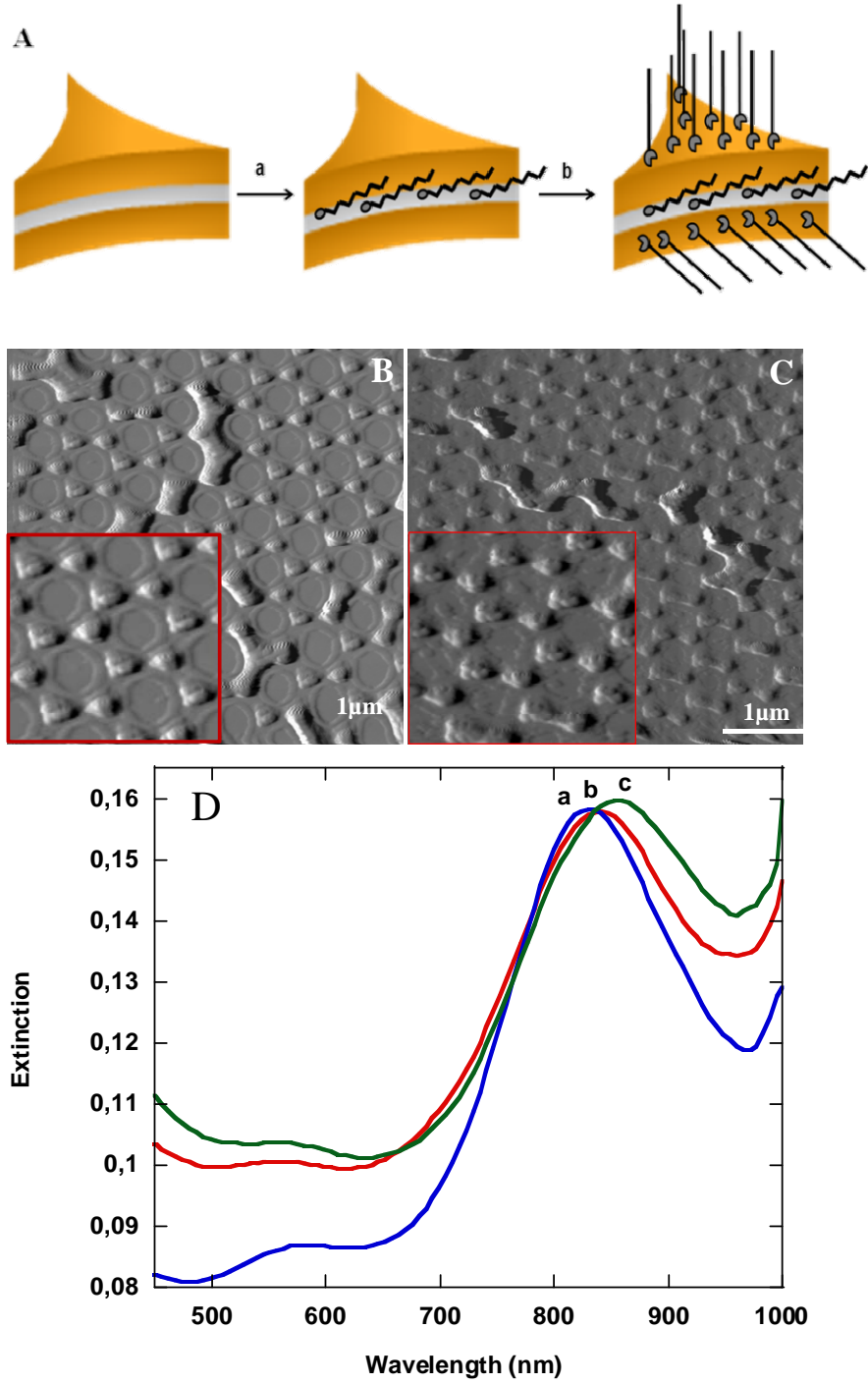
Şekil 4.11. Cam üzerinde hazırlanmış 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin HfO₂ katmanının silan uç gruplu polimer (PT-6, silan uç grup, Tablo 4.1) ile modifikasyonu (a) öncesi (λ_{\max} = 918.8 nm) ve (b) sonrası (λ_{\max} = 928.8 nm) LSPR spektrumları.



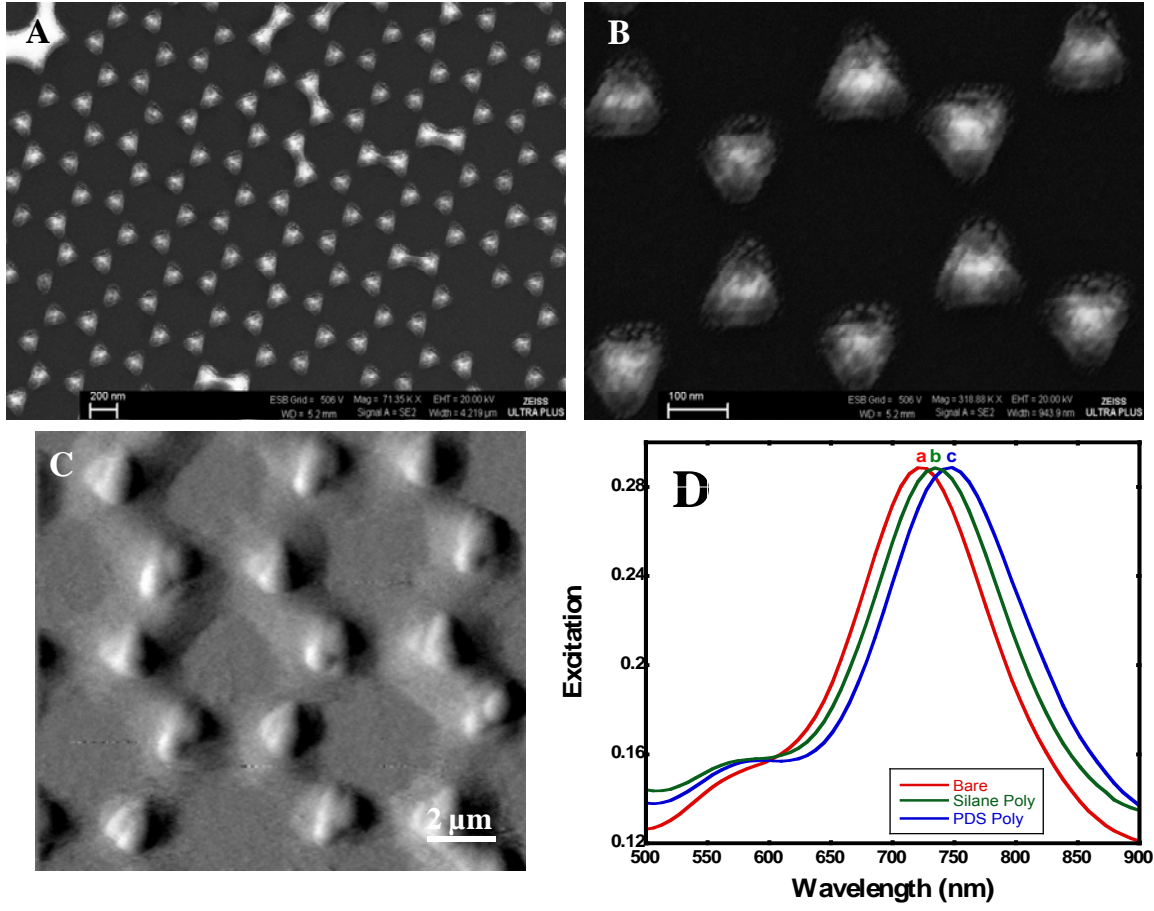
Şekil 4.12. SPR sensogramı: (a) ultra saf su enjeksiyonu (200 µl/dk, 10 dk), (b) DeBrPP enjeksiyonu (100 µl/dk, 30 dk), (c) ATEs enjeksiyonu (100 µl/dk, 30 dk), (d) tiyol uç gruplu polimer enjeksiyonu (100 µl/dk, 30 dk). Fonksiyonel grupların konsantrasyonu 0.01 mM'da sabit tutulmuştur.



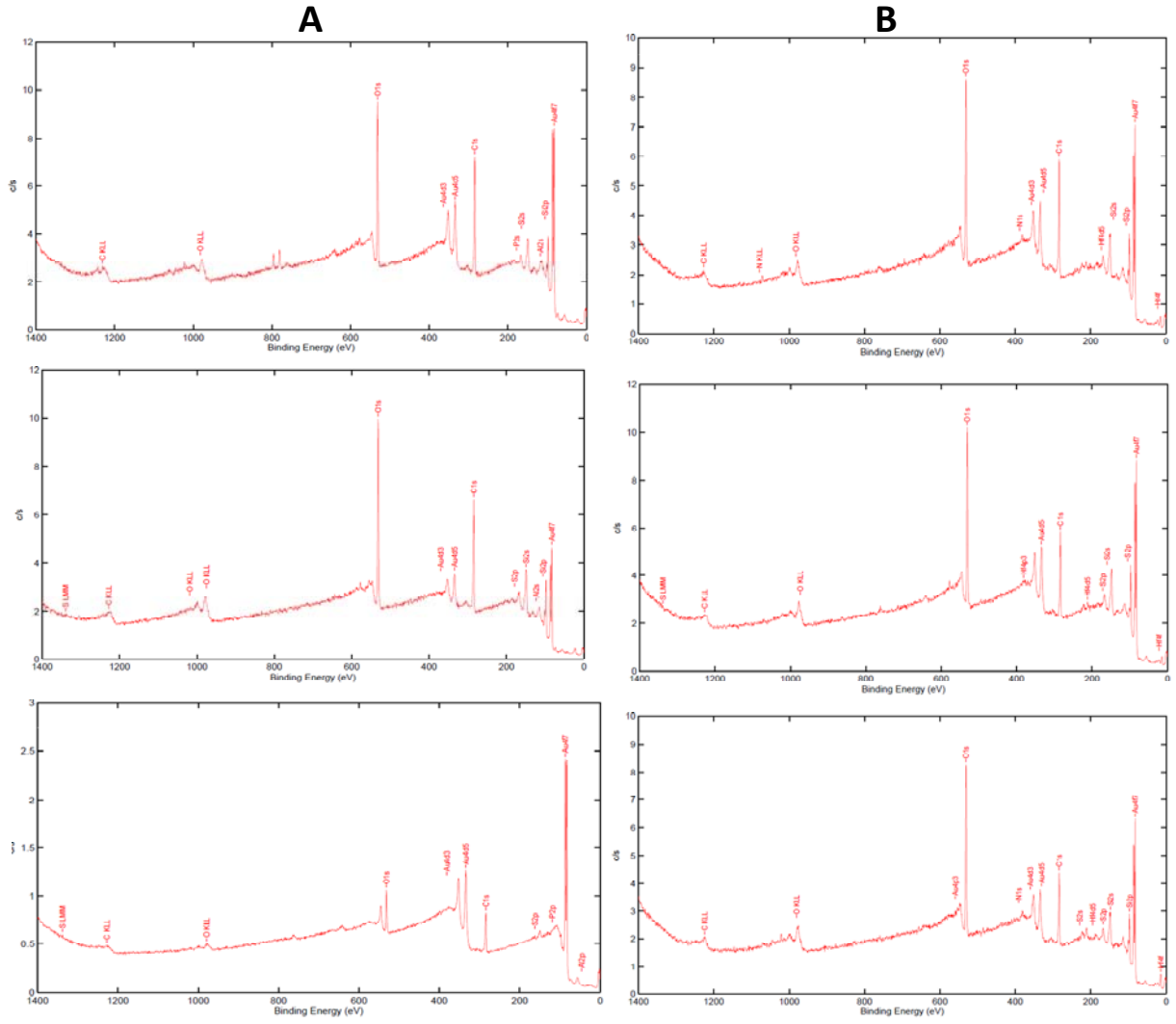
Şekil 4.13. (A) Al₂O₃ ve (B) HfO₂ tek katmanlı nanodiziler ile tiyol fonksiyonel polimerin inkübasyonu sonrası alınmış Raman spektrumları.



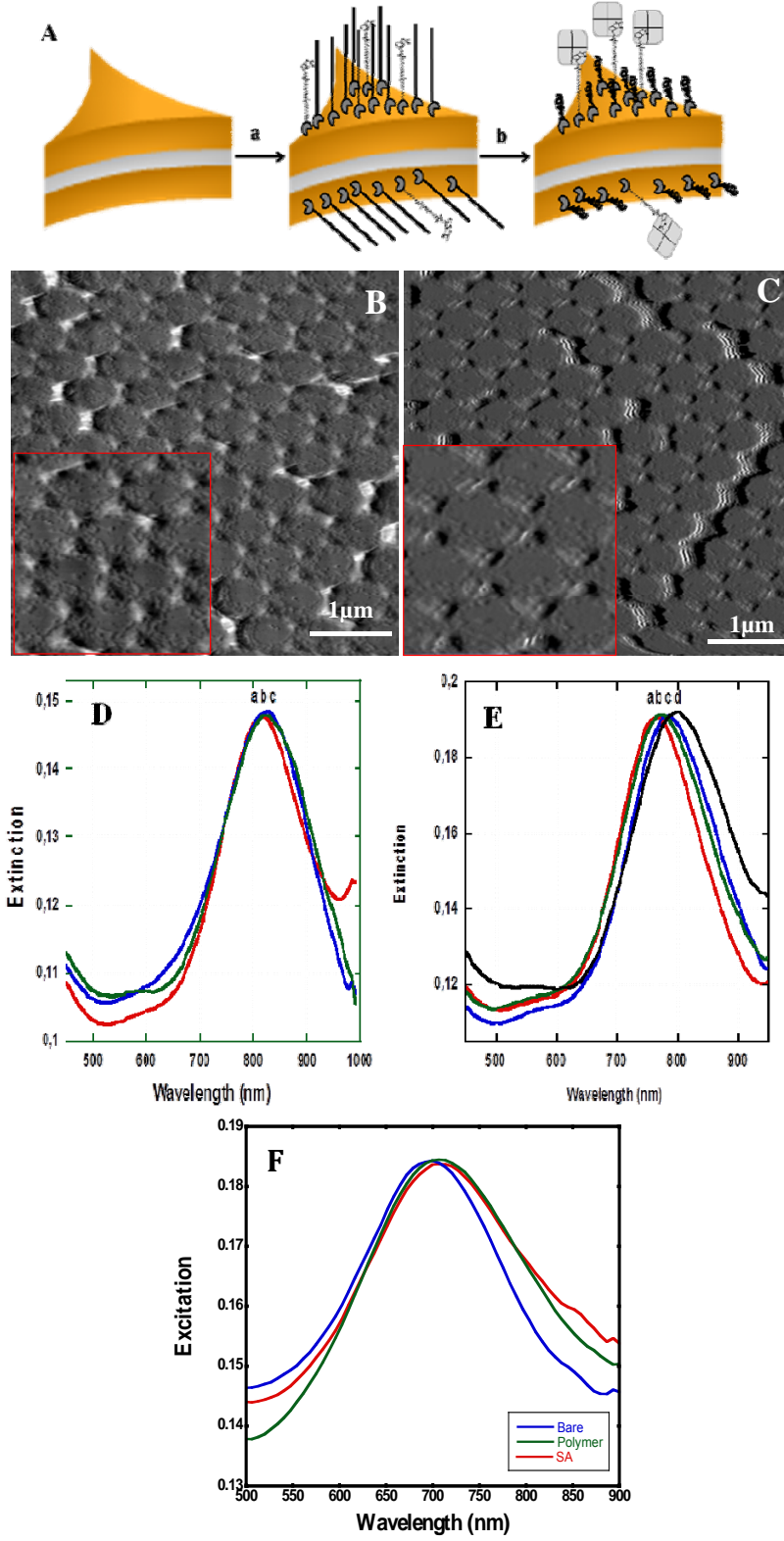
Şekil 4.14. (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve fosfonat uç gruplu polimerler (PT-2 fosfonat ve PT-6 tiyol uç gruplu polimerler, Tablo 4.1) ile modifikasyonunun şematik gösterimi. (B) Modifikasyon öncesi ve (C) sonrası Si üstünde hazırlanmış nanodizilerin tıklamalı modda AFM ile alınmış görüntüleri. İç görüntüler 1.5 μm x 1.5 μm çözünürlüklüdür. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi (λ_{\max} = 831.37 nm) ve (b) fosfonat uç gruplu polimerle (λ_{\max} = 838.78 nm) ve takiben (c) tiyol uç gruplu polimer (λ_{\max} = 853.13 nm) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları.



Şekil 4.15. Silikon yüzey üzerinde hazırlanmış 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizilerinin tüm katmanlarının tiyol ve silan uç grulu polimerler (PT-6 kodlu, silan ve tiyol uçlu polimerler, Tablo 4.1) ile (A) modifikasyon öncesi SEM ve (B ve C) modifikasyon sonrası SEM ve çekiç mod AFM görüntüleri. (D) Cam üzerinde hazırlanmış nanodizilerin modifikasyon (a) öncesi ($\lambda_{max} = 723$ nm), (b) silan uç grulu polimerle ($\lambda_{max} = 734$ nm) ve takiben (c) tiyol uç grulu polimer ($\lambda_{max} = 746$ nm) ile inkübasyonu sonrası LSPR kaymaları.

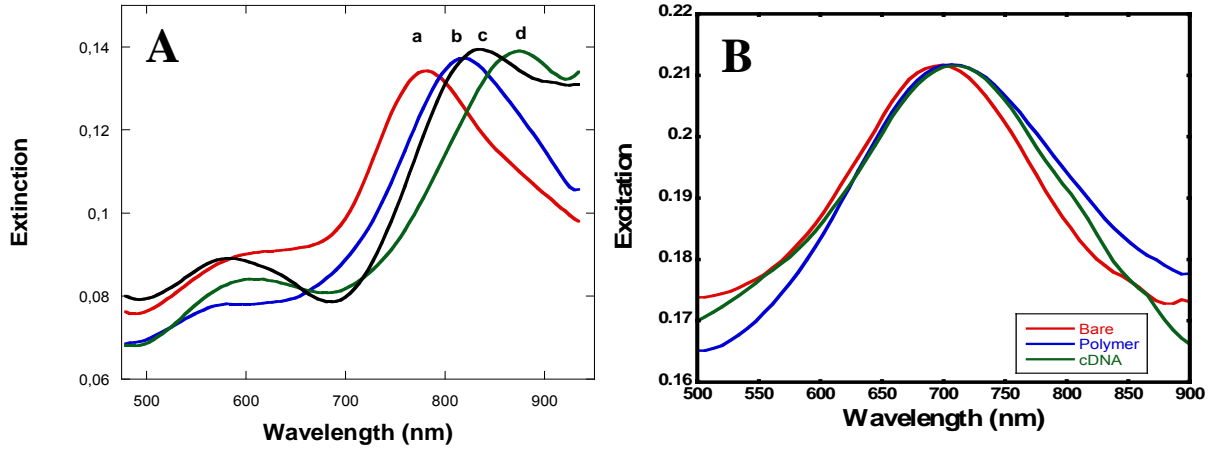


Şekil 4.16. Tiyol, fosfonat ve silan uç gruplu polimerlerle modifiye edilmiş (A) 20 nm Au / 20 nm Al₂O₃ / 20 nm Au ve (B) 20 nm Au / 20 nm HfO₂ / 20 nm Au nanosandviç yüzeylerin XPS spektrumları. Üst spektrum (A) sadece fosfonat ve (B) sadece silan uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Orta spektrum tiyol uç gruplu polimer ile modifikasyon sonrası. Alt spektrum (A) fosfonat + tiyol ve (B) silan + tiyol uç gruplu polimerlerle modifikasyon sonrası.

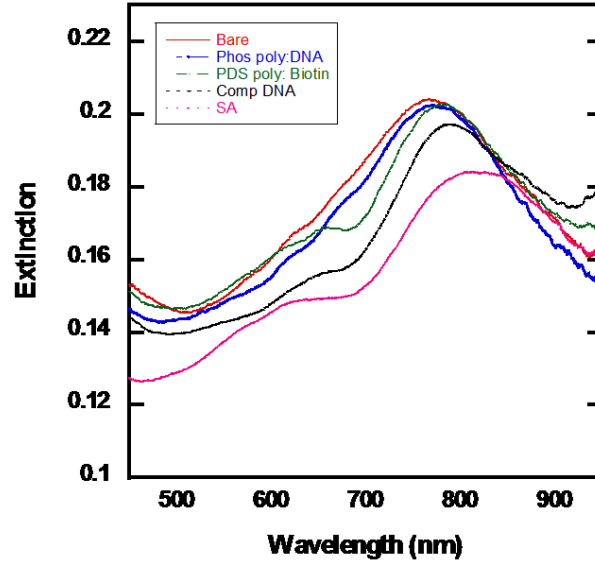


Şekil 4.17. (A) Tiyol uç grulu polimer (PT-6 tiyol uçlu polimer, Tablo 4.1, LCST= 51.5°C, M_{nGPC} = 3.2 kg/mol) ve biyotin ile işlevselleştirilmiş nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü

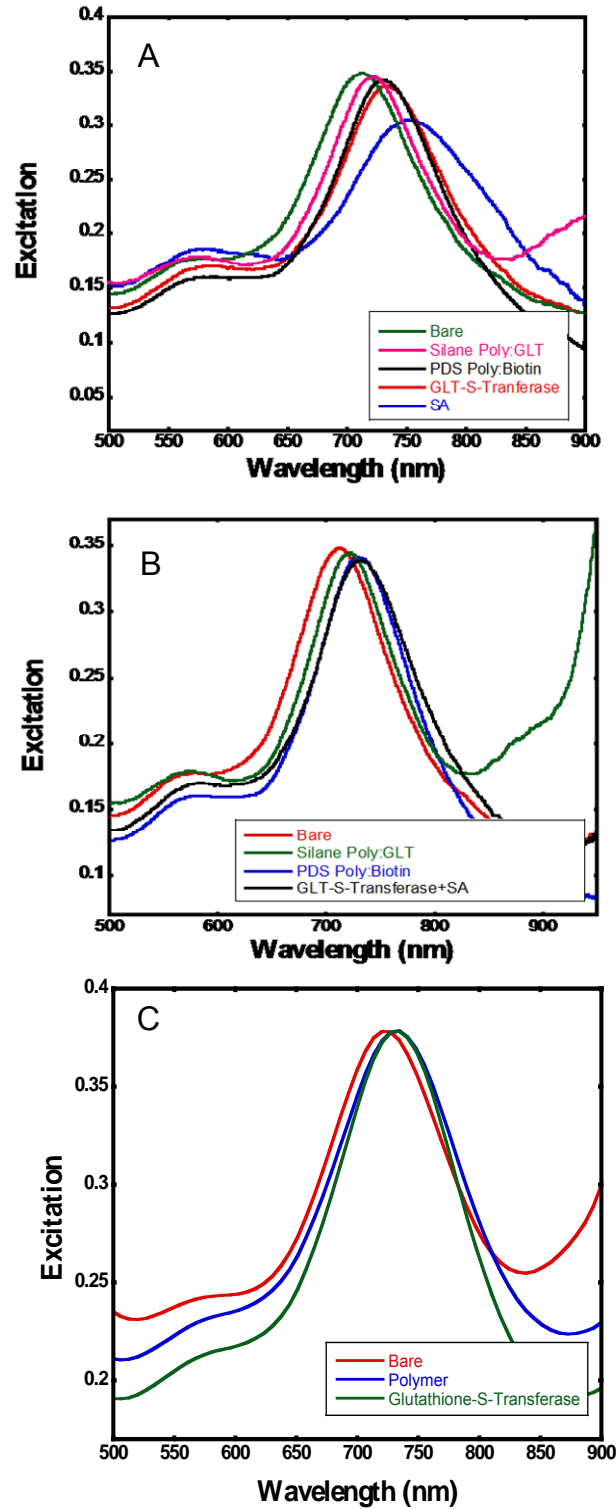
olarak SA'nın bağlanması şematik olarak gösterimi. a- Nanosandviç yüzeyinin polimer zincirleri ve biyotin molekülleri ile işlevselleştirilmesi, b- ortam sıcaklığının kullanılan polimerin LCST değeri üstüne çıkarılarak yüzeydeki biyotinler ile çözeltideki SA moleküllerinin etkileşmesinin sağlanması. (B) Nanosandviç yüzeylerin polimer + biyotin ile modifikasyonu öncesi ve (C) sonrası tıklamalı mod AFM görüntüleri. (D) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) oda sıcaklığında SA ile inkübasyon sonrası. (E) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin polimer + biyotin ile modifikasyonu (a) öncesi ve (b) sonrası, (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, (d) 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası. (F) LSPR Ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu (mavi pik) öncesi ve (yeşil pik) sonrası, (kırmızı pik) sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'ye ısıtılmasından sonra, 55°C'de SA ile inkübasyon sonrası.



Şekil 4.18. A) Fosfonat uç gruplu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCTS= 35.6 °C, $M_{GPC}= 3.2$ kg/mol) ve dA_8 ile işlevselleştirilmiş 30 nm Au / 30 nm Al_2O_3 / 30 nm Au nanosandviç dizisine sıcaklık kontrollü dT_8 bağlanmasının LSPR ile analizi. Nanosandviçlerin polimer + dA_8 ile modifikasyonu (a) öncesi ($\lambda_{max}= 780$ nm) ve (b) sonrası ($\lambda_{max}= 818$ nm), (c) işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra ($\lambda_{max}= 833$ nm), (d) 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası ($\lambda_{max}= 872$ nm). B) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin sadece polimer ile modifikasyonu öncesi (kırmızı pik) ve sonrası (mavi pik), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'ye ısıtılmasından sonra, 42°C'de dT_8 ile inkübasyon sonrası (yeşil pik).

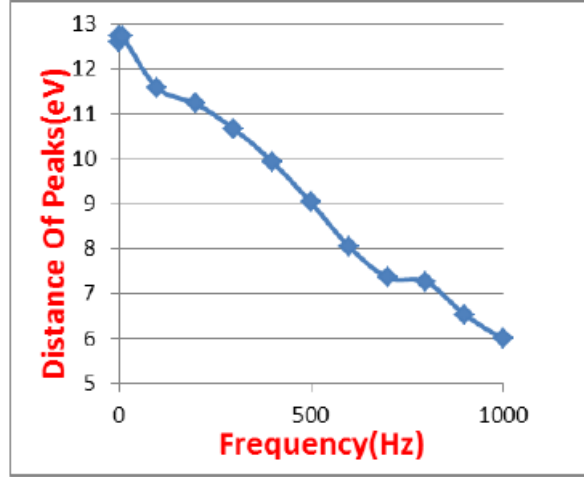


Şekil 4.19. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. Kırmızı spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm Al₂O₃ / 20 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{\max} = 768 nm; Mavi spektrum: fosfonat uçgruplu polimer (PT-2, Tablo 4.1, LCTS= 35.6 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + dA₈ karışımı ile Al₂O₃ ara katmanının modifikasyonu, λ_{\max} = 774 nm; Yeşil spektrum: tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) + biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{\max} = 782 nm; Siyah spektrum: tüm katmanları foksionelleştirilmiş nanosandviçlerin 42°C'de dT₈ ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 789 nm; Pembe spektrum: tüm katmanları foksionelleştirilmiş ve 42°C'de dT₈ bağlanmış nanodizilerin 55°C'de dT₈ ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 819 nm.

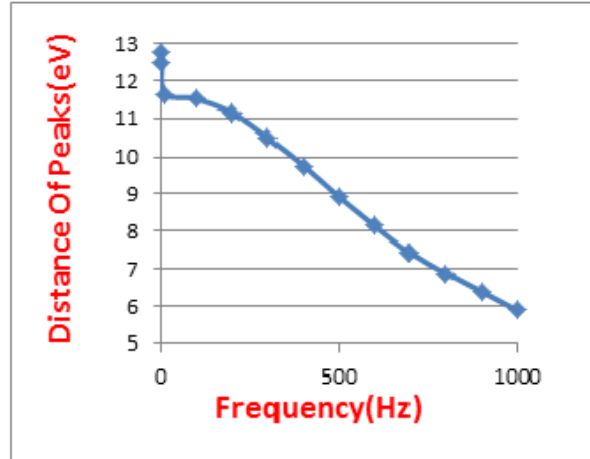


Şekil 4.20. Çoklu biyotanıma olayının LSPR ile analizi. A) Yeşil spektrum: fonksiyonelleştirilmemiş 30 nm Au / 30 nm HfO₂ / 30 nm Au nanosandviç dizisi, λ_{max} = 714 nm; Pembe spektrum: silan uçgruplu polimer (PT-3, Tablo 4.1, LCTS= 44.9 °C, Mn_{GPC}= 4.4 kg/mol) +GLT karışımı ile HfO₂ ara katmanının modifikasyonu, λ_{max} = 721 nm; Siyah spektrum: tiyol uç gruplu polimer (PT-6, Tablo 4.1, LCTS= 51.5 °C, Mn_{GPC}= 3.2 kg/mol) +

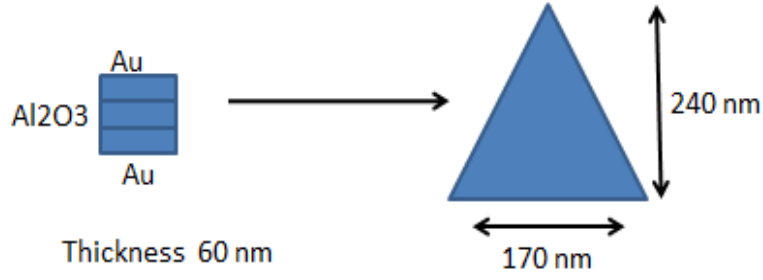
biyotin karışımı ile Au katmanların modifikasyonu, λ_{\max} = 731 nm; Kırmızı spektrum: tüm katmanları foksionelleştirilmiş nanosandviçlerin 50°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 735 nm; Mavi spektrum: tüm katmanları foksionelleştirilmiş ve 50°C'de GST bağlanmış nanodizilerin 55°C'de GST ve SA karışımı ile inkübasyonu sonrası, λ_{\max} = 755 nm. B) LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{\max} = 714 nm) ve sonrası (silan uç gruplu polimer + GLT ile modifikasyonu sonrası, yeşil pik λ_{\max} = 721 nm, ve tiyol uç gruplu polimer + biyotin ile modifikasyon sonrası, mavi pik λ_{\max} = 731 nm), işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin oda sıcaklığında, GST ve SA ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{\max} = 731 nm). C) Kontrol deneyi LSPR ölçümleri: nanosandviçlerin modifikasyonu öncesi (kırmızı pik, λ_{\max} = 723 nm) ve sonrası (tiyol uç gruplu polimer, mavi pik λ_{\max} = 732 nm), sadece polimer ile işlevselleştirilmiş nanosandviçlerin 55°C'de, GST ile 30 dakika inkübasyon sonrası (siyah pik, λ_{\max} = 733 nm).



Şekil 4.21. Au/Al₂O₃/Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi.



Şekil 4.22. Au/HfO₂/Au nanosandviçleri için piklerin arasındaki uzaklığın frekans ile değişimi.



Şekil 4.23. Nanosandviçin şematik gösterimi (Au/ HfO₂/ Au). Kalınlık= 60 nm, yükseklik= 240 nm ve genişlik= 170 nm

Sınır Frekansı	2000	1/s
Direnç	10000000	Ohm
<u>Deneysel Kapasitans</u>	7.96178E-12	Farad
	0.007961783	nF
	7.961783439	pF

<u>Teorik Kapasitans</u>				
Alan	8.16E-10	m ²	E0	8.854E-12
Dielektrik Kalınlık	20	nm	m	0.00000002
Relatif Geçirgenlik	9.4	SI		
Kapasitans	3.39569E-12	F		
	0.003395686	nF		
	3.39568608	pF		

Şekil 4.24. Gerçek ve teorik kapasitans değerlerinin hesaplanması.



TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Yrd. Doç. Dr. HADİ M. ZAREİE
Proje No:	110T759
Proje Başlığı:	Smart Nanostructure Arrays For Detection Of Multiplex Biomolecules
Proje Türü:	Araştırma
Proje Süresi:	36
Araştırmacılar:	ESMA VOLGA BULMUŞ ZAREİE
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENS.
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/04/2011 - 01/10/2014
Onaylanan Bütçe:	369415.0
Harcanan Bütçe:	338461.62
Öz:	<p>Biyolojik maddelerin hızlı, nicel ve paralel bir şekilde algılanabilmesine, biyomedikal, çevre, biyoteknoloji, savunma ve tarım gibi birçok alanda ihtiyaç duyulmaktadır. Birim kütle başına çok geniş yüzey alanına sahip olan nanomalzemeler boyuta ve şekle bağlı eşsiz kimyasal ve fiziksel özellikler sergilerler. Bu özellikleri sayesinde nanomalzemeler, biyolojik numunelerin algılanmasında son derece duyarlı, etikete/işaretlemeye ihtiyaç duymayan, hızlı metotlar geliştirmek için eşsiz fırsatlar sunmaktadır.</p> <p>Bu projede hedefimiz, birden fazla biyolojik maddenin etikete/işaretlemeye ihtiyaç duymadan, nicel ve paralel şekilde algılanması için duyarlı ve hızlı bir sistemin geliştirilmesine yönelik olarak sıcaklık-duyarlı polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş sandviç-benzeri nanoyapıların desenli dizilerinin üretilmesi ve çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak lokalize yüzey plazmon rezonansının (LSPR) ve kapasitansının incelenmesidir.</p> <p>Bu amaçla öncelikle sandviç-benzeri nanoyapıların desenli dizileri nanoküre litografisi tekniği ile üretilmiştir. Sandviç-benzeri nanoyapılar, metal-yalıtkan-metal üçlü tabakalardan oluşturulmuştur. Bu nanosandviç dizileri, model biyomoleküller (biyotin, glutatyon ve tek-sarmal oligoadenin) ve sıcaklık-duyarlı polimer ile fonksiyonelleştirilmiştir. Nanosandviç dizilerinin hazırlanması ve yüzey modifikasyonları, taramalı elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskopisi, UV-görünür-yakın kızılötesi spektrofotometrisi aracılığıyla LSPR ölçümleri, X-ışını fotoelektron spektrometresi (XPS) gibi farklı teknikler ile doğrulanmıştır. Farklı transdüksiyon mekanizmalarını incelemek için, polimerler ve biyomoleküller ile fonksiyonelleştirilmiş nanodizilerin lokalize yüzey plazmon rezonansı ve kapasitansı, çoklu biyomolekül bağlanma olaylarının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. LSPR ve XPS kapasitans ölçümleri, nanodizilerin işlevselleştirilmesi adımlarını ve daha da önemlisi sıcaklık kontrollü olarak biyotin-streptavidin ve oligoadenin-oligotimin veya biyotin-streptavidin ve glutatyon-glutatyon S-transferaz biyotanıma olaylarını açıkça göstermiştir.</p> <p>Sonuç olarak, bu projenin çıktısı biyomedikal, çevre, biyoteknoloji, tarım, savunma ve benzer endüstrilerde doğrudan uygulamaları olacak yeni ve iyileştirilmiş biyosensörlerin geliştirilmesine yönelik yeni nanomalzemeler ve yöntemler olmuştur.</p>
Anahtar Kelimeler:	nanolitografi, nanocihazlar, nanodiziler, uyarı-cevap polimerleri, yüzey plazmon rezonans, biyoçip
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır
Projeden Yapılan Yayınlar:	1- Decorating Surfaces using Organic and Biological Molecules (Bildiri), 2- Bottom-Up and Top-Down Nanofabrication for Molecular Electronics and Biosensors (Bildiri), 3- Effect of end-group modification on phase transition of oligo (ethylene glycol)-grafted polymers (Bildiri), 4- Self-assembled monolayers of temperature-responsive oligo(ethylene glycol)-grafted polymers (Bildiri)