

TOBB EKONOMİ VE TEKNOLOJİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PLAZMA POLİMERİZASYONU YÖNTEMİ KULLANILARAK
KUVARTZ AYAR ÇATALI TABANLI
TROPONİN-T BİYOSENSÖR PLATFORMUNUN HAZIRLANMASI**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Pelin KÖMÜRCÜ

Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

ARALIK 2017

Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı

.....
Prof. Dr. Osman EROĞUL
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora derecesinin tüm gereksinimlerini sağladığını onaylarım.

.....
Prof. Dr. Hamza KURT
Anabilimdalı Başkanı V.

TOBB ETÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü'nün **141611009** numaralı Yüksek Lisans Öğrencisi **Pelin KÖMÜRCÜ** 'nün ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "**Plazma Polimerizasyonu Yöntemi Kullanılarak Kuvartz Ayar Çatalı Tabanlı Troponin-T Biyosensörünün Geliştirilmesi**" başlıklı tezi **06.12.2017** tarihinde aşağıda imzaları olan jüri tarafından kabul edilmiştir.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Mehmet MUTLU**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Doç. Dr. G. Barış BAĞCI (Başkan)**
TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi

Doç. Dr. İsmail Cengiz KOÇUM
Başkent Üniversitesi

TEZ BİLDİRİMİ

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, alıntı yapılan kaynaklara eksiksiz atıf yapıldığını, referansların tam olarak belirtildiğini ve ayrıca bu tezin TOBB ETÜ Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlandığını bildiririm.

Pelin KÖMÜRCÜ

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

PLAZMA POLİMERİZASYONU YÖNTEMİ KULLANILARAK KUVARTZ

AYAR ÇATALI TABANLI TROPONİN-T BİYOSENSÖRÜNÜN

GELİŞTİRİLMESİ

Pelin KÖMÜRCÜ

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Mikro ve Nanoteknoloji Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Tarih: Aralık 2017

Akut miyokard infarktüs (AMI), kalbe giden kan dolaşımının aniden kesilmesi sonucunda, kalp kaslarının zarar görmesi ya da kalp kası hücrelerinin ölmesine sebep olabilmekte, bu da hastalarda sakatlık ya da ölüme yol açabilmektedir. Kalbin beslenememesi sonucu oluşan bu durumda, kalp kaslarının salgıladığı proteinler arasında Troponin-T de bulunmakta ve AMI başlangıcından itibaren ilk 1 saat içinde kandaki konsantrasyonu yaklaşık 2 katına çıkmaktadır. Bu çalışmada, plazma polimerizasyonu yöntemi kullanılarak kütle hassas kuvarz ayar çatalı (QTF) tabanlı bir Troponin-T sensörü geliştirilmesi amaçlanmıştır. Kuvarz ayar çatalı yüzeyi; n-heptilamin, pentilamin ve 1,2-diaminosikloheksan ile farklı güç ve uygulama sürelerinde plazma polimerizasyonu yöntemi kullanılarak modifiye edilmiştir. Yüzey üzerinde elde edilen ince filmlerin temas açıları film kararlılığını belirlemek amacı ile 1 ay boyunca takip edilmiştir. Bunun yanı sıra elde edilen direnç ölçümlerinde direncin 0.01 MΩ seviyesinden 4.28 MΩ seviyesine kadar çıktığı gözlenmiştir.

İnce film özellikleri, taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS) ve Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) gibi görüntüleme ve spektroskopik yöntemler ile karakterize edilmiştir. QTF yüzeyine kaplanan filmler daha sonra farklı sürelerde glüteraldehit (GA) buharı ve çözeltisi ile etkileştirilerek kimyasal olarak aktive edilmiştir. Piezoelektrik özellik taşıyan QTF'lerin frekans değişimleri bu tüm değişim uygulanan süreçler öncesi ve sonrasında takip edilmiştir. Bu ölçümler kaplanan ince film hakkında bilgiler vermenin yanında, geliştirilmesi hedeflenen kütle hassas biyosensör için büyük önem taşımaktadır. Elde edilen sonuçlara göre, yüzey aktivasyonu yapılan QTF'lere farklı konsantrasyonlarda sığır serum albumin bağlanmış ve frekans değişimleri takip edilmiştir. Elde edilen verilerin, kütle hassas biyosensör platformlarının gelişimine öncülük etmesi beklenmektedir.

Anahtar Kelimeler: Plazma polimerizasyonu, Kuvartz ayar çatalı, Troponin-T

ABSTRACT

Master of Science

DEVELOPMENT OF QUARTZ TUNING FORK BASED TROPONIN-T

BIOSENSOR BY PLASMA POLYMERIZATION METHOD

Pelin KÖMÜRÇÜ

TOBB University of Economics and Technology
Institute of Natural and Applied Sciences
Micro and Nanotechnology Science Programme

Supervisor: Prof. Dr. Mehmet MUTLU

Date: December 2017

Acute myocardial infarction (AMI) may be the reason of irreversible myocardial cell damage or ischemic necrosis in case of a sudden loss in the blood supply to myocardium. This medical case can cause the death or disability of the patient. In case of ischemia, heart muscles release some proteins including Troponin-T. The concentration of this protein levels to twice of its initial concentration in blood within the first hour after heart attack. In this study, development of quartz tuning fork (QTF) based troponin-T biosensor by plasma polymerization method has been introduced. Surface modification of quartz tuning fork made by plasma polymerization method at different discharge powers and exposure times with n-heptylamine, pentylamine and 1,2-diaminocyclohexane. Contact angle of the thin films deposited on the surface has been investigated for 30 days interval. In the resistivity measurements it has been seen that the initial resistivity has been increased from 0.01 M Ω to 4.28 M Ω .

Thin film properties have been characterized by scanning electron microscopy (SEM), atomic force microscopy (AFM), X-Ray photoelectron spectroscopy (XPS) and fourier transform infrared spectroscopy (FTIR). These films were to exposed Glutheraldehyde (GA) in different mediums and exposure times in order to activate

the surface. Frequency shifts of these QTFs were to be measured before and after glutaraldehyde activation. These measurements both gives important data on deposited thin films and is very important for the development of the immunosensor. After the activation of the surfaces, QTFs ere to dipped into different concentrations of bovine serum albumin and the frequency shifts were investigated. These findings will be useful for the development of mass sensitive biosensor platforms.

Keywords: Plasma Polymerization, Quartz tuning fork, Troponin-T.



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans süresince kurtarıcım olan ve beni her koşulda yönlendiren başta danışman hocam sayın Prof. Dr. Mehmet MUTLU olmak üzere kıymetli hocalarım sayın Prof. Dr. Osman Eroğul'a, Doç. Dr. Zarife Göknur Büke'ye ve Dr. Hatice Duran Durmuş'a teşekkürlerimi bir borç bilirim. Minnettarım.

TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi ailesine akademik hayatıma sağladığı desteklerden dolayı teşekkür ederim.

Beni hiç bir koşulda yalnız bırakmayan sevgili ve saygıdeğer dostlarım Hatice Ferda Özgüzar, Ömer Refet Çaylan ve Doğukan Şenyıldız'a; tecrübelerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve desteklerini esirgemeyen laboratuvar arkadaşlarım başta Gizem Can Kaleli ve Gözde Kabay olmak üzere hepsine çok teşekkür ederim. Hepiniz iyi ki varsınız.

Son olarak hayatımın acı-tatlı her anını benimle paylaşan, desteklerini ve emeklerini hiç eksik etmeyen, her kararında yanımda olan ve bana yol gösteren ebeveynlerim Turgut-Vildan Kömürcü'ye ve benim küçük ailem, ev arkadaşım, kardeşim Selen Kömürcü'ye yürekten teşekkürlerimi sunuyorum. Siz olmadan ben bir hiçim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	vii
İÇİNDEKİLER	ix
ŞEKİL LİSTESİ	xi
ÇİZELGE LİSTESİ	xiii
KISALTMALAR	xv
SEMBOL LİSTESİ	xvi
1. GİRİŞ ve LİTERATÜR ÖZETİ	1
1.1 Miyokard İnfarktüsü	2
1.1.1 Miyogloblin.....	2
1.1.2 Kreatin Kinaz	2
1.1.3 Kardiyak Troponin-I	3
1.1.4 Kardiyak Troponin-T	3
1.2 Biyosensörler.....	3
1.2.1 Termal biyosensörler.....	4
1.2.2 Optik biyosensörler	4
1.2.3 Amperometrik biyosensörler.....	4
1.2.4 Kütle hassas (piezoelektrik) biyosensörler	4
1.3 Kuvartz Ayar Çatalı	6
1.4 Plazma Polimerizasyonu	8
1.5 İnce Film Karakterizasyon Yöntemleri	9
1.5.1 Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)	9
1.5.2 Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)	11
1.5.3 Taramalı elektron mikroskobu (SEM)	12
1.5.4 X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS).....	13
1.5.5 Temas açısı ölçümleri (CA)	13
1.6 Gluteraldehit ve Amine Gruplarının Etkileşimleri.....	14
1.7 Model Protein Olarak Sığır Serum Albumin (BSA)	15
2. DENEYSEL GEREÇLER VE YÖNTEM	17
2.1 Deney için Gerekli Kimyasallar	18
2.1.1 Seçilen monomerlerin özellikleri	18
2.2 Yüzeylerin Plazma Polimerizasyonu İçin Hazırlanması	19
2.3 Plazma Polimerizasyonu Yöntemi ile Yüzey Modifikasyonu	21
2.4 Yüzey Modifikasyonu Yapılmış Örneklerin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonu.....	22
2.5 Gluteraldehit ile Yüzey Aktivasyonu	24
2.6 Model Protein Testleri.....	24
3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR	27
3.1 Plazma Polimerizasyonu ile Hazırlanmış Örneklerin Analizleri	27
3.1.1 Temas açısı ölçümleri	27
3.1.2 Direnç ölçümleri	44

3.1.3 Kararlı örneklerin temas açısı ve direnç ölçümleri tekrarları.....	49
3.1.4 QTF örneklerin sıvı ortam kararlılık testleri	50
3.1.5 FTIR ve XPS yüzey analizleri	51
3.1.6 SEM yüzey analizleri	53
3.2 Gluteraldehit Aktivasyonu ve Model Protein Test Analizleri.....	54
4. SONUÇ, ÖNERİLER VE GELECEK ÇALIŞMALAR.....	59
KAYNAKLAR.....	61
ÖZGEÇMİŞ.....	67



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 1.1 : Tipik biyosensör örneği.	1
Şekil 1.2 : Kalp kası illüstrasyonu.....	3
Şekil 1.3 : Kuvartz kristalleri.	5
Şekil 1.4 : Kuvartz kristal mikrobals (QCM) örneği	6
Şekil 1.5 : Kuvartz ayar çatalı (QTF) 3 boyutlu çizimi	6
Şekil 1.6 : Kuvartz kristallerin kesim yönleri ve eksenlerin tanımı.....	7
Şekil 1.7 : Plazma polimerizasyonu ile elde edilen filmler.....	8
Şekil 1.8 : Yasuda'nın önerdiği PPF'lerde aşamalı büyüme mekanizmasının şematik gösterimi.....	9
Şekil 1.9 : Gerilme ve bükülme titreşim modları.....	10
Şekil 1.10 : ATR çalışma prensibi	11
Şekil 1.11 : AFM ucu (iğnesi/manivelası)	12
Şekil 1.12 : Temas açısı ölçüm örnekleri	13
Şekil 1.13 : Gluteraldehit ball-stick şeklinde gösterimi.....	14
Şekil 1.14 : Gluteraldehit-amin grubu çapraz bağlanma mekanizması.....	15
Şekil 1.15 : a) Serum albumin molekülünün model görüntüsü b) serum albumin molekülünün boşluk-doldurma methodu ile çizilmiş önden görüntüsü c) Boşluk doldurma methodu ile elde edilmiş serum albumin molekülünün sol taraftan görünümü	16
Şekil 2.1 : a) Pentilamine b) Heptilamine	19
Şekil 2.2 : Diaminsikloheksan	19
Şekil 2.3 : a) QTF'lerin kapaklı ve kapaksız görünümü b) Strafor üzerine yerleştirilmiş QTFler	20
Şekil 2.4 : Plazma odacığına yerleştirilmiş QTF ve cam örnekler.....	20
Şekil 2.5 : a) RF/LP plazma cihazının şematik diyagramı b) LF/LP plazma cihazının şematik diyagramı	21
Şekil 3.1 : LF/LP ile hazırlanan AMY cam örneklerinin a) 1.gün ve b) 30. Gün temas açısı ölçümlerinin 3 boyutlu grafikleri ile sunumu.....	29
Şekil 3.2 : LF/LP ile hazırlanan HEP cam örneklerinin a) 1.gün ve b) 30. Gün temas açısı ölçümlerinin 3 boyutlu grafikleri ile sunumu	29
Şekil 3.3 : LF/LP ile hazırlanan DACH cam örneklerinin a) 1.gün ve b) 30. Gün temas açısı ölçümlerinin 3 boyutlu grafikleri ile sunumu.....	30
Şekil 3.4 : RF/LP ile hazırlanmış a) AMY ince film örneklerinin 1.günü b) AMY ince film örneklerinin 30.günü c) DACH ince film örneklerinin 1.günü d) DACH ince film örneklerinin 30.günü e) HEP ince film örneklerinin 1.günü f) HEP ince film örneklerinin 30.günü.....	32
Şekil 3.5 : QTF örneklerinin direnç ölçümlerini gösteren 3 boyutlu grafikler a) RF/LP AMY örnekleri b) LF/LP AMY örnekleri c) RF/LP HEP örnekleri d) LF/LP HEP örnekleri e) RF/LP DACH örnekleri f) LF/LP DACH örnekleri	48

Şekil 3.6 : (a) DACH örneklerinin karbon içerikli ters evrişim grafiği (b) AMY örneklerinin karbon içerikli ters evrişim grafiği (c)DACH örneklerinin köprü azot elementinin grafiği (d) AMY örneklerinin köprü azot elementinin grafiği	52
Şekil 3.7 : En stabil RF/LP örneklerinin SEM görüntüleri (a)HEP 75 W 1 dk (b)AMY 75 W 5 dk (c) DACH 90 W 1 dk (d)referans cam örnek yüzeyi	53
Şekil 3.8 : Örneklerin FTIR-ATR ile alınmış spektrumları (a)DACH örnekleri (b)AMY örnekleri (c) HEP örnekleri	55



ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : LF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	34
Çizelge 3.2 : RF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	35
Çizelge 3.3 : LF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY)cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.....	36
Çizelge 3.4 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY)cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	37
Çizelge 3.5 : LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.....	38
Çizelge 3.6 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	39
Çizelge 3.7 : RF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	40
Çizelge 3.8 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.....	41
Çizelge 3.9 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	42
Çizelge 3.10 : LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi	43
Çizelge 3.11 : RF/LP Heptilamin (HEP) QTF örneklerinin direnç ölçümleri	44
Çizelge 3.12 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) QTF örneklerinin direnç ölçümleri	45
Çizelge 3.13 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.....	45
Çizelge 3.14 : LF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.....	46
Çizelge 3.15 : LF/LP Heptilamin (HEP) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.	46
Çizelge 3.16 : LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.....	47
Çizelge 3.17 : RF/LP ve LF/LP örnekleri arasından seçilen en kararlı örneklerin direnç ölçümleri tekrarları	49
Çizelge 3.18 : RF/LP ve LF/LP örnekleri arasından seçilen en kararlı örneklerin temas açısı ölçümleri tekrarları	50
Çizelge 3.19 : RF/LP ve LF/LP örnekleri arasından seçilen en kararlı örneklerin frekans değişim değerleri	51
Çizelge 3.20 : GA Aktivasyonu sonrası örneklerin sahip olduğu ortalama frekans kayma değerleri	54
Çizelge 3.21 : PPF-GA-BSA etkileşimleri frekans kayma değerleri.....	56

KISALTMALAR

AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
AMI	: Akut Miyokard Infarktüsü
BSA	: Sığır Serum Albumin
CA	: Temas Açısı
c-TnI	: Troponin-I
c-TnT	: Troponin-T
EKG	: Elektrokardiyogram
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	: Gluteraldehit
ml	: mililitre
ng	: Nanogram
PBS	: Fosfat Tampon Tuzu
PlzP	: Plazma Polimerizasyonu
PPF	: Plazma Polimerizasyonu ile Elde Edilmiş İnce Film
QCM	: Kuvartz Kristal Mikrobalans
QTF	: Kuvartz Ayar Çatalı
XPS	: X-ışını Fotoelektron Spektroskopisi

SEMBOL LİSTESİ

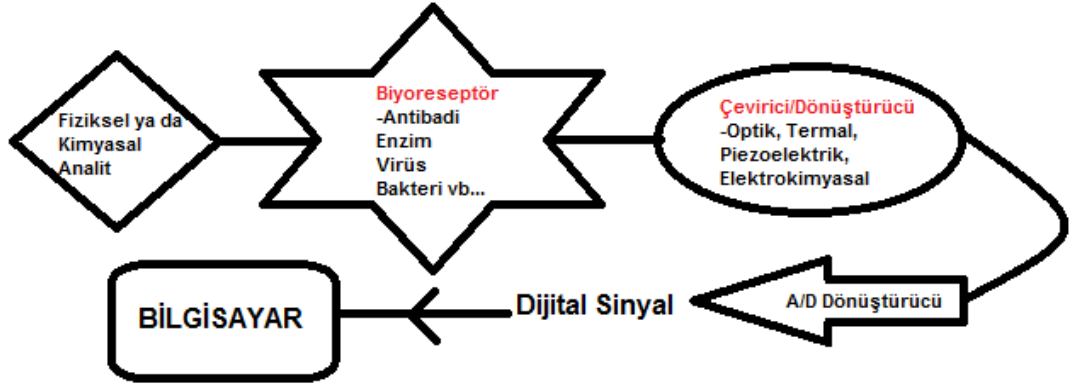
Bu çalışmada kullanılmış olan simgeler açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler	Açıklama
\bar{n}	Dalga Numarası
λ	Dalga Boyu
ν	Frekans
c	Işık Hızı
μ	Mikro
w_0	Ayar çatalı kalınlığı
f_0	Etki edilmemiş ayar çatalı frekansı
m	Ayar çatalı demetinin gerçek kütlesi
Δm	Yüklenmiş gerçek kütle
Ω	Ohm (Direnç birimi)

1. GİRİŞ VE LİTERATÜR ÖZETİ

Sensörler; sıcaklık, nem, kütle, basınç vb. değişkenlerin algılanması için kullanılan, ayrıca bu değişkenlerin algılanabileceği evrensel ve kolay elde edilebilecek bir sinyale dönüştürülmesini sağlayan cihazlardır. Bu dönüşümü sağlayan bileşene çevirici/dönüştürücü denir. En çok bilinen çeviriciler; ısı ölçerler ve termistörlerdir^[1].

Biyosensörler, fiziksel ya da kimyasal değişkenlerin algılanmasını sağlayacak biyoreseptör adı verilen ve hedef analite özgü ve çeviricilerin sinyal oluşturmalarına yardımcı olan bileşene sahip sensörlerdir^[1]. Tipik bir biyosensör Şekil 1.1 deki bileşenlerden oluşur.



Şekil 1.1. Tipik biyosensör örneği.

Piezoelektrik malzemeler, mekanik bir stress uygulandığında bunu elektrik akımına çevirirler ya da tam tersi özellik sergileyebilirler. Kuvartz kristaller piezoelektrik özellik taşıyan bir malzeme türü olup, kuvartz ayar çatalı yapısında da yer alır. Bu tez çalışmasının amacı literatürde eksikliği görülen bir biyosensör çeviricisi olarak kuvartz ayar çatalının kullanılmasını sağlamak ve bununla beraber kalp krizi sonrasında salgılanan bir protein olan Troponin-T'nin algılanmasını sağlayacak QTF tabanlı bir biyosensör (immünosensör) geliştirilmesidir.

1.1 Miyokard İnfarktüsü (MI)

Günümüz dünyasında yüksek ölüm oranlarına sahip hastalıklardan birisi “Miyokard İnfarktüsü (MI)” ya da çok bilinen adıyla “Kalp Krizi”dir. Göğüs ağrısı ile acillere başvuran hastaların %30’a yakınına kalp krizi teşhisi konmaktadır^[2].

Kalp krizi basit olarak anlatılmak istenirse, kalbi besleyen ana atar damarlardaki oksijen ve besinin kesilmesi/azalması sebebiyle kalp kaslarının zarar görmesi ya da ölmesidir denilebilir^[3].

Kalp krizinin teşhisi 6-12 saat arası sürdüğü gibi fiziksel bakının yanında bazı tanısal testler ve ölçümler almak gerekmektedir. Bunlardan bazıları elektrokardiyogram (EKG), akciğer grafisi, bazı hastalarda kan gazı ölçümü ve her hastada bakılan kardiyak enzimlerdir^[4,5]. Tanı koyarken yalnızca EKG ya da akciğer grafisi yeterli bilgiyi sağlayamayacağı gibi, kalp krizinde tanı için kan testlerinde; kreatin kinaz (CK-MB), myoglobin ve kardiyak troponin (c-Tn) proteinlerine bakılır (Şekil 1.2).

1.1.1 Miyoglobin

Myoglobin; kas hücrelerine bulunan, kandaki oksijen ve demirin bağlandığı bir proteindir. Normalde kanda az miktarda bulunmaktadır. Kas hücreleri hasar gördüğünde ya da kalp krizi gibi kaslara oksijen beslenmesinin kesildiği durumlarda kana yüksek miktarlarda salınmaktadır. Kalp krizinin bir belirteci olan miyoglobin, troponinler kadar hassas ölçüm değerleri vermemektedir^[36].

1.1.2 Kreatin Kinaz

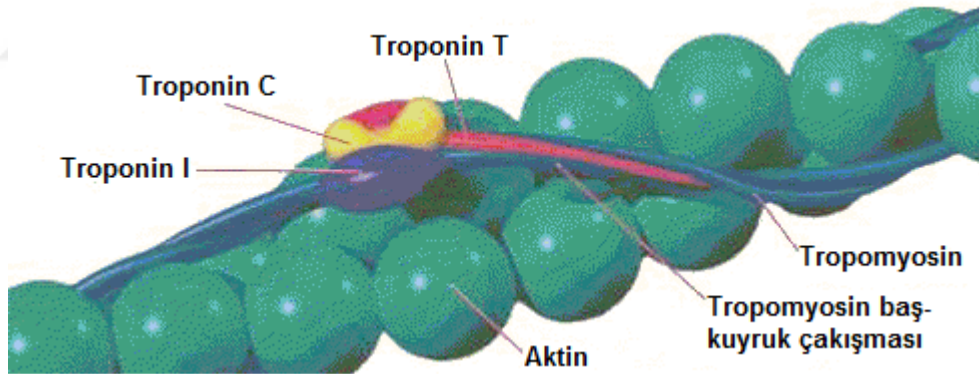
Kreatin kinaz (CK); beyin, iskelet ve kalp kaslarımızda bulunan ve hücrelerin normal işlevlerini yerine getirmelerini sağlayan enzimlerdir. CK-MB genellikle kalp kaslarında bulunur ve kalp krizi sonrasında kan içerisinde yaklaşık 12 saat içinde tavan yapar. Kalbe özgü troponin proteinleri olan troponin-T (c-TnT) ve Troponin-I (c-TnI) kalp krizi sonrasında 6 saat içinde pik konsantrasyona ulaşırlar^[5].

1.1.3. Kardiyak Troponin-I

Troponinler kanda çok çok düşük konsantrasyonlarda bulunmak ile beraber kasların kasılmasını regüle eden proteinlerdir. Kalp kaslarında oluşan hasar sonucunda kana kardiyak troponin ailesinden olan troponin-T (c-TnT) ve troponin-I (c-TnI) salınır (Şekil 1.2). Günümüzde tanılarda c-TnI kalp krizi tanısında baz alınmaktadır. Fakat c-TnI konsantrasyonunun yükselmesi kriz sonrasında yaklaşık 4-6 saati bulmaktadır. Oysa ki c-TnT konsantrasyonu kriz sonrasındaki 1 saat içerisinde kandaki miktarının 8-10 katına yükselmektedir ve c-TnI proteininin yerini alma potansiyeline sahiptir^[6].

1.1.4. Kardiyak Troponin-T

Kardiyak troponin T (c-TnT), ölçümlerinin hassaslığı ve gerekliliği üzerine pek çok çalışma yapılmıştır^[2,7-10]. Avrupa’da hastanelerde ve acil servislerde c-TnI ölçümleri yerlerini c-TnT ölçümlerine bırakmışken, Amerika Birleşik Devletleri’nde de c-TnT yavaş yavaş kullanılmaya başlanmıştır^[2].



Şekil 1.2. Kalp kası ilüstrasyonu ^[11].

1.2 Biyosensörler

Bir biyolojik tanıma mekanizmasına sahip olarak, kimyasal madde ve moleküllerin nicel ve/veya nitel tayininde/izlenmesinde kullanılan analitik cihaz “Biyosensör” olarak tanımlanabilir (IUPAC). İlk biyosensör Leland C. Clark Jr. tarafından 1956 yılında oksijen tespiti için kullanılmıştır ve “Clark elektrodu” olarak adlandırılan bu sensör, 1962 yılında yine Clark tarafından amperometrik enzim elektrodu glikoz

tespiti için geliştirmiştir^[12]. Günümüzde termal, optik, amperometrik, piezoelektrik çevirici kullanılan biyosensörler kullanılmaktadır.

1.2.1. Termal Biyosensörler

Termal biyosensörler; kalorimetrik ya da entalpimetrik enzim sensörleri (biyosensörler) olarakta adlandırılırlar. Bu sensörlerin çalışma prensiplerinde enzimatik tepkimeler sırasında ya da sonrasında oluşan sıcaklık değişimleri, entalpi değişimleri yer alır. Termal biyosensörlere glikoz oksidaz enzimi ile glikoz katalizi deneyi örnek verilebilir. Bu deney sırasında açığa çıkan ısı miktarı yaklaşık olarak 80 kJ/mol kadardır. Bu ısının yayılma hızı, biyosensör tarafından ölçülebilecek kadar yüksek termal kütleyle sahip çevirici ile ölçülür^[37].

1.2.2. Optik Biyosensörler

Optik biyosensörlerin ışık emilim esaslı, yansıtma esaslı, ışımaya esaslı vb. çeşitleri vardır. Bu grup biyosensörlerde hedef analit doğrudan ya da dolaylı yolla ışığın kırınımı, yansıtması, emilimi esas alınarak tespit edilebilir. Optik biyosensörlere örnek olarak; Yüzey plazmon rezonansı (SPR), fiber optik biyosensörler, floresant ışınımlı kılcal dolmuş cihazları (FCFD) örnek verilebilir^[38].

1.2.3. Amperometrik Biyosensörler

Amperometrik biyosensörlerde, dışarıdan voltaj uygulanan iki elektrodun arasındaki denge bozularak sistemin tekrar dengeyi bulması sağlanır ve bu sırada elektrodun üzerinden geçen akım ölçülür. Amperometrik sistemler indirgenme ve yükseltgenme tepkimelerine dayalı ölçümlerdir. Örnek olarak dünya üzerinde ilk biyosensör olarakta bilinen Clark elektrodu verilebilir^[1,37,38].

1.2.4. Kütle Hassas (Piezoelektrik) Biyosensörler

Optik ve elektrokimyasal çeviriciler en popüler biyosensör bileşenleri olmakla beraber, son zamanlarda piezoelektrik çeviriciler de dikkat çekmeye başlamışlardır. Piezoelektrik çeviriciler kütle hassas biyosensörler için uygun platformlar oluşturmaktadırlar^[1].

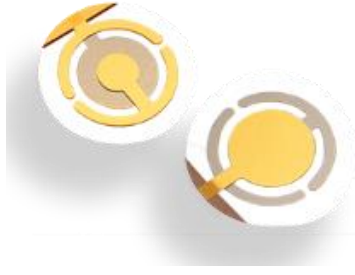
1900'lü yılların sonunda Curie kardeşler kuvartz üzerinde çalışırken, uygulanan basma çekme işlemi sonucunda malzemenin voltaj oluşturduğunu keşfetmişlerdir. Tam tersininde yani elektrik akımı uygulanan bir piezoelektrik malzemenin uzayıp kısaldığı görülmüştür^[1].

Kuvartz kristaller (Şekil 1.3.) geçici bir süre için elektrik enerjisini depolayıp daha sonra bu enerjiyi salabilir. Bu da bir resistör-indüktör-kapasitör(RLC) devresi gibi belirli rezonans frekansında harmonik osilasyon yapmasını sağlar. Bu tarz belirli frekansarda sinyal üreten kuvartz kristallere kristal osilatörler denir^[1].



Şekil 1.3. Kuvartz kristalleri^[13].

Kuvartz kristal mikrobalsans (QCM) (Şekil 1.4.) günümüzde en çok kullanılan kütle hassas biyosensör çeviricilerinden biri olmasının yanı sıra, bir kristal osilatördür. Metal elektrod ile birleştirilmiş bir kuvartz kristalin bir yüzüne kütle bindirildiğinde rezonans frekansının düşüşü ile ilgili çalışma 1959 yılında Günter Sauerbrey tarafından yapılmıştır^[1]. Bu da altın elektrodu bulunan QCM'i kütle hassas biyosensörler için bulunmaz bir fırsat konumuna sokmuştur. QCM AT kesimli (Şekil 1.6.) bir kuvartz kristal osilatöre sahiptir. Bunun yanı sıra sahip olduğu değerli madenden meydana gelen metal elektrodu yüzünden fiyatı endüstriyel herhangi bir sensör için dezavantaj oluşturmaktadır.

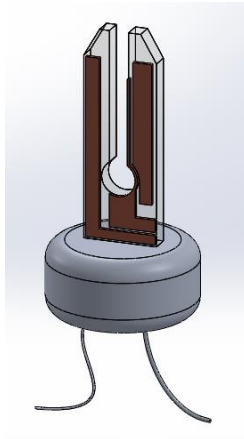


Şekil 1.4. QCM örneği^[14].

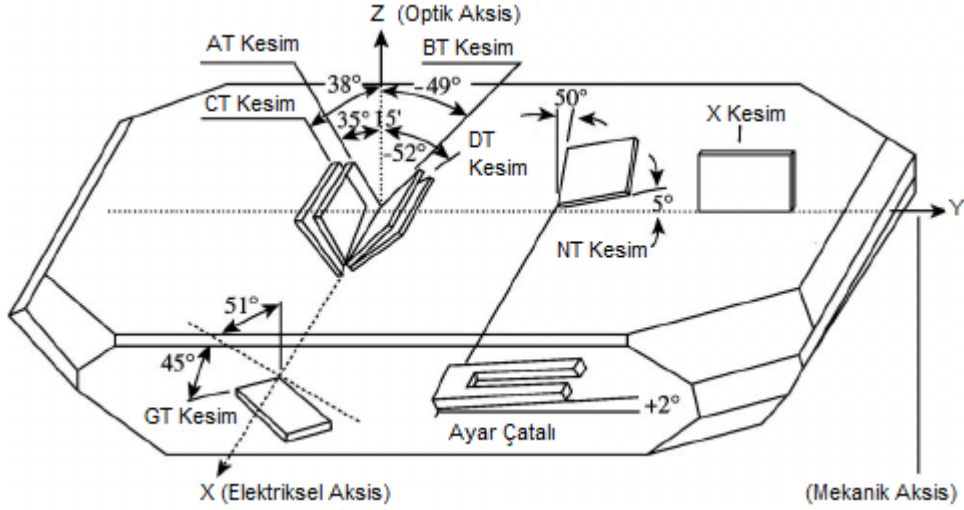
QCM'den daha avantajlı özelliklere sahip kuvarz ayar çatalı QTF son zamanlarda yeni kütle hassas biyosensör bileşeni olarak dikkat çekmeye başlamıştır. QTFler günümüzde kol saatlerinde sıkça kullanılan malzemelerdir. Fiyatları QCM'lere göre yaklaşık 100 kat kadar daha ucuzdur. Öteki özelliklerinin yanı sıra QTF'ler QCM'lere göre daha avantajlı çeviriciler olmaya adaydır.

1.3 Kuvartz Ayar Çatalı (QTF)

Kuvartz ayar çatalı (QTF) (Şekil 1.5.) bakır elektrodla ve kuvarz kristallere sahip bir çeviricidir. QTF ayar kesimi XY ekseninde, Z eksenine 2 derecededir (Şekil 1.6). X eksenini “elektiriksel eksen” olarak kabul edilir ve mekanik stress uygulandığında elektiriksel polarizasyon bu yönde oluşur. Benzer şekilde Y eksenini “mekanik eksen”dir ve elektrik akımı uygulandığında kristal “kayma modu”nda titreşir^[15].



Şekil 1.5. QTF 3 Boyutlu çizimi.



Şekil 1.6. Kuvartz kristallerinin kesim yönleri ve eksenlerin tanımları ^[16].

QTF, QCM'lere göre daha yüksek frekans stabilitesine, tekrarlanabilirliğe, düşük cevap verme süresine ve fiyata sahiptir. Bunun yanı sıra kalite faktörü (malzeme içinde depolanan enerji ile salınan enerji arasındaki oran) vakumda 100.000'leri bulurken, atmosferik koşullarda 10.000'lerdedir^[17].

Zhang ve O'Shea (2003)^[17] yaptıkları çalışmada katı haldeki bir ince filmin çatal üzerine kütle bindirmesini hesaplayacak eşitliği şu şekilde açıklamışlardır:

$$\Delta\omega_0 \approx -\frac{\omega_0}{2m} \Delta m \quad \text{ya da} \quad \Delta f_0 \approx -\frac{f_0}{2m} \Delta m$$

Bu eşitlikte ω_0 ayar çatalının kalınlığını, f_0 etki edilmemiş çatal frekansını, m ve Δm de ayar çatalı demetinin gerçek kütlelerini ve yüklenmiş gerçek kütleyi ifade etmektedir. Tabii bu denklem sıcaklık, basınç gibi etmenlerin ihmal edilmesi durumunda geçerli olmaktadır.

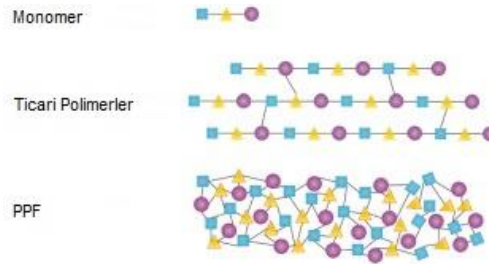
Bu denklem üzerinden hesaplamalar yapıldığıdaysa görülmüştür ki QCM'in sahip olduğu $\sim 1\text{ng/ml}$ hassaslığı QTF'de yaklaşık 13 katı civarına çıkararak yaklaşık 13 ng lık bir yük biniminde 1 Hz'lik bir frekans kaymasına yol açacağı hesaplanmıştır ^[17]. Bu da göstermektedir ki hem ucuz hem de daha hassas bir kütle hasas biyosensör QTF yardımıyla geliştirilebilir.

1.4 Plazma Polimerizasyonu

Yüzey teknolojileri, malzemenin makro boyuttaki özelliğini kaybetmeden yüzeyinde yapılan modifikasyonlar olarak tanımlanabilir. Bu teknolojilerle malzemelerin kimyasal (biyouyumluluk, su tutma vs.), mekanik (sürtünme vs.), elektriksel (iletkenlik) ve optik (geçirgenlik, yansıtma vs.) özelliklerini değiştirilmesi mümkündür.

Tüm yüzey teknolojileri içinde plazma tabanlı olanlar düşük basınç, düşük sıcaklık, geniş monomer yelpazesi ve ıslak kimyaya nazaran pahalı kimyasallar kullanmaması sebebiyle avantajlı bir konumdadır. Yarattığı bir atık olmadığından çevre dostu bir prosesdir. Bunun yanı sıra proses parametreleri değiştirilerek istenen kalınlık, kristalinite, kimyasal yapıda ve morfolojide filmler elde edilebilir.

Akkor boşalım ile katı halde organik film elde edilmesi ilk olarak Alman bilim adamları tarafından 1796 yılında raporlanmıştır^[18]. Plazma polimerizasyonu ile elde edilen filmler (PPF) normal polimerlerden farklı oluşuma ve ağa sahiptirler (Şekil 1.7). Sahip oldukları yüksek çapraz bağlar sayesinde ticari polimerlerden ayrılırlar.

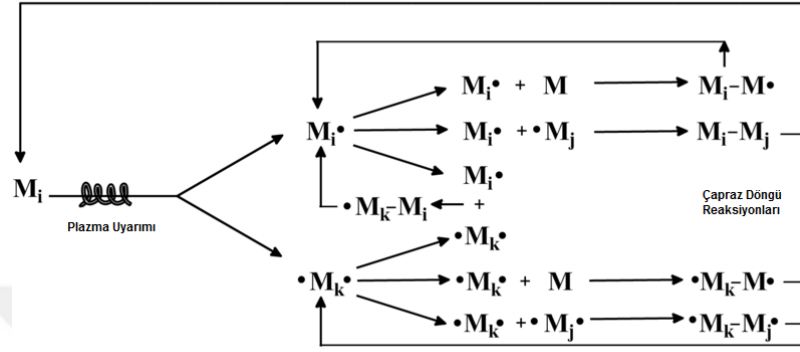


Şekil 1.7. Plazma polimerizasyonu ile elde edilen filmler^[19].

Plazma polimerizasyonu, yüzeye istenilen fonksiyonel grubun (amine, karboksil, halojenür vb.) bağlanabilmesini sağladığı için geniş bir kullanım yelpazesine sahiptir. Bu alanlara örnek olarak; biyomolekül immobilizasyonu, hücre büyütme, antibakteriyel ya da paslanmaz kaplamalar, süper-hidrofilik ya da -hidrofobik kaplamalar verilebilir.

Plazma polimerizasyonunun ilk adımı organik malzemenin plazma odacığı içine buharlaştırılmasıdır. Daha sonra plazma fazında enerjik elektronlar ve monomerler

arasında aktivasyon başlar. Genelde radikal oluşumu ile ilerlediği sanılan polimerizasyon için pek çok mekanizma ileri sürülmüştür. Bunların en ünlüsü Yasuda'nın 1985 yılında önerdiği aşamalı büyümedir (Şekil 1.8)^[19]. Fakat son yıllarda anlaşılmıştır ki radikallerin yanı sıra iyonlar büyük ölçüde PPF'in oluşmasına ön ayak olmaktadır^[18].



Şekil 1.8. Yasuda'nın önerdiği PPF'lerde aşamalı büyüme mekanizmasının şematik gösterimi^[19].

Biyomolekül immobilizasyonu için kullanılacak amine içerikli ince film kaplamalarıyla ilgili pek çok farklı çalışma literatürde mevcuttur^[18,20,21]. Bu çalışmalarda görülmüştür ki amine içerikli ince filmi karakterize etmek için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), X-ışını fotoelektron spektroskopisi (XPS), taramalı elektron mikroskopisi (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), temas açısı gibi yöntemler kullanılabilir.

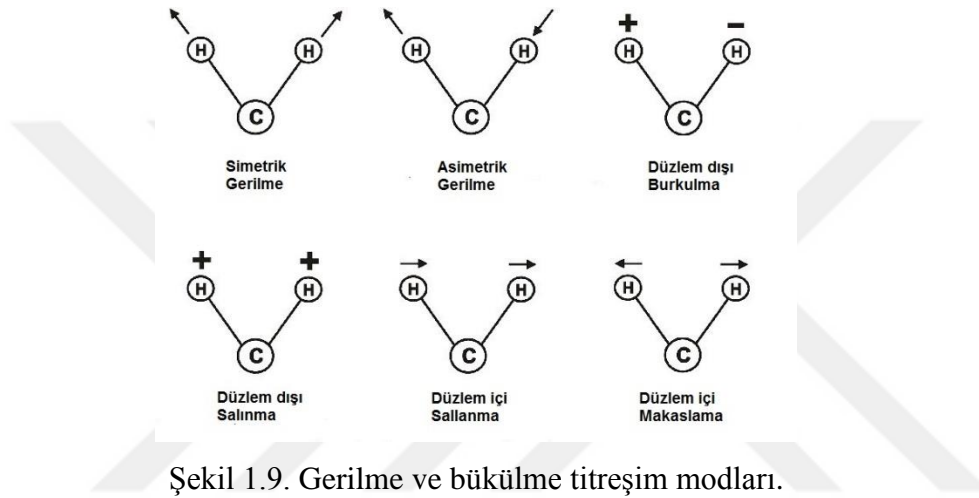
1.5. İnce Film Karakterizasyon Yöntemleri

1.5.1. Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR)

Elektromanyetik spectrumda kızılötesi alanı 14.000 ile 10 cm^{-1} dalga numarasına denk gelmektedir. Dalga numarası ($\bar{\nu}$) frekans ile ters orantılı olmakla beraber aşağıdaki bağıntı ile verilebilir;

$$\bar{\nu}(\text{cm}^{-1}) = \frac{1}{\lambda(\mu\text{m})} \times 10^{-4} \left(\frac{\mu\text{m}}{\text{cm}} \right) = \frac{\nu(\text{Hz})}{c(\frac{\text{cm}}{\text{s}})}$$

Kızılötesi ışınımı (IR) enerji bariyerleri arasındaki elektronik geçişi sağlayamayacak kadar düşük enerjilidir. Bu sebeple de IR ışınımın absorblanması molekül içindeki küçük enerji farkları olan titreşim ve dönel hareketlerle sınırlanmıştır. IR ışınım sönümlendiğinde, molekül titreşir ya da dönel hareket gösterir (Şekil 1.9) bu da dipol momentinde bir değişime yol açar. Dipol moment, yük şiddeti farkından ve yük merkezlerinin arasında oluşan uzaklıkla belirlenir. Bu yüzden ki homonükleer türlerde (Cl_2 , N_2 vb.) dipol moment değişimi gözlenememekte, dolayısı ile ve IR spektroskopisinde görüntülemek mümkün olmamaktadır^[23].

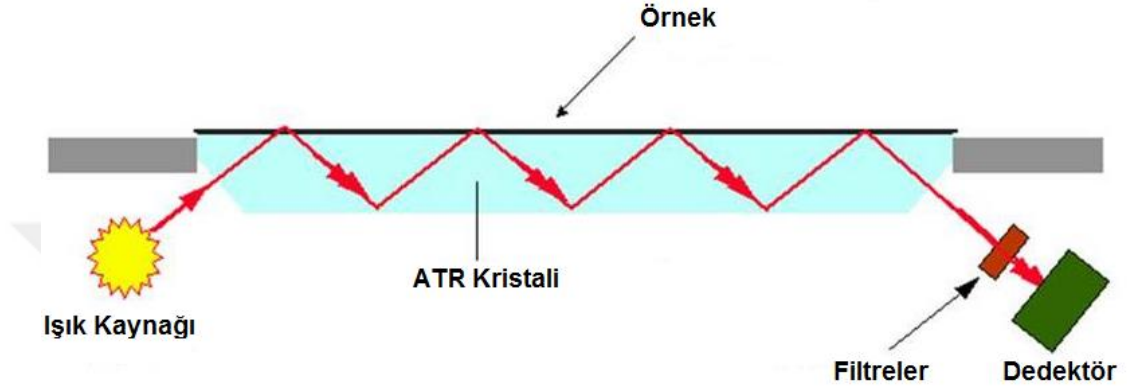


Şekil 1.9. Gerilme ve bükülme titreşim modları.

Dönel geçişlerde gerekli enerji miktarı çok küçüktür. Yaklaşık olarak $\bar{\nu} \leq 100 \text{ cm}^{-1}$ kadar ışımaya ihtiyaç duyulur. Titreşim modlarında 2 ve 3 atomlu moleküllerin absorsiyon enerjilerini hesaplamak kolayken yüksek atomlu moleküllerde birden fazla dipol merkezi oluşacağından hesaplamalar zordur^[23]. Gerilme ve bükülme titreşim modları Şekil 1.9'da verilmiştir. Bu modlar sayesinde, spektrum üzerinde bağlar arasındaki ilişkiyle yani moleküllerle alakalı bilgi elde edilebilir.

IR ışıması 3 farklı şekilde yapılabilir. Fakat en çok kullanılanı Fourier Dönüşümlü interferometre kullanılan spektrometrelerdir ya da kısaca FTIR. FTIR'lar hızlı, yüksek çözünürlüklü, yüksek hassasiyete sahip, daha doğru ve kesin sonuç veren karaktere sahiptir. Ayrıca sinyal/gürültü oranı yüksektir ki, bu da tekrarlanabilirliği ve doğru ölçümü almamıza yardımcı olur.

FTIR-ATR (Attenuated Total Reflectance)(Şekil 1.10) FTIR'a bağlanan küçük ek parçadan oluşur ve malzeme hazırlama sürecinin neredeyse ortadan kaldıran bir methoddur. Bir ışın yoğun ortamdan daha az yoğun ortama geçiş yaparsa yansıma oluşur. Bu yansıyan ışın mikron seviyesinde malzeme içine penetre olur. Bu penetre olan dalgaya “sönen dalga” denir^[23]. Daha az yoğun olan ortamda absorblanan bu sönen ışıma, zayıflamaya sebep olur ve zayıflayan dalğanın tam yansıması olarak adlandırılır (ATR).

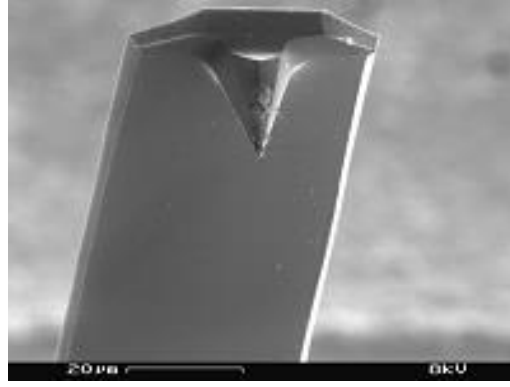


Şekil 1.10. ATR çalışma prensibi.

1.5.2. Atomik kuvvet mikroskobu (AFM)

Atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ya da bir diğer adıyla taramalı kuvvet mikroskobu istenilen yüzeyin yüksek çözünürlüklü 3 boyutlu görüntülenmesine yardımcı olur. İlk olarak 1980 yılında Binnig ve Rohrer tarafından geliştirilen AFM bilim adamlarına nobel kazandırırken, ilk olarak 1989 yılında ticari olarak satışa sunulmuştur^[25].

Sivri uç, iğne ya da manivela (Şekil 1.11) 3 farklı modda çalışır. Yüzeydeki atomlarla arasında oluşan itme ve çekme kuvvetleri incelenerek yüzeye dair bilgi elde edilebilir. Manivelanın yüzeye temas ederek kullanıldığı “temas modu”, yüzeye temas olmayan “temasız mod” ve yüzeye vurularak uygulanan “vurma mod”u manivelanın kullanıldığı 3 farklı moddur.



Şekil 1.11. AFM ucu (iğnesi/manivelası) ^[25].

1.5.3. Taramalı elektron mikroskobu (SEM)

Taramalı elektron mikroskobu ilk olarak 1965 yılında ticari olarak piyasaya sürülmüştür^[26]. SEM malzemenin; yüzey morfolojisi ,topografisi, şekil ve boyutları ayrıca kimyasal yapısı hakkında bilgi verir.

Elektron tabancasının içinde bulunan flamente uygulanan yüksek sıcaklık ile filament üzerinden kopan elektronlar bir elektron bulutu oluşturur. Bu elektron bulutu elektromanyetik özellik gösteren mercekler yardımlarıyla numune üzerine yönlendirilir. Bütün bu işlemler yüksek vakum altında yapılmaktadır. Numune üzerine yönlendirilen elektronlar ile numune elektronları arasında oluşan etkileşimden 3 farklı şekilde yararlanılır. İlki geri saçılan elektronlardır. İvmelenmiş elektronların atom çekirdeği ile yaptığı elastik çarpışma sonucunda geri saçılması ile yüzey hakkında bilgi verir. İkincil elektronlar, numuneye yönlendirilen elektronlar ve atomun enerjisi düşük seviyelerindeki elektronlarla elastik olmayan çarpışması sonucunda elde edilir. Bu elektronlardan yüzeyin topografisi hakkında bilgi edinilir. Son olarak, atom üzerinde uyarılan elektronlar X-ışını yayarlar. Bu yayılan X-ışınları ile de numunenin içeriği hakkında bilgi edinilmiş olur^[26].

1.5.4. X-Işını fotoelektron spektroskopisi (XPS)

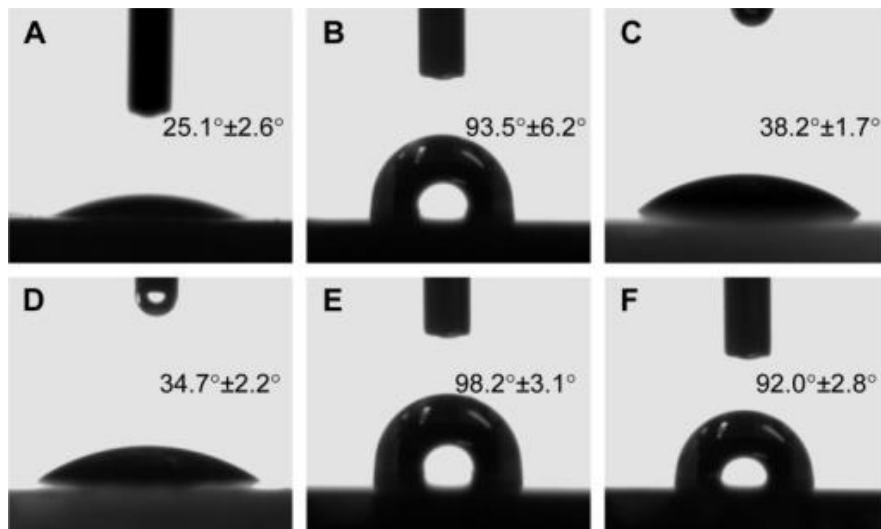
X-Işını fotoelektron spektroskopisi incelenen örneğin kimyasal yapısı hakkında bilgi toplamak için kullanılır. Yüzey ya da ara yüzey ile alakalı detaylı bilgi verebildiği ve geniş örnek yelpazesine uygulanabildiği için çok kullanılan bir tekniktir.

X-Işını ile bombardıman edilen yüzey, X-ışını fotonunun çekirdek elektronlardan birine çarparak enerjisini aktarması ile bunun sonucunda gelen fotonun enerjisine ve bağlanma enerjisine bağlı olarak salınması ve vakum ortamında toplanarak dedektöre yollanması şeklinde çalışır. Dedektöre gelen fotoelektronlar analiz edilerek elemental konsantrasyon belirlenir. Bu fotoelektronlar yaklaşık olarak 5nm'lik kalınlıktan toplanır^[27].

Yüzey analizi yarıiletkenler, kataliz, cam, kaplama, ultre-ince filmler ve benzeri pek çok alanda işe yarayabilir.

1.5.5. Temas açısı (CA)

Temas açısı ölçümleri (Şekil 1.12.) yüzeyin ıslatma karakteri ile ilgili bilgi vermektedir. Yüzeylerin hidrofilik ya da hidrofobik karakterlerini, yüzey gerilimini takip açısından pratik ve ucuz bir yöntemdir.



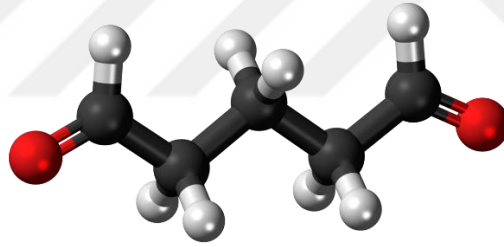
Şekil 1.12. Temas Açısı ölçüm örnekleri.

Ölçümler gonyometre-teleskop adı verilen, yüzeye damlatılacak sıvının hamilton iğneden çıkıp yüzey üzerine damlamasını, damladıktan sonra yüzey, sıvı ve ortam arasındaki 3'lü noktadan alınan tanjant açısını ölçmeye yarayan kamera sistemi ile gerçekleştirilir.

Ölçümlerde 10° den küçük açısı olan örnekler superhidrofilik, $10^\circ < x < 90^\circ$ arasında olanlar hidrofilik, $90^\circ < x < 150^\circ$ olanlar hidrofobik ve 150° den büyük açısı olanlar superhidrofobik olarak adlandırılırlar.

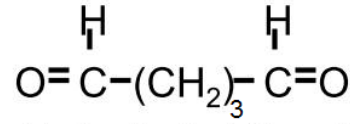
1.6. Gluteraldehit ve Amine Gruplarının Etkileşimi

Gluteraldehit (GA) (Şekil 1.13.) renksiz, su içinde çözünebilir ve aldehytlerin verdiği tüm reaksiyonları gösteren bir kimyasaldır. GA tek başına insan sağlığı için tehlike arz etmesine rağmen enzim immobilizasyonu için sıklıkla kullanılan bir malzemedir.

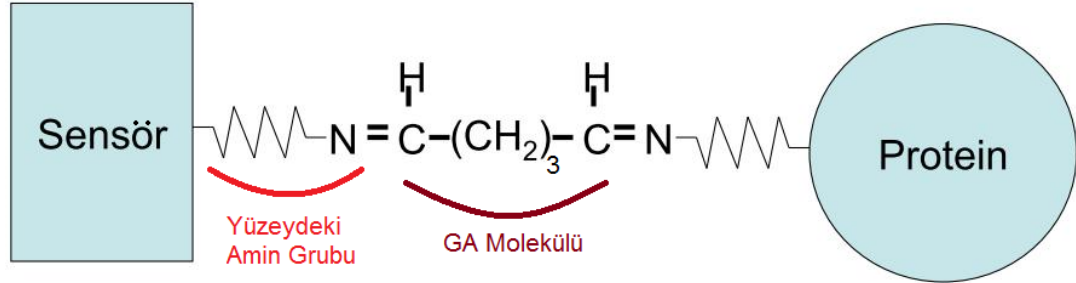


Şekil 1.13. Gluteraldehit ball-stick şeklinde gösterimi.

GA sahip olduğu özellikler sebebiyle protein çapraz bağlayıcı ajanı olarak kullanılır. GA aktivasyonu farklı yöntemler ile gerçekleştirilebilir^[31,32]. Amin ya da amino grupları kullanılarak yapılan GA aktivasyonu, GA-amin bağının kuvvetli ve stabil olması sebebiyle, amin grupları bulunan destekler üzerinde protein immobilize etmek için literatürde sıkça seçilmiştir^[31,32]. Kullanılan yöntem ve duruma göre (pH, konsantrasyon, sıcaklık gibi) her amin grubuna bir ya da 2 GA molekülü bağlanabildiği gibi tam tersi, yani her GA molekülüne bir ya da 2 amin grubu bağlamak mümkündür^[31]. Şekil 1.14 de reaksiyonlara verilebilecek bir GA-amin grubu çapraz bağlanması örnek verilmiştir.



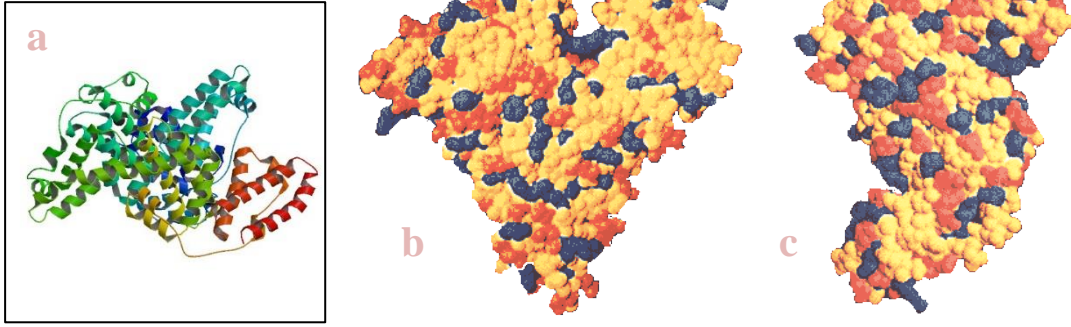
Çift Taraflı Bağlayıcı Olarak Gluteraldehit



Şekil 1.14. Gluteraldehit-amin grubu çapraz bağlanma mekanizması^[33].

1.7. Model Protein Olarak Sığır Serum Albumin (BSA)

Serum albumin dolaşım sisteminde en çok bulunan proteinlerden biri olmakla beraber sudaki çözünürlüğü çok yüksektir. Yapılan çalışmalarda da kanın pH'ından albuminin sorumlu olduğu görülmüştür^[34]. Memelilerde karaciğerde üretilen bu protein, öteki protein aktivitelerini etkilemediği için araştırmalarda sıklıkla kullanılmaktadır^[34]. Sığır serum albumin (BSA), insan vücudunda üretilen albumine çok benzemekle beraber sadece ağırlık olarak birbirlerinden ayrılır. Model protein olarak çalışmalarda sıklıkla kullanılır^[34]. Şekil 1.15. serum albumin molekülünün model görünümü ve boşluk doldurma modeli ile oluşturulmuş şeklini göstermektedir.



Şekil 1.15. **a)** Serum albumin molekülünün model görüntüsü **b)** Serum albumin molekülünün boşluk-doldurma methodu ile çizilmiş önden görüntüsü (sarı kısımlar nötr, mavi kısımlar bazik ve kırmızı kısımlar asidik bölgeleri ifade eder) **c)** Boşluk doldurma methodu ile elde edilmiş serum albumin molekülünün sol taraftan görünümü^[35].

2. DENEYSEL GEREÇLER VE YÖNTEM

Bu çalışmanın temel amacı, kütle hassas tabanlı bir çevirici olarak kuvartz ayar çatalının biyosensör uygulamalarında kullanılabilmesi için gerekli değişimlerin yapılması ve c-TnT'nin algılanmasını sağlayacak biyosensörün geliştirilmesidir. Bu amaç doğrultusunda aktif yüzey hazırlamaya yönelik amine bazlı monomerler seçilmiş ve plazma modifikasyonunda doğrudan yüzeylere plazma ortamında uygulanmıştır. Troponin-T seviyesinin takibine yönelik olarak geliştirilmesi düşünülen biyosensörde, Troponin-T'ye karşı biyolojik seçici molekül olan anti-TnT kullanılmıştır.

Çalışmanın basamakları aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- ✓ Kullanılacak alttaşların hazırlanması,
- ✓ İnce film kaplaması için gereken monomerlerin ve plazma parametrelerinin belirlenmesi,
- ✓ Kaplamalar için kullanılan plazma parametrelerinin iyileştirilmesi,
- ✓ İnce film karakterizasyonlarının yapılması,
- ✓ Yüzeyin kimyasal yöntemlerle aktifleştirilmesi, bu parametrelerin iyileştirilmesi, yüzey karakterizasyonu ve QTF'lerdeki frekans kaymalarının takibi,
- ✓ Model protein olarak seçilen sığır serum albumin ile yapılan deneyler ve QTF frekans kaymalarının takibi,

olarak 6 ana başlığa ayrılabilir.

Bu çalışmada, grubumuzda önceden de yüzey modifikasyonu için kullanılan plazma polimerizasyon yöntemi kullanılarak alttaş yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir. Yüzeyde bulunan amine grupları biyomolekül bağlama amacı ile kullanıldığından; iki düz zincirli (alkan) ve bir adet halkalı (alkan) amin grupları içiren monomerler seçilerek, farklı boşalım gücü ve farklı uygulama süresi gibi

plazma parametrelerinin etkisi incelenmiştir. Bu araştırmalar sonucunda elde edilen ince filmler karakterize edilerek, en kararlı ince filmler yüzey aktivasyonu için glutaraldehit çözeltilisine veya buharına maruz bırakılmışlardır. QTFler üzerinden yapılan karakterizasyonlar sonrasında elde edilen optimum koşullar kullanılarak model protein denemeleri yapılmıştır.

Çalışmanın bu kademeleri gelecek bölümlerde detaylı olarak incelenmiş, sonuçlar sunulmuş ve yorumlanmıştır.

2.1. Deney İçin Gerekli Kimyasallar

Alttaş çalışması için kuvarz ayar çatalları ve cam lamlar örnek olarak seçilmiştir. 32.768 kHz rezonans frekansına sahip QTF'ler Shoulder Crystal (Çin)' dan temin edilmiştir. Bunun yanı sıra ince film karakterizasyonu için kullanılan 3.sınıf cam lamlar InterLab (Türkiye)'dan satın alınmıştır.

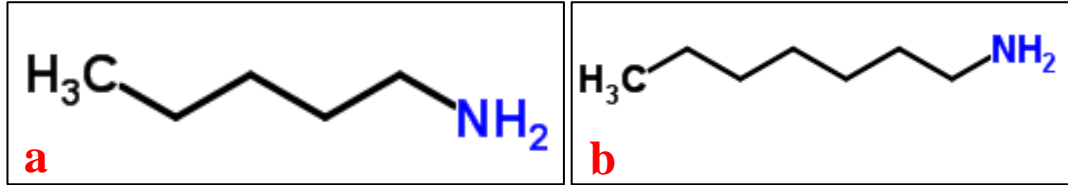
%99 saflıktaki Pentilamin ve %99 saflıktaki heptilamin Aldrich (ABD) ve %90 teknik saflıktaki diaminosikloheksan teknik, isomer karışımı ise Acros Organics (ABD)'den temin edilmiştir. Monomerler, polimer oluşumunu engellemek üzere derin dondurucuda saklanmıştır.

Frekans ve ortam ölçümleri için kullanılan fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH= 7.4) Sigma (A.B.D.)' dan alınmıştır ve ortam ölçümlerinde kullanılmak üzere +4°C de saklanmıştır. Kütlece %50 glutaraldehit Aldrich (ABD)' den temin edilmiştir. Model protein olarak seçilen sığır serum albumin (BSA, $M_a \approx 66000$ Da) Acros Organics' den (ABD) temin edilmiş, farklı konsantrasyonlarda PBS içinde hazırlanarak +4°C de muhafaza edilmiştir.

2.1.1 Seçilen monomerlerin özellikleri

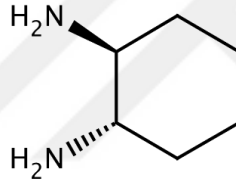
Deneyde kullanılan monomerler pentilamin, heptilamin ve diaminosikloheksan olarak belirlenmiştir. Deneylerde kullanılan bu 3 farklı monomerin farklı buhar basınçları, farklı kütleleri ve kimyasal özellikleri vardır. Pentilamin ve heptilamin (Şekil 2.1.) düz zincirli uçlarında amin grubu olan alkan grubu hidrokarbonlar

sınıfındadır. Ayrıca pentilamin toksikken, heptilamin toksik olmayan bir hidrokarbondur. Düz zincire eklenen fazladan iki karbon grubunun getirdiği film özelliklerini takip etmek ve buhar basıncının oluşturduğu farklılığı görmek amacıyla deney kapsamında bu iki monomer seçilmiştir.



Şekil 2.1. Pentilamine (a) ve heptilamine (b) monomerlerinin zincir gösterimi.

Bunların yanı sıra halkalı yapıya sahip diaminosikloheksan (şekil 2.2) monomeri iki adet amine grubuna sahip olmakla beraber, toksik olmayan bir monomerdır.

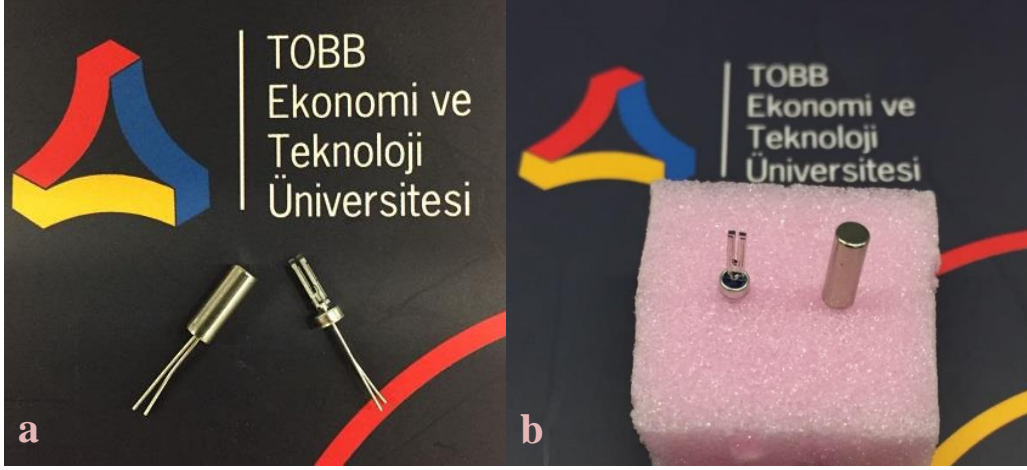


Şekil 2.2. Diaminosikloheksan monomerinin zincir gösterimi.

Bağ kırılma enerjileri göz önüne alındığında karbon azot arasındaki kırılma enerjisi en düşük değere sahip olduğundan plazma sırasında ilk kırılması beklenen bağ C-N bağı (305 kJ/mol) olarak belirlenmiştir. C-C bağları yüksek kırılma enerjisine (346 kJ/mol) sahip olmakla beraber halkalı yapıdaki C-C bağını kırmak çok daha fazla enerji gerektirmektedir [40,41,42]. Benzer şekilde bağ enerjilerine bağlı gerçekleştirilen deneylerde düz ve halkalı yapıları karşılaştırmak adına halkalı yapıdaki diaminosikloheksanın kullanılmasına karar verilmiştir.

2.2. Yüzeylerin Plazma Polimerizasyonu için Hazırlanması

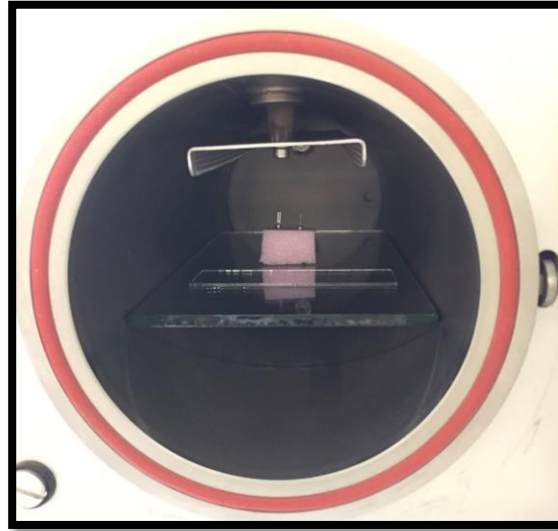
QTF' ler, vakumlanmış ortamda zarar görmeden saklayabilmek için, bir kapak yardımı ile korumaya alınır. Örnek plazma odacığına yerleştirilmeden önce bu kapak çıkarılır ve bir strafor üzerine sabitlenir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. (a) QTF'lerin kapaklı ve kapaksız görünümü (b) Strafor üzerine yerleştirilmiş QTF'ler.

Lamlar hazırlanırken üzerlerinde bulunabilecek herhangi bir kirlilikten kurtulmak için öncelikle deterjan içerisinde 15 dk boyunca sonikatörde yıkanmıştır. Saf sudan geçirilerek durulanan lamlar daha sonrasında 15 dk boyunca hacimce %70'lik etil alkol içinde sonikatörde bekletilmiştir. İşlem sonrası saf su ile tekrar yıkanan örnekler kurutma fırınının içerisinde 50°C'de kurumaya bırakılmıştır.

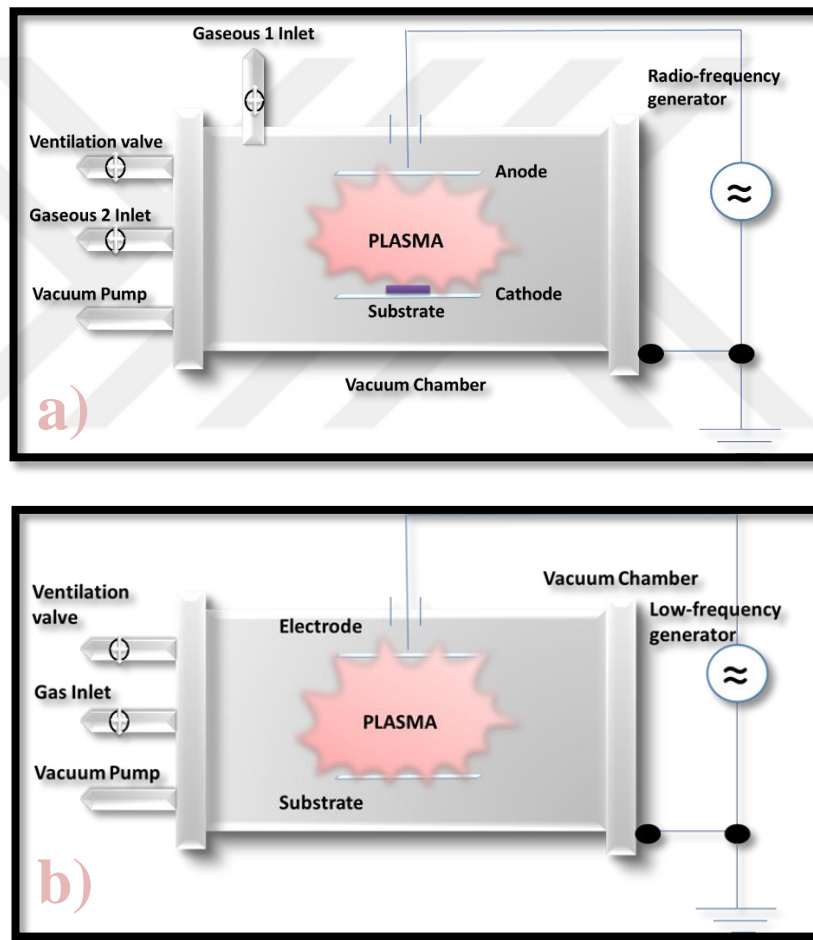
Ön hazırlıkları biten cam QTF'ler daha sonra şekildeki (Şekil 2.4) gibi plazma odacığına yerleştirilmiştir.



Şekil 2.4. Plazma odacığına yerleştirilmiş QTF ve cam örnekler.

2.3. Plazma Polimerizasyonu Yöntemi ile Yüzey Modifikasyonu

Plazma polimerizasyonu; hem 150 mm çapında/320 mm uzunluğunda paslanmaz çelikten yapılmış plazma odacığı bulunan radyo frekansı/düşük basınç (13.56 MHz) (RF/LP) (Pico, Diener Electronic GmbH, Almanya) plazma cihazıyla, hem de 100 mm çapında/600 mm uzunluğunda paslanmaz çelikten yapılmış plazma odacığı bulunan düşük frekans/düşük basınç (40 kHz) (LF/LP) (Femto, Diener Electronic GmbH, Almanya) plazma cihazlarıyla gerçekleştirilmiştir. Plazma cihazlarına ait şematik diyagramlar Şekil 2.5'te gösterilmiştir.



Şekil 2.5. (a)RF/LP, (b)LF/LP plazma cihazlarına ait şematik gösterimler.

Pentilamin, heptilamin ve diaminosikloheksan monomerleri ile plazma boşalım gücü 30, 60, 75 ve 90W olarak, uygulama süreleri ise 1, 3, 5 ile 10 dakika olarak belirlenmiştir.. Proseste uygulanan basamaklar;

- Ön hazırlığı yapılan QTF ve lam örnekler plazma odacığına yerleştirilmesi
- Plazma odacığının kapağı kapatılarak, odacığın vakumlanması (Trivac 2.5E, Leybold Vacuum GmbH, Almanya)
- 0.15 mbar basınca inen odacığa 15 dk boyunca seçilen monomer beslenmesi.
- Sonrasında basıncın tekrar 0.15mbar'a gelmesinin beklenmesi
- Ulaşılan düşük basınçta belirlenen plazma boşalım gücünde ve süresinde monomerlerin örnek yüzeyine polimerize edilmesi
- 15 dk boyunca vakuma maruz bırakarak örnek yüzeylerindeki radikallerin söndürülmesi
- Son aşamada 15 dakika boyunca argon gazına maruz bırakılarak örnek yüzeyinde kalan safsızlıkların ve yüzeyde asılı kalan radikallerin süpürülmesi şeklinde özetlenebilir.

Bu prosesler sonucunda, 96 adet örnek üretilmiştir . Bu örneklerle ait ince film karakterizasyonları ve sonuçları ile ilgili bilgiler “Bulgular” bölümlerde detaylı olarak verilmiştir.

2.4. Yüzey Modifikasyonu Yapılmış Örneklerin Fiziksel ve Kimyasal Karakterizasyonları

Yüzeyin kimyasal analizi Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi (UNAM)'nde yapılmıştır. X-ray fotoelektron spektroskopisi (XPS, Thermo K-Alpha, Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, ABD) cihazı ve Thermo K-Alpha monokromatik yüksek performans XPS spektrometre ile (Thermo Fisher Sci., Waltham, MA, ABD) 1×10^{-9} Torr 'luk ultrayüksek basınç altında işlem gerçekleştirilmiştir. 400µm' lik alan boyutu kullanılmış ve yüzeydeki hassaslık faktörü mühendis tarafından belirlenmiştir. OriginLab v.6 programı kullanılarak grafiklere ait dekonvolüsyonlar yapılmıştır.

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi/zayıflatılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) ölçümleri (Thermo Fisher Nicolet IS-50 FT-IR-ATR, Waltham, MA, ABD) 4000–1000 cm^{-1} dalga numaraları arasında alınmıştır. Bu ölçümlerde fonksiyonel

grupların spektra üzerinde belirli alanlarda pik vermesi beklenmiştir. Fakat filmlerin inceliği ve cihazın ölçüm hassasiyetinin çalışılan filmler için uygun olmaması sebebiyle anlamlı herhangi bir data elde edilememiştir. Cihazın gürültü seviyesine denk gelen hassasiyeti sebebiyle film ölçümleri alınamamıştır ve bu tezin ileriki bölümlerinde örneklerle açıklanmıştır.

Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) ölçümleri enerji ayırmalı x-ışını spektroskopisine (EDX) FEI Quanta 200 FEG SEM (Thermo Fisher, Waltham, MA ABD) ile yapılmıştır. 2-2.5 nokta büyüklüğünde 1000, 5000 ve 50000 yaklaştırmalarda SEM görüntüleri alınmıştır.

Yüzeyin ıslanabilirlik özelliklerini öğrenebilmek ve film stabilitesini analiz etmek için temas açısı ölçümleri yüzeyi modifiye edilmemiş ve edilmiş cam örnekler üzerinden 30 gün süresince 1., 7., 15. ve 30. günlerde hava ortamında takip edilmiştir. LF/LP cihazında kaplanan, en iyi durumların elde edildiği DACH monomerinin tüm plazma parametreleri ile RF/LP cihazıyla kaplanan 3 monomerin tüm plazma durumları ayrıca su ortamında yukarıda bahsedilen stabilite testine tabi tutulmuştur. Ölçümler bir modül yardımıyla (KSV Instruments Ltd., Finlandiya) yüzey üzerine damlatılan ~12µL hacmindeki damlanın 3'lü açısı noktasından tanjant eğrisi bakılarak alınmıştır.

Temas açısı testlerinin yanı sıra ayrıca QTF örnekler ile stabilite testleri gerçekleştirilmiştir. Bu testler modifiye edilmiş ve edilmemiş QTF örnekler üzerinden Sensor Controller (NanoAndMore GmbH, Almanya) cihazı yardımıyla alınmıştır. Hazırlanan QTF örnekler 200 ml su içerisinde çözülmüş PBS tabletleriyle hazırlanan (pH= 7.4) ortama batırılıp bu ortama 1 dakika boyunca maruz bırakılmış, sonrasında saf su ile temizlenmiş ve kurutularak ölçümler alınmıştır. Bu ölçümler sonunda elde edilen frekans kaymaları saptanarak ileriki bölümlerde detaylı olarak sunulmuştur.

Tüm bu karakterizasyonların yanı sıra yüzeyde oluşan ince filmlerin yarattığı iletkenlik değişimi, yüzeyi plazma polimerizasyonu ile modifiye edilmiş QTF'ler multimetreye (UNI-T UT139C 6000 Counts True RMS Multimeter) takılmış ve

%5'lik NaCl çözeltisine batırılarak ölçülmüştür. Elde edilen veriler sonuçlar kısmında verilmiştir.

2.5. Gluteraldehit ile Yüzey Aktivasyonu

Hacimce stok olarak %2.5 (v/v) oranında hazırlanan GA solüsyonu +4 °C'de muhafaza edilmiştir. Plazma polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlanan ve en kararlı bulunan QTF örnekler; içinde 40 °C ye ısıtılmış 50 ml'lik GA çözeltisi bulunduran 250 ml hacmindeki cam şişeler (BORO 3.3, ISOLAB, Türkiye) üzerinde strafor yardımıyla askıda bırakılarak 15, 30, 60 ve 120 dakika boyunca bu çözeltinin buharına maruz bırakılmıştır.

Benzer şekilde 4 bölmeli petri kaplarının (InterLab, Türkiye) üzerine açılan küçük deliklere geçirilen QTF örnekler kapaklara sabitlenerek her haznede bulunan 7.5 ml hacmindeki GA çözeltisine daldırılmış ve bu durumda oda sıcaklığında (25 °C) 15, 30, 60 ve 120 dakika bekletilerek QTF yüzeylerinde bulunan amin gruplarıyla etkileşime geçmesi sağlanmıştır.

Yapılan deneyler sonrasında oda sıcaklığında kurutulan ve yüzeydeki GA etkileşimi ile QTF örneklerde oluşan frekans kaymaları Sensor Controller cihazı yardımıyla kontrol edilmiş ve aktivasyonun ne kadar başarılı olduğuna ve ince filmin örnek üzerinden kalkıp kalkmadığına dair elde edilen veriler sonuçlar kısmında detaylıca açıklanmıştır.

2.6. Model Protein Testleri

Model protein testleri ve seçilen proteinin neden sığır serum albumin (BSA) olduğuna dair bilgiler tezin giriş kısmında detaylı olarak verilmiştir. Troponin-T'nin vücutta bulunan miktarı yaklaşık olarak 0.07 ng/ml olduğu ve kalp krizi sonrasında yaklaşık olarak ≥ 0.14 ng/ml seviyesine yükseldiğinden dolayı^[6], model protein BSA çözeltileri 0.01 ng/ml, 0.05 ng/ml, 0.07 ng/ml, 0.14 ng/ml, 0.20 ng/ml, 0.50 ng/ml konsantrasyonlarında hazırlanmış ve +4°C'de muhafaza edilmiştir.

GA aktivasyonu sonrasında eniyileştirilmiş frekans kaymasına sahip olan örnekler seçilerek, 10ml hacimli BSA çözeltilerinde 800rpm'de karıştırılmıştır. Ardından QTF örnekler oda sıcaklığında (25 °C) kurutularak Sensor Controller cihazı ile frekans kaymaları kontrol edilmiş ve ölçülen frekans kaymaları sonuçlar kısmında raporlanmıştır.





3. BULGULAR VE TARTIŞMALAR

QTF'in dönüştürücü olarak kullanıldığı biyosensör(immunosensör) çalışmaları günümüzde dikkat çekmeye başlamıştır. Literatürde, QTF'in dönüştürücü olarak kullanılabilmesine dair yapılan tartışmalar^[17,30] önem kazanmış ve dikkatleri QTF üzerine çekmeye başlamıştır. Günümüzde QTF kullanılarak gerçekleştirilen immunosensör çalışmalarının azlığı nedeniyle oluşan bu eksikliği gidermek ve gelecek çalışmalara alt yapı oluşturulması kapsamında bu tez çalışması yürütülmüştür.

3.1. Plazma Polimerizasyonu ile Hazırlanmış Örneklerin Analizleri

Bu bölümde, hazırlanan cam ve QTF örneklere ait gerçekleştirilen analizlerin sonuçları sunulurken, bu sonuçlara ait yorumlar verilmiştir.

3.1.1. Cam Örnekler Üzerinden Toplanan Temas Açısı Ölçümleri

Plazma polimerizasyon yöntemi ile hazırlanan toplamda 96 farklı ince film ya da yüzeyi modifiye edilmiş cam örnek, 30 gün boyunca 1., 7., 15. ve 30. günlerde temas açısı analizine tabi tutulmuştur. Temas açısı (Bölüm 1.5.5) bölümünde de bahsedildiği gibi 3'lü temas noktasına olan tanjant eğri açısı 10° den küçük olan yüzeyler süper-hidrofiliktir. Bunun yanı sıra $10^\circ < x < 90^\circ$ arasında olanlar hidrofilik özellik göstermektedir.

Bu bilgiler göz önüne alındığında modifiye edilmemiş, temiz bir cam yüzeyi ölçümü yaklaşık olarak 33° dir. Bu açı referans açısı olarak kabul edilmiş ve yorumlar bu açıya göre yapılmıştır.

30, 60, 75 ve 90 W'lık boşalım gücü ile çalışan RF/LP ve düşük frekans LF/LP plazmalarına 1, 3, 5 ve 10 dk boyunca maruz kalan; pentilamin (AMY), heptilamin

(HEP) ve diaminosikloheksan (DACH) monomerleriyle gerçekleştirilen deney alttaşları temas açıları incelenmiş ve veriler aşağıdaki şekilde verilmiştir.

LF/LP ile hazırlanan örneklerde plazma enerjisi RF/LP ye göre daha düşüktür. Bu yargı basitçe;

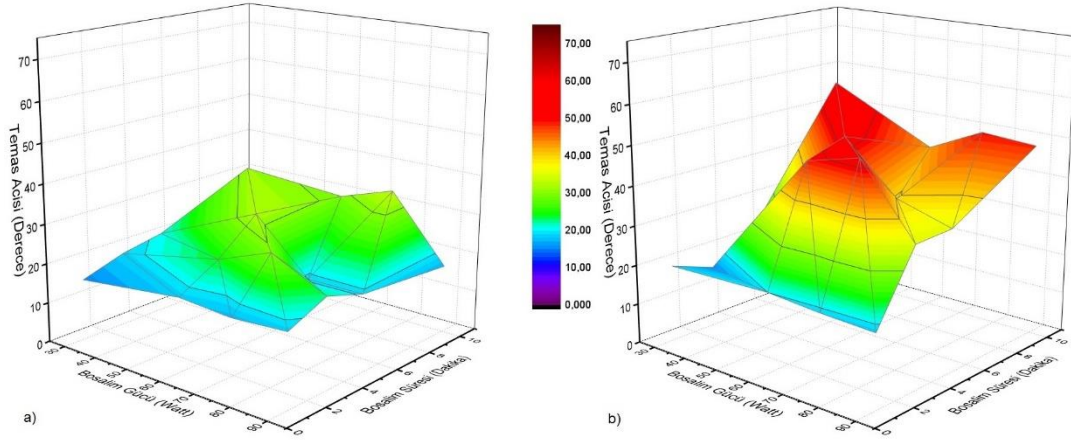
$$E = \frac{hc}{\lambda} = hv$$

Planck eşitliği kullanılarak açıklanabilir. Bu eşitliğe göre düşük frekansa sahip (radyo frekansı gibi) fotonlar, yüksek frekansa sahip (X-ışını gibi) fotonlara nazaran daha düşük enerjiye sahiptir^[39]. Yani LF/LP jeneratörüyle üretilen plazmadaki fotonlar RF/LP ye göre daha düşük enerjiye ve dolaylı olarak momentuma sahiptir. Bu durumda film oluşumu için gerekli enerjiye sahip parçacıkların sayısı ve yoğunluğu az olacağı gibi; yüzey üzerinde oluşan film daha az çapraz bağ yoğunluğuna yani daha düşük stabiliteye sahip olacaktır.

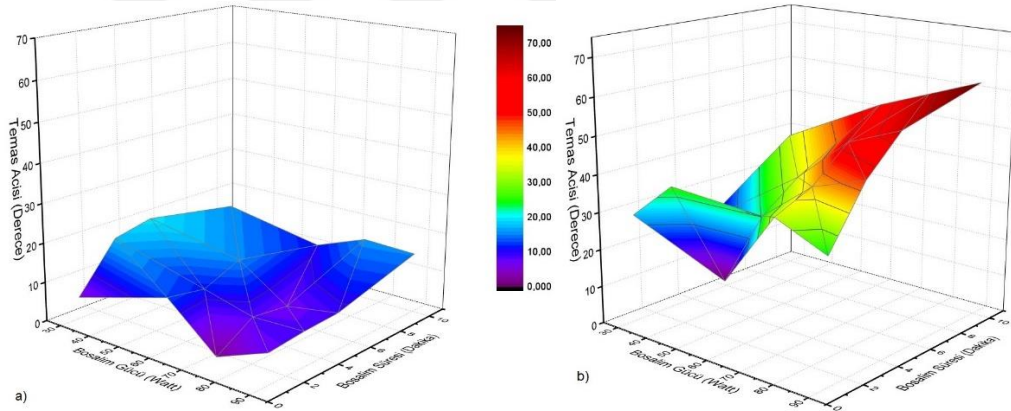
Bu bilgiler doğrultusunda, LF/LP örneklerinin temas açısı ölçümlerinin 30. günlerine doğru referans alınan cam örneklerde ölçülen açı değerinin (33°) üzerine çıktığı görülmektedir. Şekil 3.1, Şekil 3.2 ve Şekil 3.3 de LF/LP cam örneklerinin hava ortamında toplanan 1.gün ve 30.gün temas açısı verileri 3 boyutlu grafiklerle sunulmuştur.

Şekil 3.1’de açıkça görülebileceği gibi pentilamine (AMY) ile yüzeyi modifiye edilmiş cam örneklerin ilk günlerinde ortalama yaklaşık 20° civarından olan temas açıları 30.günlerinde 45° seviyesine yükselmiştir. Hidrofilik karakter; (düşük temas açısı değerleri) tüm boşaltım güçlerinin 1 dakika uygulama süresinde üretilen örneklerinde korunurken, yüksek uygulama sürelerine çıkıldıkça malzemeye ait hidrofilik karakter yerini hidrofobik karaktere bırakmıştır.

Heptilamin (HEP) örneklerine bakıldığında ise; (Şekil 3.2) AMY örneklerine kıyasla daha düşük temas açısı değerlerine sahip olduklarını ve temas açısının 90 W’da en yüksek seviyeye ulaşmış, uygulama süreleri arttıkça temas açısı değerlerinin hidrofobik karaktere fazlasıyla yaklaştığı görülmektedir.

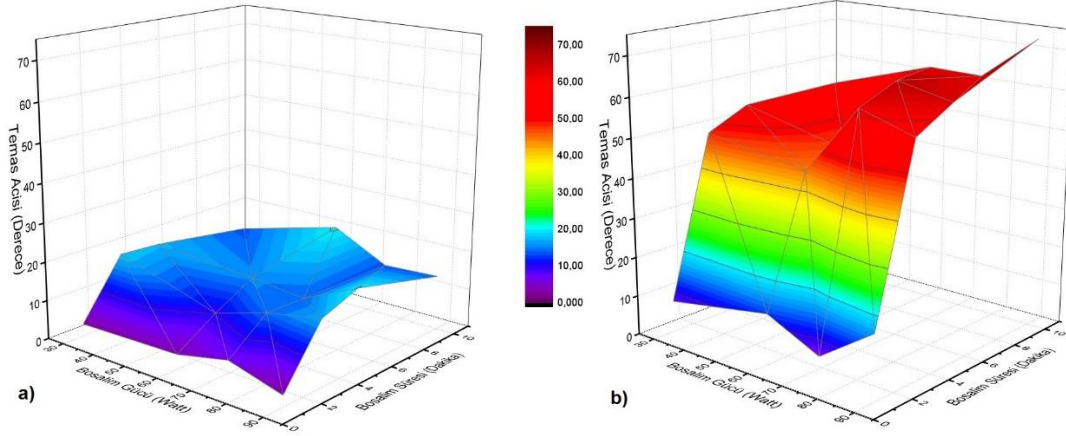


Şekil 3.1. LF/LP ile hazırlanan AMY cam örneklerinin (a) 1.gün, (b) 30.gün temas açısı ölçümlerinin grafiksel gösterimleri. (z-ekseni temas açısını (derece), x-y düzleminin sol tarafı boşalım gücünü (Watt) ve sağ tarafı da maruz kalma süresini (dakika) ifade etmektedir.).



Şekil 3.2. LF/LP ile hazırlanan HEP cam örneklerinin (a) 1.gün, (b) 30.gün temas açısı ölçümlerinin grafiksel gösterimi. (z eksenini temas açısını (derece), x-y düzleminin sol tarafı boşalım gücünü (Watt) ve sağ tarafı da uygulama süresini (Dakika) ifade etmektedir.).

Diaminosikloheksan ile hazırlanan cam örneklerin temas açısı ölçüm verilerine bakıldığında (Şekil 3.2), örneklerin neredeyse tamamına yakın bir kısmı 1.günlerinde süper-hidrofilik özellik göstermektedir. Bu süper-hidrofilik özellik 30.günde, bir (1) dakikalık uygulama süresinde, tüm plazma güç değerleri için korunurken; artan uygulama sürelerinde yine hidrofilik karaktere yaklaşan bir eğilim gözlemlenmiştir.



Şekil 3.3. LF/LP ile hazırlanan DACH cam örneklerinin (a) 1.gün, (b) 30.gün temas açısı ölçümlerinin grafiksel gösterimi (z eksenini temas açısını (Derece), x-y düzleminin sol tarafı boşalım gücünü (Watt) ve sağ tarafı da uygulama süresini (Dakika) ifade etmektedir.).

AMY, HEP, DACH cam örneklerine dair toplanan temas açısı verileri daha detaylı şekilde Çizelge 3.1- 3.2 ve 3.3 de verilecektir. 1.gün ve 30.gün temas açısı trendleri incelendiğinde, elde edilen filmlerin ıslatma özelliği hakkında bir kaç olası sonuca ulaşılabılır.

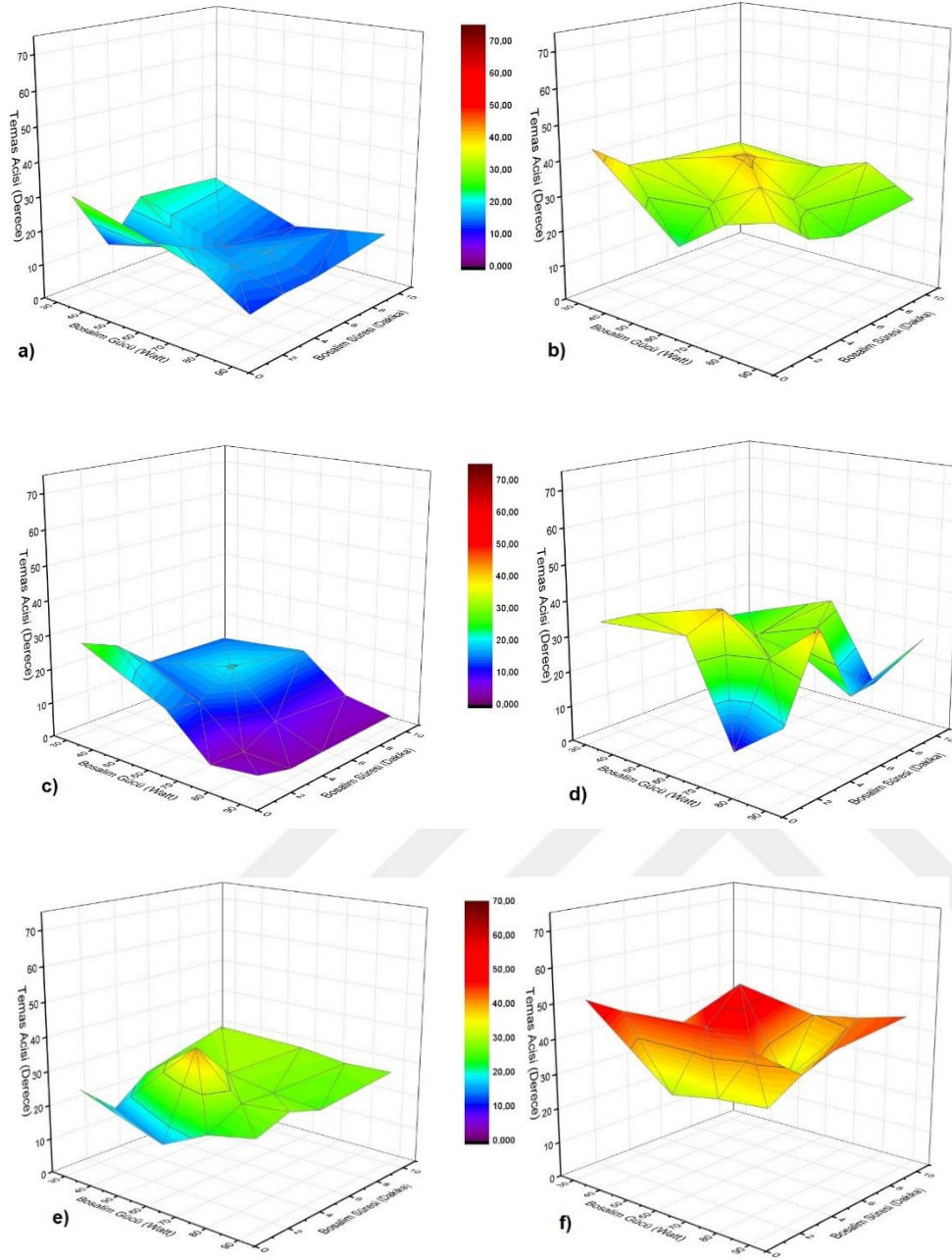
İlk olarak, tüm örneklerin tüm plazma güçlerinde, 1 dakikalık uygulama verileriyle alakalıdır. Plazma koşulları her ne kadar düşük basınçta (0.15mbar) uygulansa da, plazma odacığı içinde atmosferik koşullardan kalan impuritelere bulunmaktadır. Bu impuritelere en önemlisi oksijendir. Oksijenin plazma odacığına doldurulan monomer ya da atmosferik koşullardan kalan impuritelere arasında en düşük bağ kırılma enerjisine (142 kJ/mol) sahiptir^[40,41,42]. Bu sebeple plazmaya maruz kalan oksijen yüzey üzerinde aşınmaya sebep olmaktadır. Artan plazma gücü oksijenin daha çabuk tükenerek film oluşumunu hızlandırmakta, bunun yanı sıra uygulama süresi arttıkça hem yüzeyde aşındırma yapmakta hem de oksijen konsantrasyonu azalarak bittiği için film kalınlığı artmaktadır. Plazma odacığında bulunan oksijen yüzey üzerinde aşındırma yaparken hem yüzeyi temizlemekte hem de yüzeye bağlanarak yüzeyin su tutmasını sağlamaktadır. Bu yüzden örneklerin üzerinden 30 gün geçmesine rağmen, 1 dakikalık örneklerde düşük plazma güçlerinde, yüksek plazma güçlerine nazaran daha hidrofilik yüzey karakteri gözlenmiştir. 30'W da yüzeyde aşınma yüksek iken, 75 ve 90 W'lık örneklerde hızlıca biten oksijen konsantrasyonu ile ince film kaplaması başlamaktadır.

İkinci olarak yüzey ıslatma karakterinin süperhidrofilik ya da hidrofilik karakterden hidrofobik karaktere yaklaşma eğiliminden bahsedilebilir. Bu durumu açıklamak için 3 farklı mekanizma olasılığı vardır. İlki yüzeyde bulunan aktif grupların hareket kabiliyeti ile ilgilidir. Enerji ya da daha doğru deyişle termodinamik olarak daha tercih edilen ve edilmeyen grupların, hareket kabiliyeti sayesinde (dönüş ya da geçiş hareketleriyle) yüzeyi tekrar yapılandırması söz konusudur. Diğer bir deyişle, sistemin etkileşim sonrası erişeceği denge konumundaki enerji seviyesini en düşük düzeyde tutan moleküler hareketlilik, yüzeyin son kararlı konumunu belirlemektedir. Yani, termodinamik olarak tercih edilen gruplar yüzeye doğru hareket ederken, termodinamik olarak uygun olmayan (daha fazla enerji talep eden) gruplar polimer filmin içine doğru gömülürler. Bu sayede enerji olarak uygun guruplar yüzeyde kalmaya devam ederler^[43-46].

Bu yaklaşımın yanı sıra yüzeyde oluşabilecek oksidasyon (oksitlenme) plazma filmler için çok sık rastlanan ve bilinen bir oluşumdur^[47-51]. Oksitlenme 2 şekilde olabilir bunlardan birincisi plazma sonrasında yüzeyde asılı kalan bağların ya da serbest radikallerin oksijen ile etkileşmesi, yani oksitlenmesidir. Oksitlenen yüzeyde oluşan yeni polar gruplar tekrar termodinamik olarak uygun gruplarla yer değiştirerek yüzeyde yeniden yapılanma oluştururlar. Ayrıca, amin gruplarının mor ötesi ışık altında (UV yani gün ışığı gibi) ve oksijen bulunan ortamlarda (atmosferik koşullar gibi) oto-oksidasyona uğradığı bilinen bir durumdur. Amin grupları (-NH₂) bu durumda amino (-NO) gruplarına dönerek yüzeyi yeniden yapılanmaya sokarlar. Amin grupları yüzeye hidrofilik karakter özelliği kazandırırken, amino grupları yüzeyin hidrofobikleşmesine yol açarlar.

Tüm bunların yanı sıra DACH monomerinin diğer monomerlerden yüksek -C-N konsantrasyonuna sahip olması sebebiyle ve halkası üzerindeki C-C bağı, C-N bağına göre daha yüksek bağ kırılma enerjisine sahiptir. Bu özellikleri DACH monomerinin süperhidrofilik özellik kazanmasını sağlayan özelliklerdir. Temas açısı ölçümleri diğer düz zincirli monomerlerle (AMY ve HEP) karşılaştırıldığında bu özelliği de sağladığı görülmüştür.

RF/LF örneklerinin, Şekil 3.4'de de görülebileceği gibi LF/LP plazma filmlerinin gösterdiği özelliklere benzer fakat LF/LP örneklerine göre daha stabil filmler oluşturduğu açıkça görülebilmektedir.



Şekil 3.4. RF/LP ile hazırlanmış a) AMY ince film örneklerinin 1.günü b) AMY ince film örneklerinin 30.günü c) DACH ince film örneklerinin 1.günü d) DACH ince film örneklerinin 30.günü e) HEP ince film örneklerinin 1.günü f) HEP ince film örneklerinin 30.günü (z eksenini temas açısını (Derece), x-y düzleminin sol tarafı boşalım gücünü (Watt) ve sağ tarafı da uygulama süresini (Dakika) ifade etmektedir.).

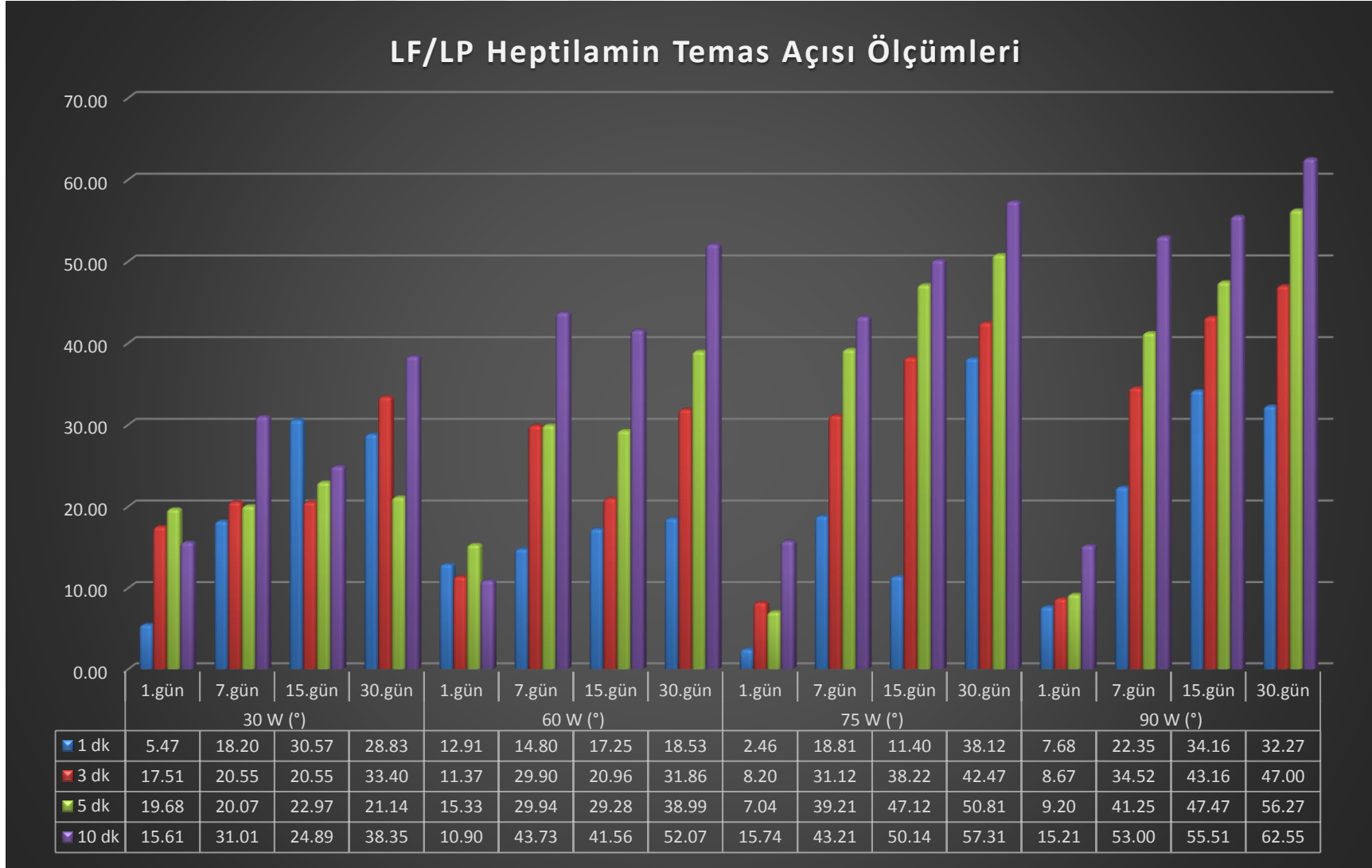
Bunların yanı sıra başarılı olarak nitelendirilebilecek RF/LP tüm monomer ince film örnekleri ve LF/LP plazmada başarılı olan DACH ince film örnekleri sıvı (su) ortamında 30 gün süreyle bekletilerek bu ortamda gösterdikleri yüzey özellikleri

incelenmiştir. Bu analizler sonucunda, Yasuda'nın (1985) uzun yıllar önce açıkladığı gibi yüzey kendini sıvı ortama, hem termodinamik olarak uygun hem de uygun olmayan grupları dengeleyecek şekilde tekrar yapılandırdığına; bu yüzden de hidrofilik özelliği atmosferik koşullardaki örneklere göre daha uzun süre koruduğuna yönelik veriler elde edilmiştir^[19]. Bu sayede, ayrıca verilerden de görülebileceği üzere su ortamında bekletilen örnekler kararlılıklarını 30 gün boyunca korumuşlardır.

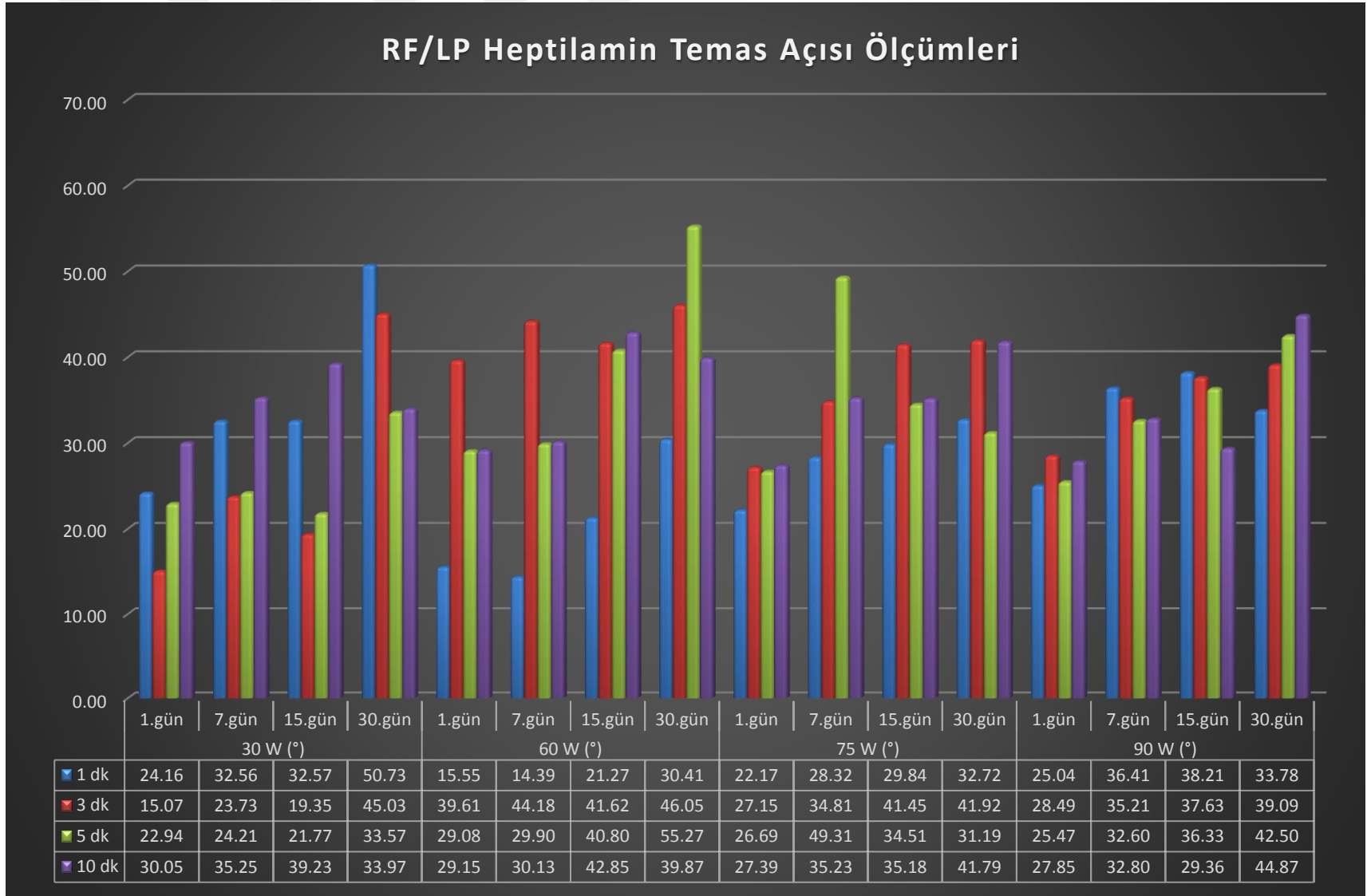
Yukarıda 3 boyutlu grafiklerle gösterilen ve sıvı ortamda bekletilen örneklerin 1, 7, 15 ve 30.gün değerleri aşağıdaki çizelgelerde detaylı olarak verileriyle beraber çubuk grafikte gösterilmektedir.



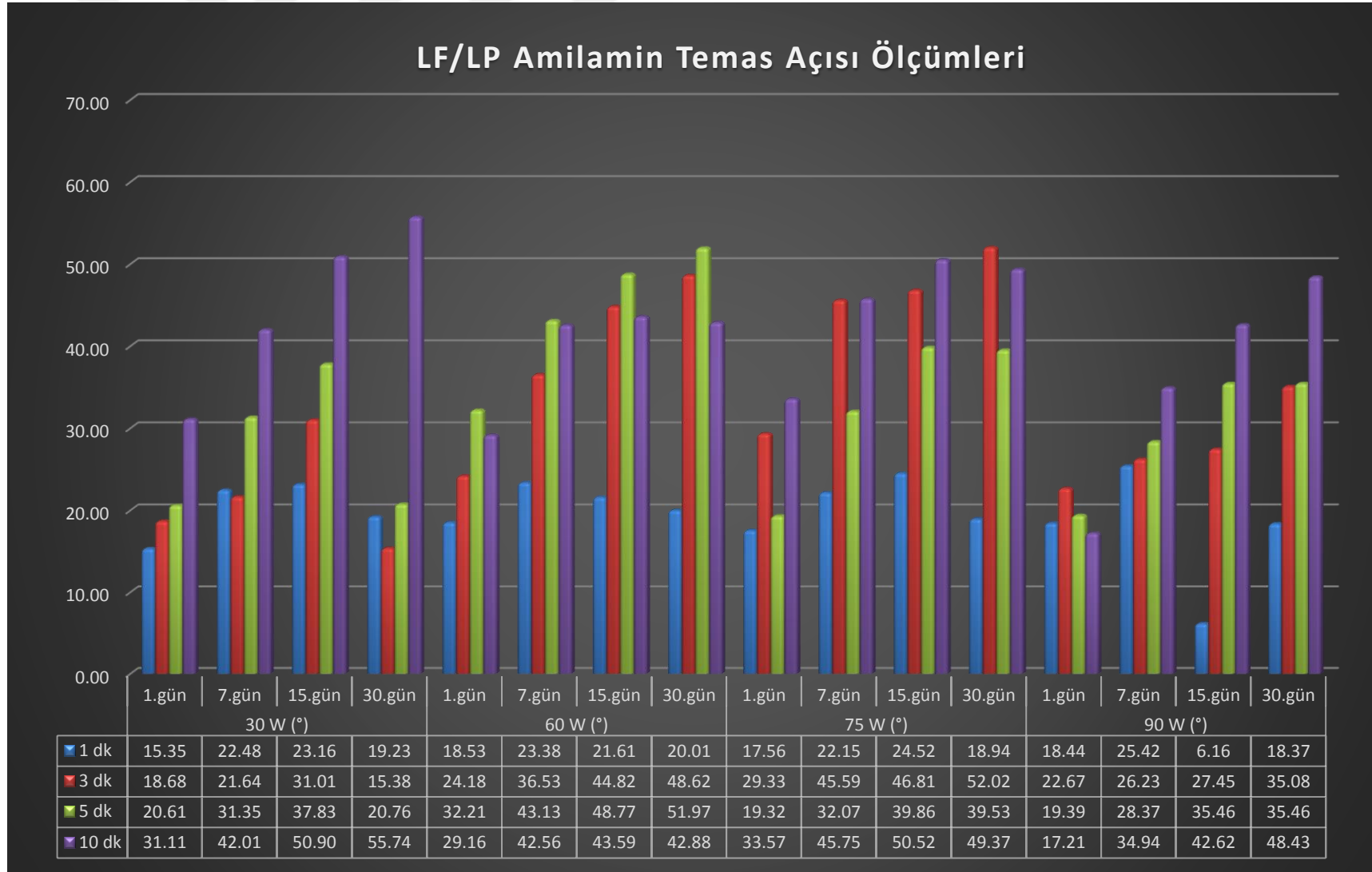
Çizelge 3.1: LF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



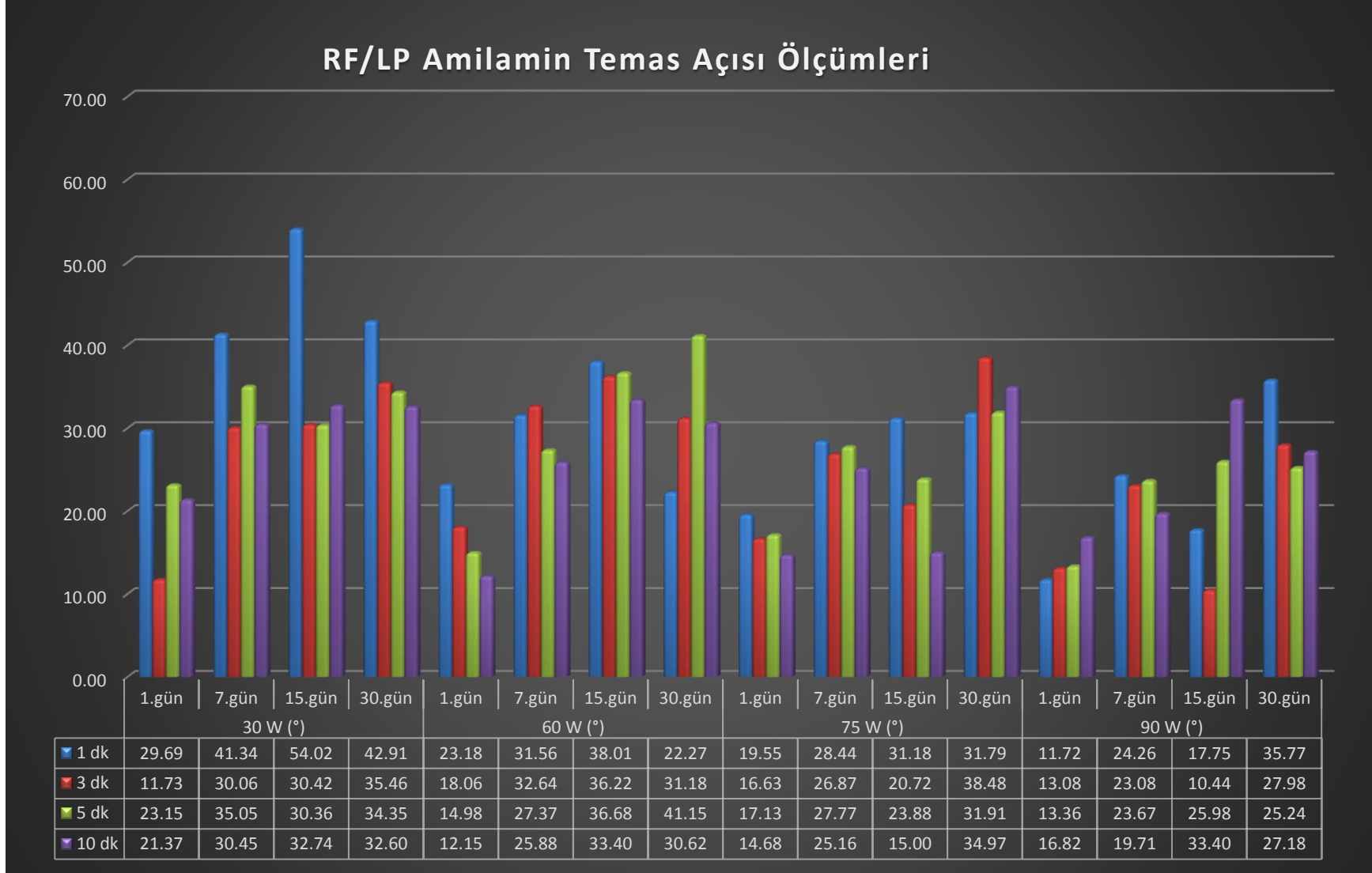
Çizelge 3.2 : RF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



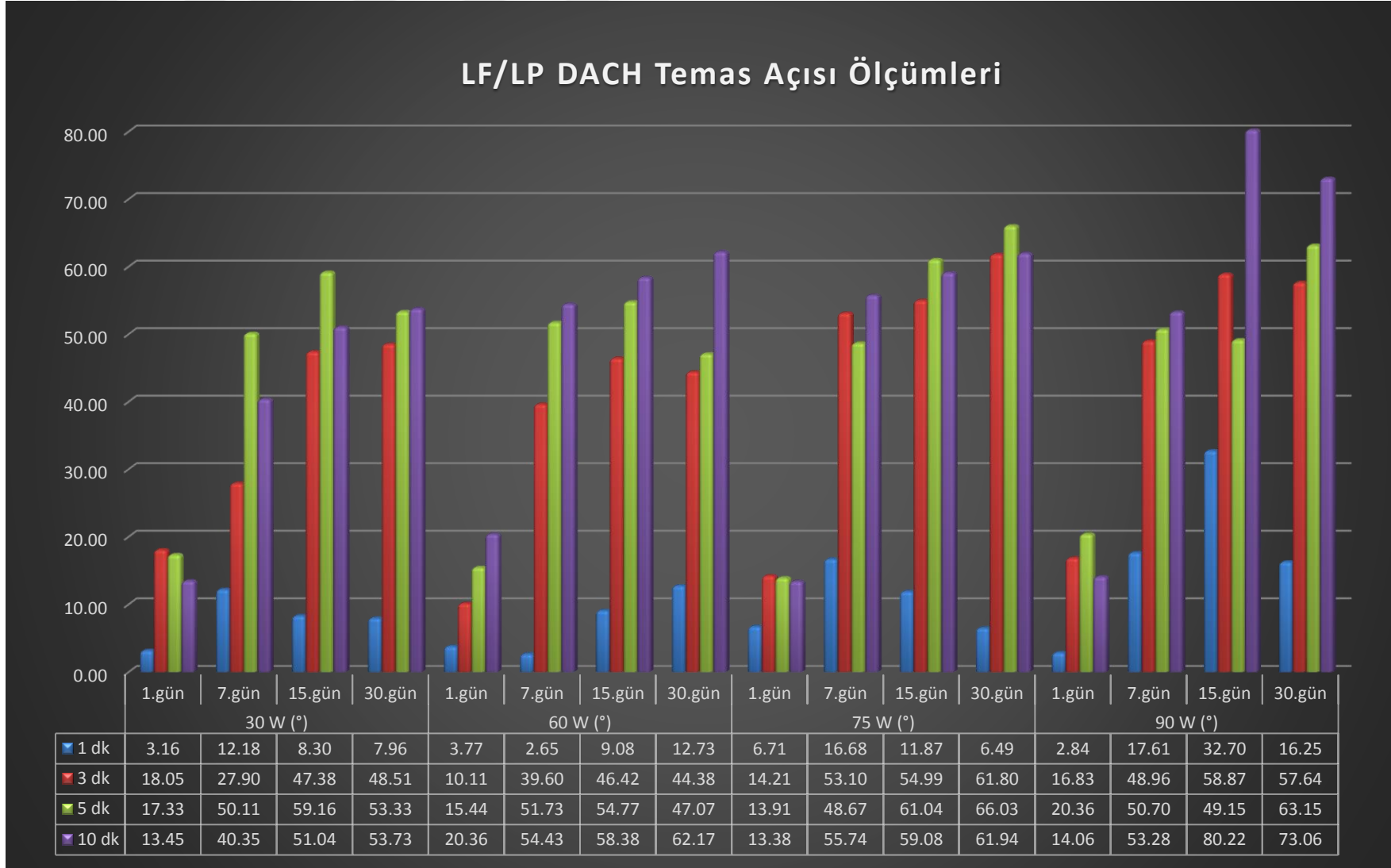
Çizelge 3.3 : LF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



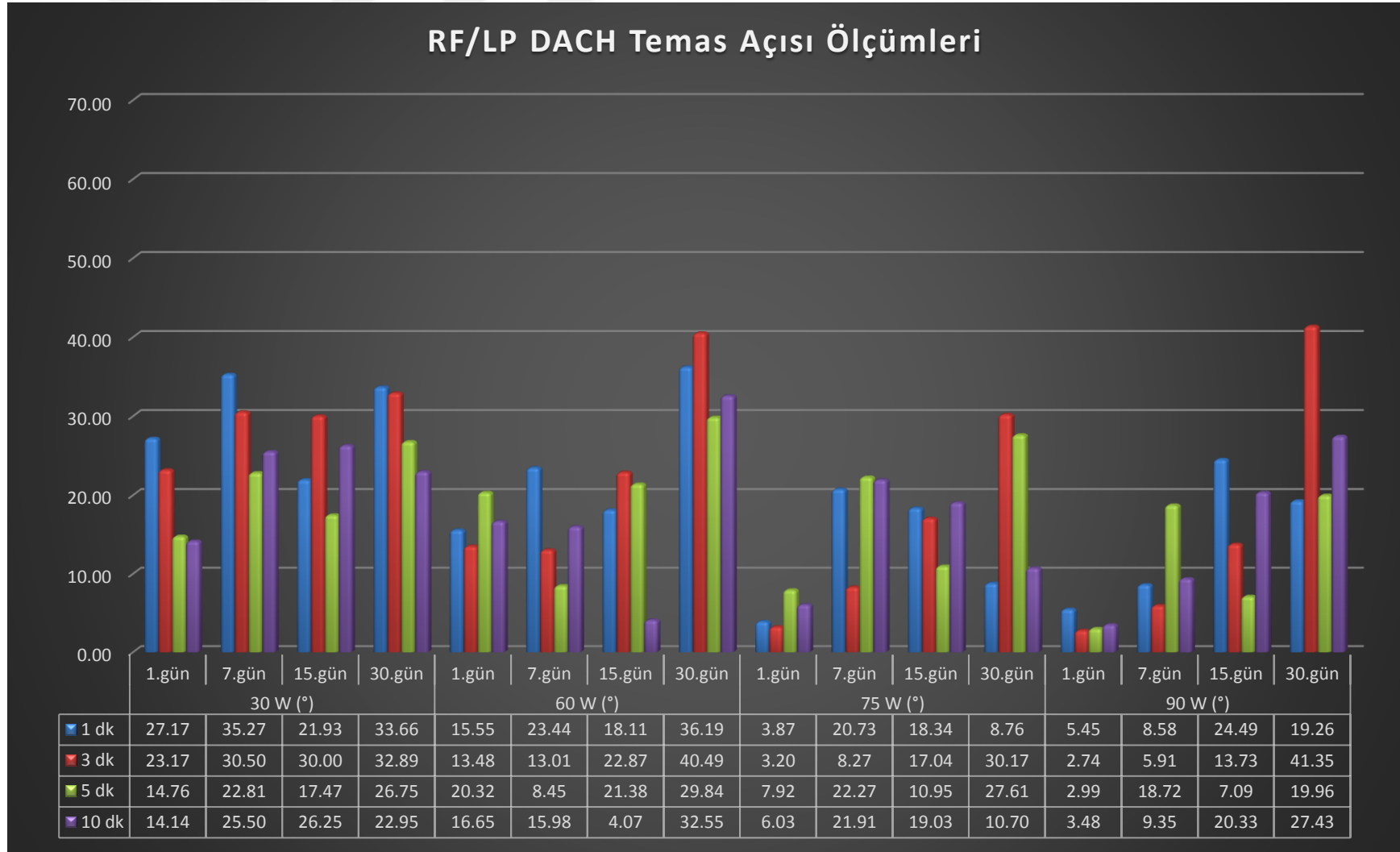
Çizelge 3.4 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



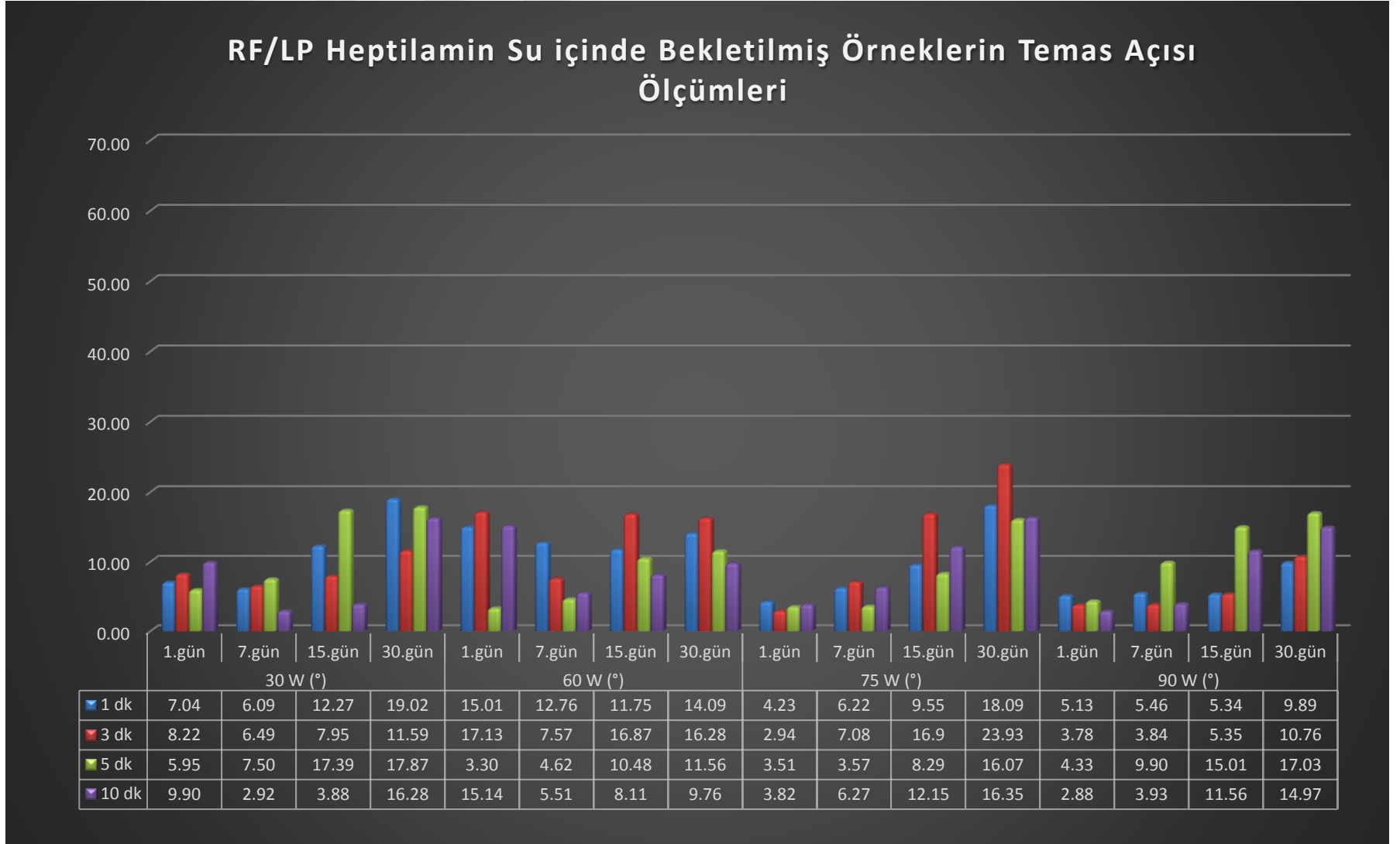
Çizelge 3.5 : LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



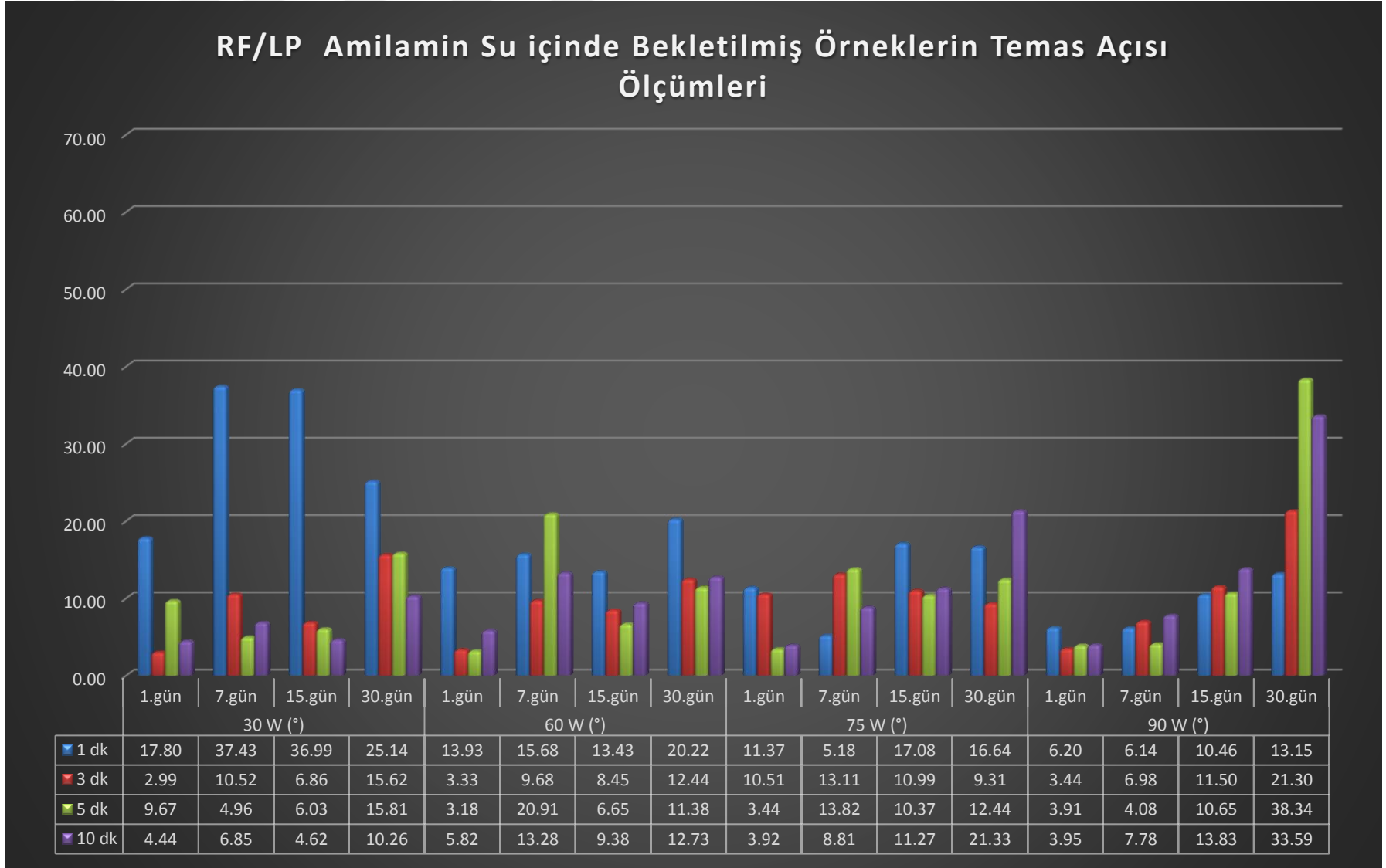
Çizelge 3.6 : RF/LP Diaminosiklohekzan (DACH) cam örneklerinin atmosferik koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



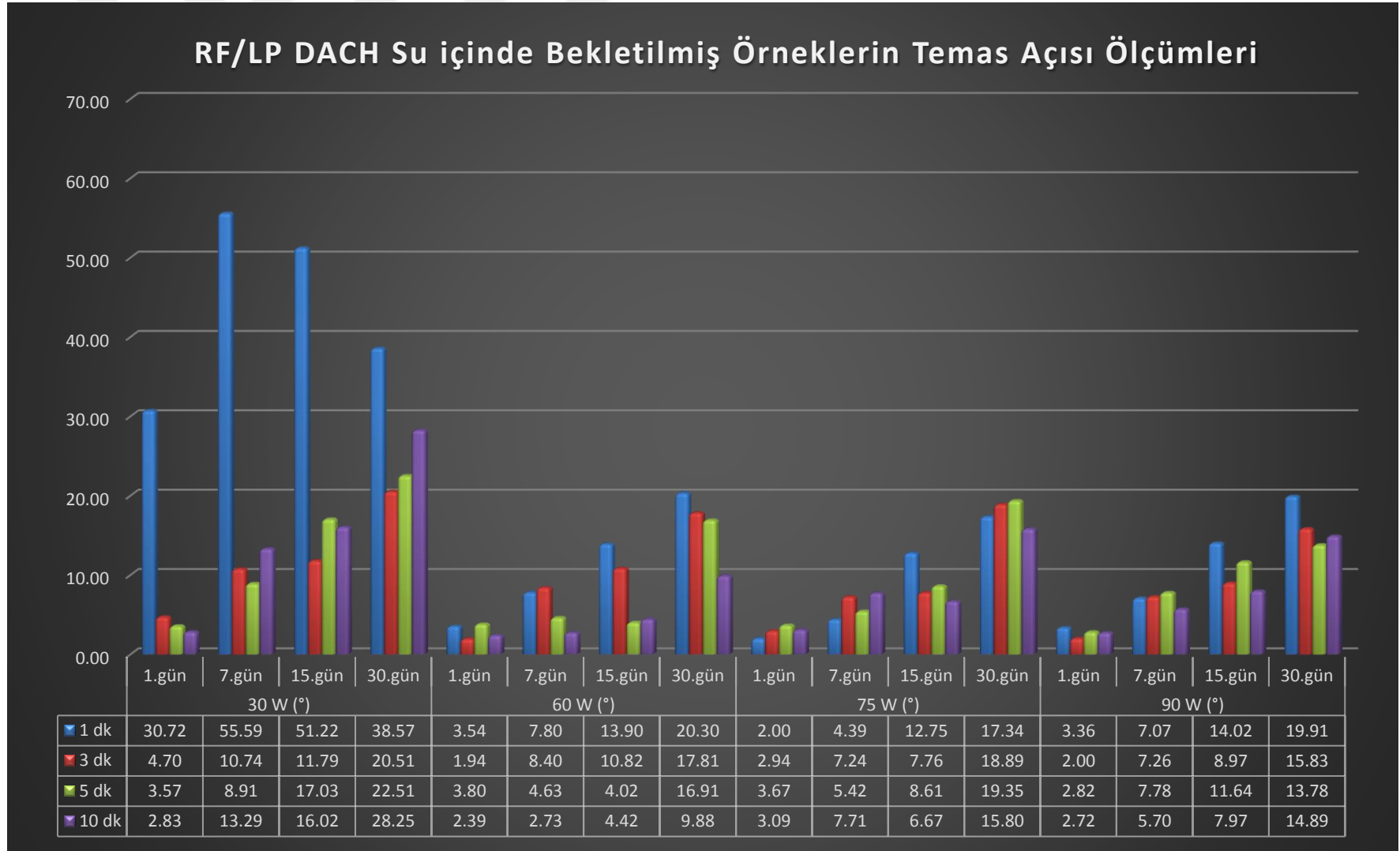
Çizelge 3.7 : RF/LP Heptilamin (HEP) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



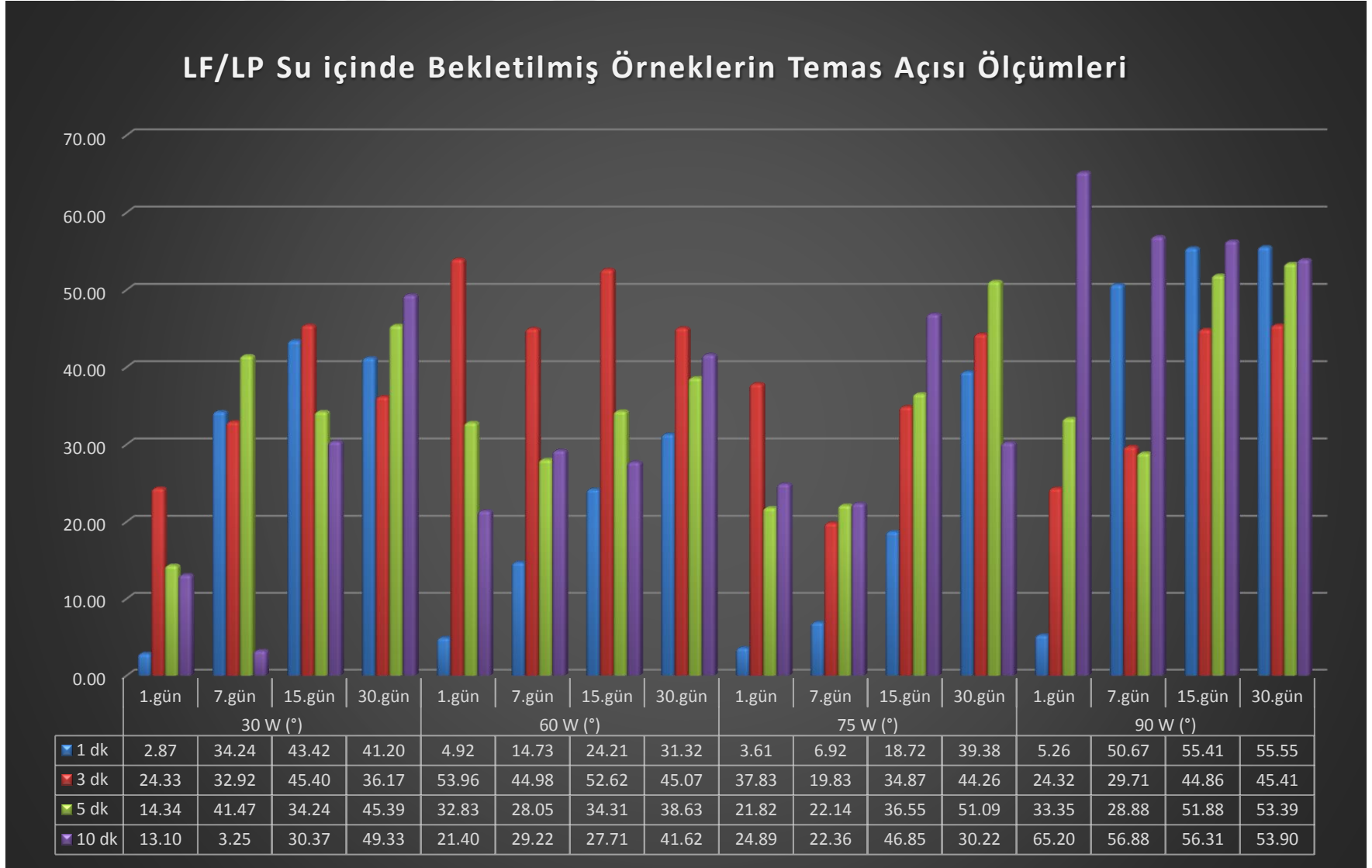
Çizelge 3.8 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



Çizelge 3.9 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



Çizelge 3.10 : LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) cam örneklerinin sıvı koşullardaki 30 günlük temas açısı takip çizelgesi.



3.1.2. Direnç Ölçümleri

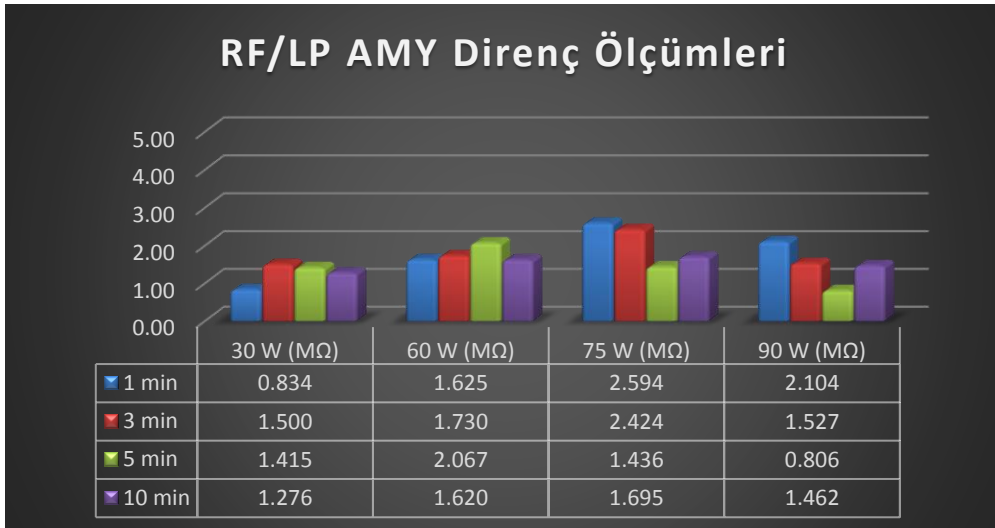
Plazma polimerizasyonu yöntemi kullanılarak hazırlanan cam örneklerin yanı sıra çevirici olarak kullanılacak olan QTF'in yüzeyine kaplanan film sonucu oluşan direnç değişimi incelenmiştir. Bu ölçümlerde, 10 adet yüzeyi modifiye edilmemiş QTF alınarak direnç ölçümleri yapılmış ve ortalaması 0.01M Ω bulunmuştur. Bulunan bu değer referans olarak kaydedilmiştir.

Literatürde de olduğu gibi^[17,30], QTF'in sıvı içerisindeyken göstermiş olduğu yetersiz performansın artırılmasına direnç artışı ile katkı sağlanıp sağlanamayacağı incelenmiş fakat artan direnç değerinin yerine ayar çatalına uygulanacak yükseltgenme modunun (çatalın daha yüksek hızda titreşmesini sağlayacak elektriksel devre methodu) sıvı ortam ölçümleri için daha uygun olacağına kanaat getirilmiştir. Bu süreçte elde edilen direnç ölçümleri sayesinde, bize plazma polimerizasyonu ile elde edilmiş filmlerin fiziksel özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir.

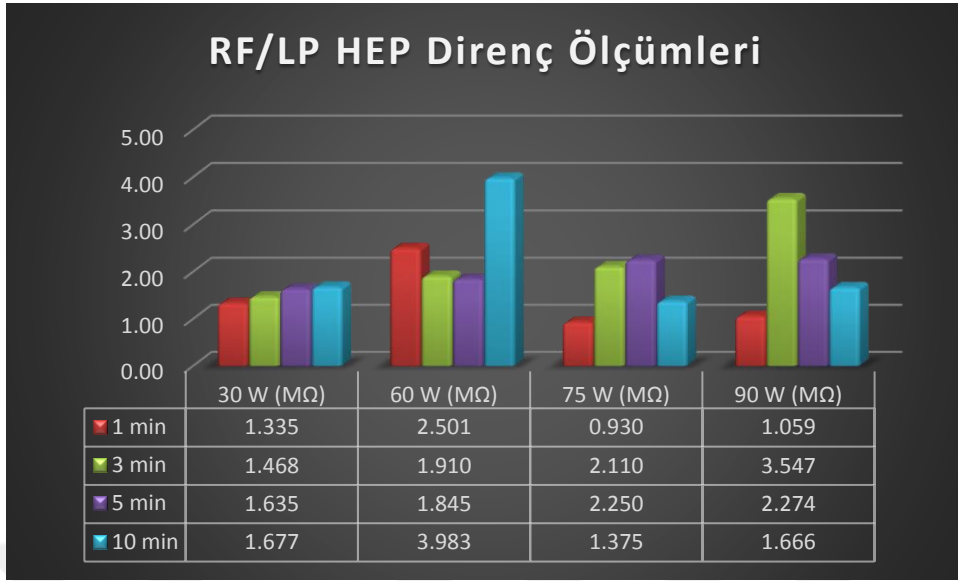
Bilindiği üzere, akımın ince film üzerinden yürüyebilmesi için film üzerinde çift bağ, üçlü bağ, elektron bulutu ya da boş orbital bulunan alanlar olması gerekmektedir. Düz zincirli yapılar bu sebeple örneğin sahip olduğu devrenin direncini arttırmaktadırlar^[52].

Aşağıdaki grafiklerde QTF örneklerinin yüzey modifikasyonundan sonra sahip olduğu direnç değerleri verilmiştir.

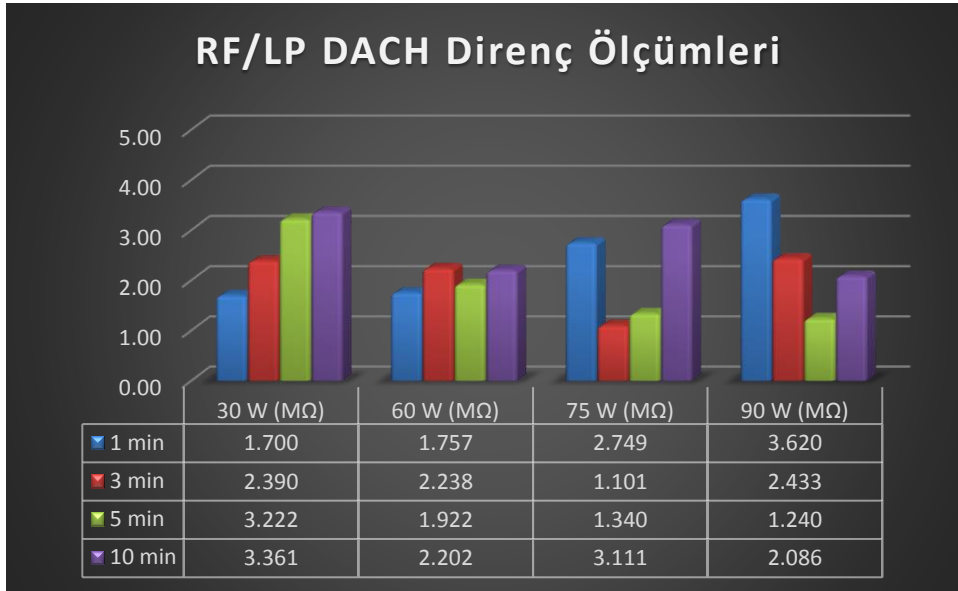
Çizelge 3.11 : RF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



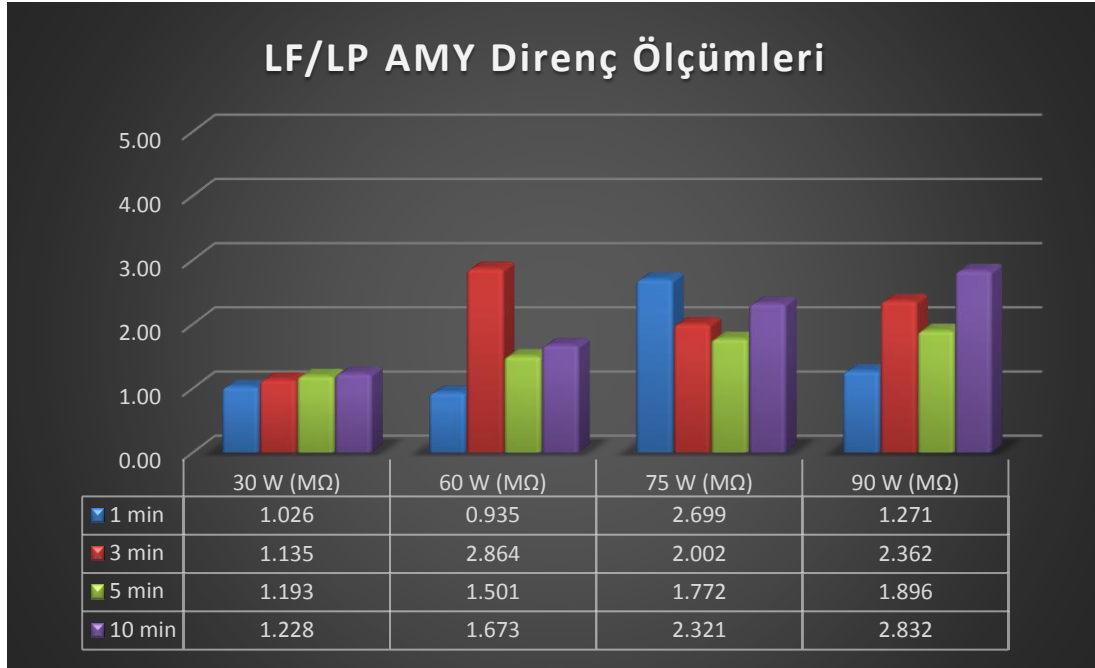
Çizelge 3.12 : RF/LP Heptilamin (HEP) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



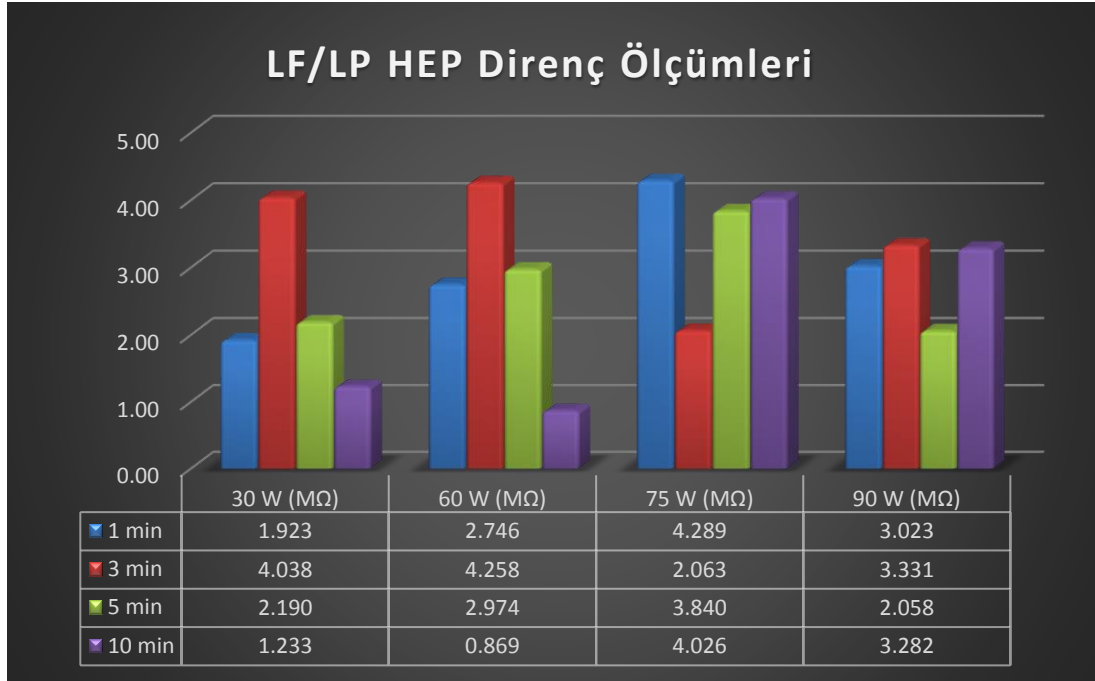
Çizelge 3.13 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



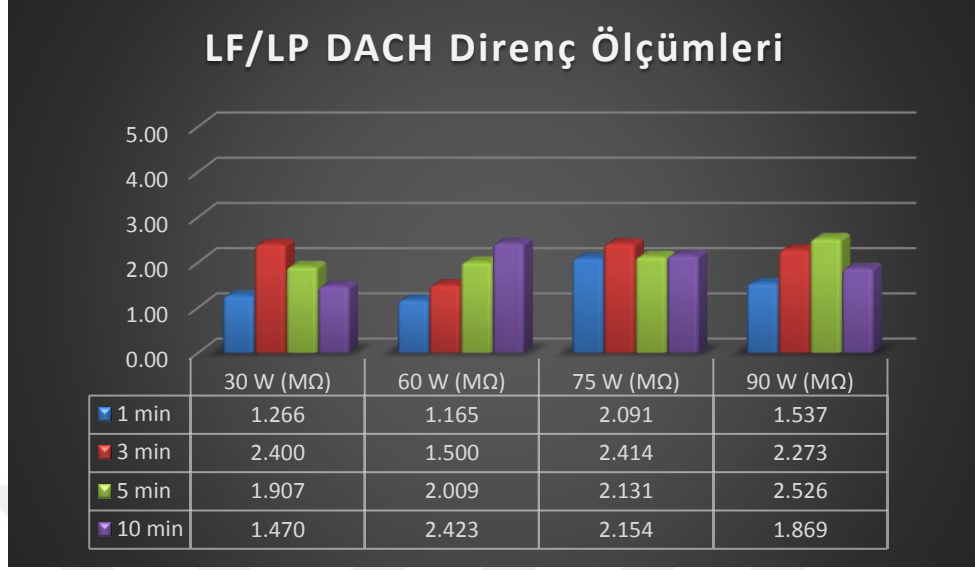
Çizelge 3.14 : LF/LP Pentilamin (Amilamin ya da AMY) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



Çizelge 3.15 : RF/LP Heptilamin (HEP) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



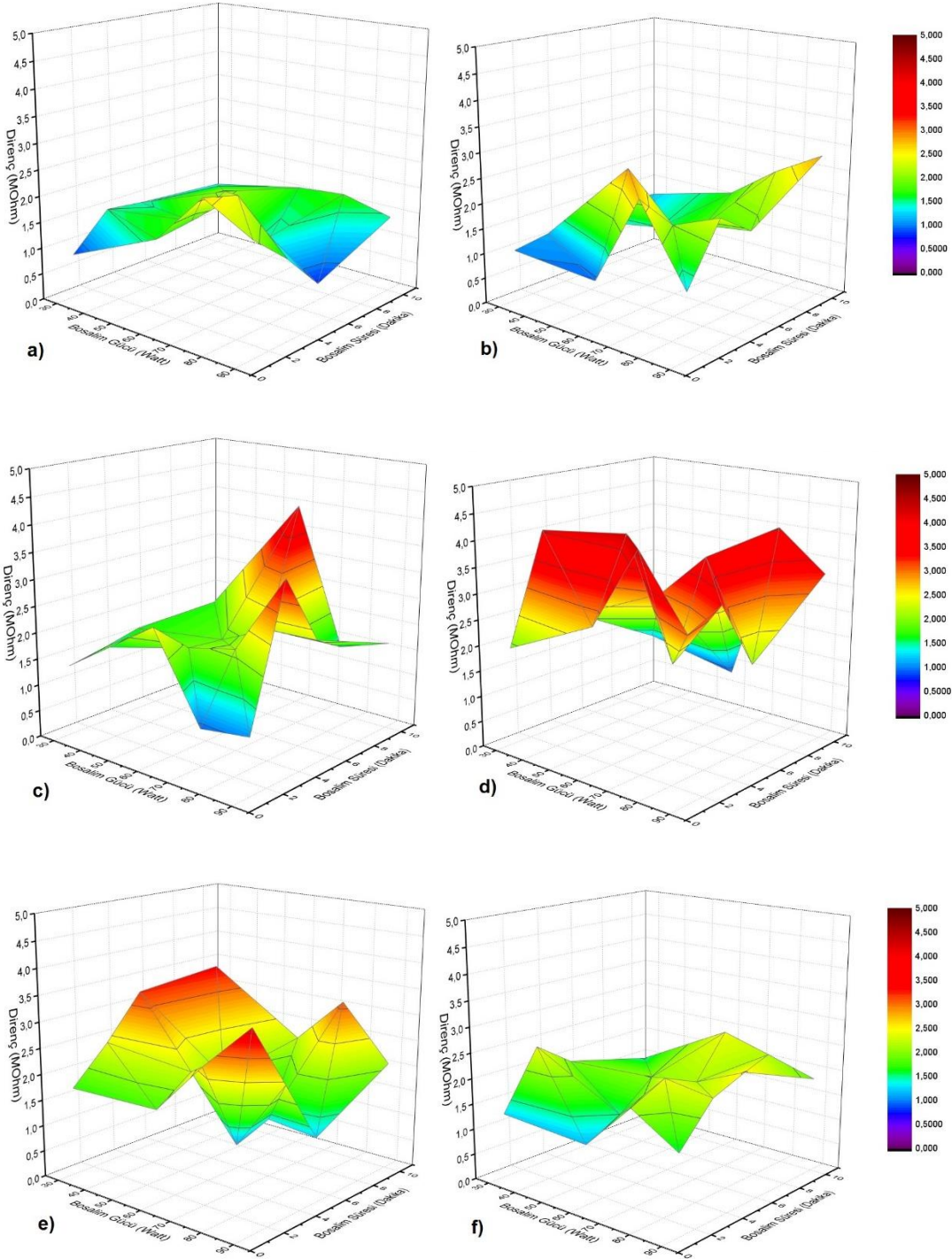
Çizelge 3.16 : RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) QTF örneklerinin direnç ölçümleri.



Çizelgelerden (çizelge 3.11- 3.12- 3.13- 3.14- 3.15- 3.16) de açıkça görülebileceği gibi, direnç değerlerini herhangi bir plazma koşuluna bağlamak ya da ilişkilendirmek mümkün değildir. Kısaca direnç değerleri plazma parametrelerinde bağımsızdır denilebilir. Fakat bunun yanı sıra artan karbon içeriği ile beraber genel olarak direnç artışının görüldüğü söylenebilir. Direnç verilerine bakıldığında 0.01 MΩ olarak kabul edilen referans QTF direncinin 4.258 MΩ'a kadar yükseldiği gözlenmiştir. Uygulamanın yarattığı farkın daha iyi anlaşılabilmesi için yukarıda çizelgeleri verilen direnç ölçüm değerleri üç boyutlu değişim grafiklerine aktarılmış ve karşılaştırmalı olarak Şekil 3.5 de sunulmuştur.

Bu veriler göz önüne alındığında en kararlı örnekler olarak RF/LP plazmada;

1. Pentilamin (AMY) 60 W 10 dk
2. Pentilamin (AMY) 75 W 1 dk
3. Pentilamin (AMY) 75 W 5 dk
4. Heptilamin (HEP) 60 W 1 dk
5. Heptilamin (HEP) 75 W 1 dk
6. Diaminosikloheksan (DACH) 75 W 3 dk



Şekil 3.5. QTF örneklerinin direnç ölçümlerini gösteren 3 boyutlu grafikler a) RF/LP AMY örnekleri b) LF/LP AMY örnekleri c) RF/LP HEP örnekleri d) LF/LP HEP örnekleri e) RF/LP DACH örnekleri f) LF/LP DACH örnekleri.

7. Diaminosikloheksan (DACH) 90 W 1 dk

8. Diaminosikloheksan (DACH) 90 W 3 dk

9. Diaminosikloheksan (DACH) 90 W 10 dk

LF/LP plazma da en stabil örnekler;

1. Pentilamin (AMY) 90 W 5 dk
2. Heptilamin (HEP) 30 W 1 dk
3. Heptilamin (HEP) 30 W 3 dk
4. Heptilamin (HEP) 60 W 1 dk
5. Diaminosikloheksan (DACH) 60 W 1 dk
6. Diaminosikloheksan (DACH) 75 W 1 dk

Olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu örneklerle karşılaştırma amacıyla deneylerin hepsi tekrarlanmıştır ve ortalamaları bir sonraki bölümde sunulmuştur.

3.1.3. Kararlı Örneklerin Temas Açısı ve Direnç Ölçümleri Tekrarı

Hazırlanan örnekler arasındaki en kararlı 15 örneğin tekrarlanan ölçümlerinin ortalamaları ve verileri aşağıda çizelge 3.17 ve 3.18’de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Bunun sonucunda benzer verileri veren 5 örnek ile araştırma detaylandırılmıştır.

Çizelge 3.17 : RF/LP ve LF/LP örnekleri arasından seçilen en kararlı örneklerin direnç ölçümleri tekrarları.

HEP RF/LP	$\Delta R \pm \sigma$ (MΩ)	HEP LF/LP	$\Delta R \pm \sigma$ (MΩ)
60W-1dk	2.37 \pm 0.24	30W-1dk	2.16 \pm 0.22
75W-1dk	1.71 \pm 0.69	30W-3dk	2.59 \pm 1.26
DACH RF/LP		60W-1dk	2.28 \pm 0.41
75W-3dk	2.62 \pm 1.33	DACH LF/LP	
90W-1dk	3.83 \pm 0.30	60W-1dk	2.08 \pm 0.89
90W-3dk	3.24 \pm 0.82	75W-1dk	2.15 \pm 0.07
90W-10dk	2.77 \pm 0.66	AMY LF/LP	
AMY RF/LP		90W-5dk	2.28 \pm 0.33
60W-10dk	2.10 \pm 0.90		
75W-1dk	2.25 \pm 0.61		
75W-5dk	2.75 \pm 1.65		

Çizelge 3.18 : RF/LP ve LF/LP örnekleri arasından seçilen en kararlı örneklerin temas açısı ölçümleri tekrarları.

HEP RF/LP	$\Delta(^{\circ}) \pm \sigma$	HEP LF/LP	$\Delta(^{\circ}) \pm \sigma$
60W-1dk	15.69 \pm 0.20	30W-1dk	5.19 \pm 0.40
75W-1dk	21.42 \pm 1.06	30W-3dk	10.59 \pm 9.79
DACH RF/LP		60W-1dk	9.14 \pm 5.34
75W-3dk	8.17 \pm 7.02	DACH LF/LP	
90W-1dk	6.76 \pm 1.89	60W-1dk	3.24 \pm 0.75
90W-3dk	12.47 \pm 13.76	75W-1dk	5.33 \pm 1.95
90W-10dk	15.76 \pm 17.36	AMY LF/LP	
AMY RF/LP		90W-5dk	33.76 \pm 7.62
60W-10dk	20.72 \pm 12.12		
75W-1dk	14.57 \pm 7.05		
75W-5dk	17.82 \pm 0.98		

3.1.4. QTF Örneklerin Sıvı Ortam Kararlılık Testleri

Önceki bölümlerde de verildiği üzere QTF örneklerin sıvı ortam testleri fosfat tampon çözeltisi (PBS, pH=7.4) içinde 1 dk bekletildikten sonra saf su ile temizlenip kurutulmasına müteakip sensor controller cihazı ile her örnek için 10 dakikalık aralarla 3'er kere ölçülmüştür.

Bu ölçümler öncelikle en stabil görülen 15 örnek üzerinde denenmiştir ve aşağıdaki çizelgede verilen değerler bulunmuştur. Çizelge 3.19'da örneklerin plazma polimerizasyonu yöntemi kullanılarak ince film kaplandıktan sonra ölçülen frekans değerleri ile örneklerin PBS içine daldırılıp temizlendikten sonraki frekans kayma değerlerini gösterir.

QTF örneklerin vakumdayken sahip olduğu frekans değeri 32.7680 kHz'dir. Kapağı çıkartılan QTF örneklerinin üzerlerine binen hava basıncı sebebiyle frekans değerleri 0.001 ile 0.005 kHz arası bir düşüş yaşamaktadır. Yüzey modifikasyonundan sonra elde edilen yeni QTF'lerin frekansları PBS içine batırılıp kurultulduğunda yüzeye binen kütle sebebiyle frekansının düşmesi beklenmektedir.

Çizelge 3.19 : RF/LP ve LF/LP örneklerinin arasından seçilen en kararlı örneklerin frekans değişim değerleri.

HEP RF/LP	$\Delta f \pm \sigma$ (Hz)	HEP LF/LP	$\Delta f \pm \sigma$ (Hz)
60W-1dk	6.90 \pm 1.41	30W-1dk	-4.7 \pm 13.44
75W-1dk	2.90 \pm 0.57	30W-3dk	-12.95 \pm 18.03
DACH RF/LP		60W-1dk	2.05 \pm 3.18
75W-3dk	-2.55 \pm 8.27	DACH LF/LP	
90W-1dk	-2.57 \pm 3.54	60W-1dk	1.25 \pm 2.05
90W-3dk	-11.5 \pm 15.56	75W-1dk	1.30 \pm 4.95
90W-10dk	-7.25 \pm 8.41	AMY LF/LP	
AMY RF/LP		90W-5dk	-5.6 \pm 8.77
60W-10dk	-12.5 \pm 19.80		
75W-1dk	-3.15 \pm 3.18		
75W-5dk	-0.65 \pm 1.06		

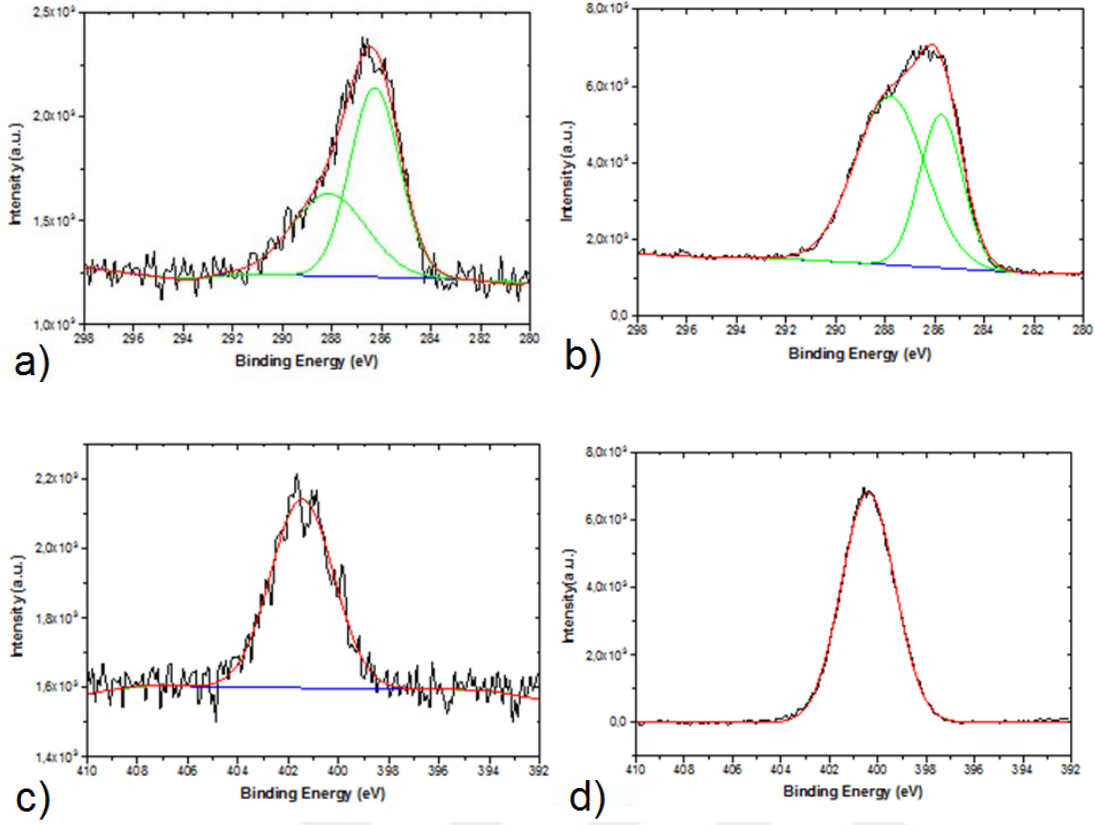
Örneklerin üzerinde yapılan testlerde örneklerden bazılarının CA ölçümlerinin tutarsız olması ve frekans ölçümlerinde örnek üzerinden filmin sıyrılması gibi, frekans artışıyla anlaşılan, veriler alınmıştır. Bu veriler göz önüne alınarak örneklerin sayısı 5'e düşürülmüş ve bu örnekler üzerinde daha detaylı araştırmaya geçilmiştir. Seçilen örnekler aşağıdaki gibidir;

1. RF/LP Pentilamin (AMY) 75 W 5 dk
2. RF/LP Heptilamin (HEP) 75 W 1 dk
3. RF/LP Diaminosikloheksan (DACH) 90 W 1 dk
4. LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) 60 W 1 dk
5. LF/LP Diaminosikloheksan (DACH) 75 W 1 dk

LF/LP örnekleri GA aktivasyonunda başarısız oldukları için daha ileri şekilde incelenmemişlerdir.

3.1.5 FTIR ve XPS Yüzey Analizleri

Yapılan kaplamaların yüzey üzerinde yarattığı kimyasal içerik analizleri FTIR ve XPS ile yapılmıştır. Fakat filmlerin çok ince olması sebebiyle FTIR ölçümlerinden anlamlı data toplanamamış, gürültü düzeyinde pikler elde edilmiştir. Bunun üzerine XPS analizleri yapılmıştır. Analizlerde karbon ve azot piklerinin uygulama süresi ile değiştiği görülmüştür. Şekil 3.6 da XPS ters evrişim grafikleri görülmektedir.



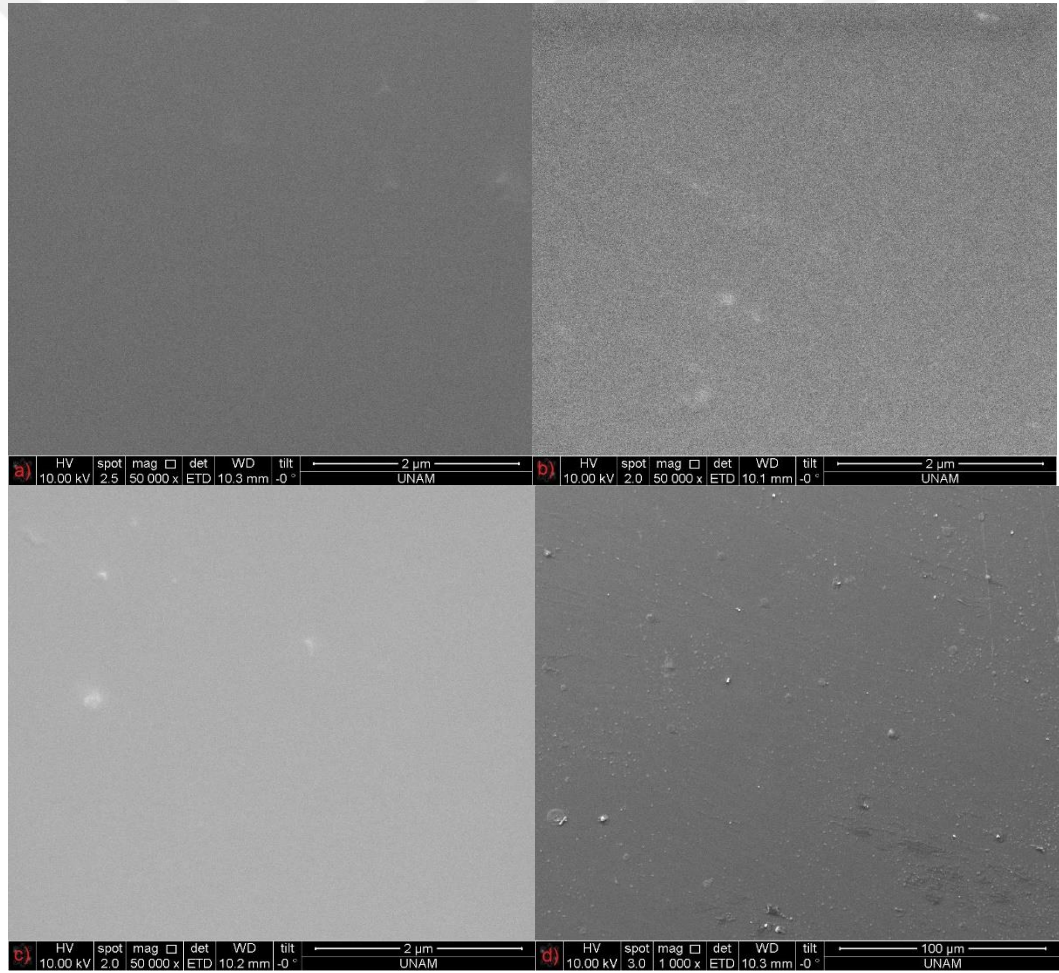
Şekil 3.6. (a) RF/LP DACH örneklerinin karbon içerikli ters evrişim grafiği (b)RF/LP AMY örneklerinin karbon içerikli ters evrişim grafiği (c)RF/LP DACH örneklerinin köprü azot elementinin grafiği (d)RF/LP AMY örneklerinin köprü azot elementinin grafiği.

Şekil 3.6 (a) da görülen ters evrişim eğrileri 286.27 eV ve 288.12 eV'da görülmektedir. İlk eğri C=O bağının varlığını belirtirken, ikinci eğri C-NH için karakteristik bir piktir. Aynı şekilde (b) de görülen AMY örneklerinin karbon içerik eğrisinde pikler 285.75 eV ve 287.81 eV'a denk gelmektedir. Yine DACH grafiğindeki gibi ilk pik C=O bağı verirken ikinci pik C-NH pikini vermektedir. Bu C-NH bağı yani köprü azot içeriğini gösteren DACH örnekleri için (c) ve AMY örnekleri için sırasıyla 401.45 eV ve 400.5 eV da görülmektedir.

Bu verilere bakılarak şu yorumlara varılabilir; yüzeyde karbon grupları oksidasyona uğramıştır. Bunun kaynağı plazma odacığı içinde kalan oksijen içeriğinden ya da otooksidasyon olabilir. Bunun yanı sıra hem karbon içeriği hem de azot içeriği grafiklerinde yüzeyde amin grupları olduğu kanıtlanmış ve iki grafik birbirini teyit eder nitelikte karakter göstermektedir.

3.1.6 SEM Yüzey Analizleri

Yüzey analizleriyle ilgili görüntüler şekil 3.7 de görülebilir. Bu görüntülerde en çok dikkat çeken şey ise referans (modifiye edilmemiş) cam örneklerin yüzeyi pürüzlü ve impüritesi bol bir görüntü çizerken, plazma polimerizasyonu sonrasındaki örneklerde (RF/LP ile hazırlanan ve son elemelerde seçilen örnekler) yüzeyin daha pürüzsüz ve homojen bir görüntü çizdiği görülmektedir. Örnekler 10.00 kVda, nokta boyutu 2.5 ve büyütmeleri 50000 olarak belirlenmiştir. Yalnızca referans olarak gösterilen cam örneğin büyütmesi 1000 olarak verilmiştir. Bu sayede yüzeydeki impüritelerin fazlalığı hakkında bir ön bilgi olması hedeflenmiştir.



Şekil 3.7. En stabil RF/LP örneklerinin SEM görüntüleri (a) HEP 75 W 1 dk (b) AMY 75 W 5 dk (c) DACH 90 W 1 dk (d) referans cam örnek yüzeyi.

3.2 Gluteraldehit (GA) Aktivasyonu ve Model Protein Test Analizleri

TnT takibine yönelik geliştirilmeye çalışılan QTF tabanlı kütle hassas biyosensörün son aşamada tanıyıcı tabakasını oluşturmak üzere hazırlanan örnekler içerisinde farklı plazma frekansı ile işlem görmüş toplam beş örnek seçilmiştir. Bu örneklerin 2 tanesi LF bölgede diğer 3 tanesi ise RF bölgede kullanılan plazma işlemlerinde elde edilmiştir. Bu örneklerin seçiminde; temas açısı, iletkenlik ve frekans kayması temel kriterler olarak belirlenmiştir. Seçilen beş örneğe, öncelikle GA aktivasyonu önceki bölümlerde verildiği gibi yapılmıştır. Frekans kaymaları QTF'ler üzerinden ve FTIR-ATR spektrumları cam örnekler üzerinden analiz edilmiştir.

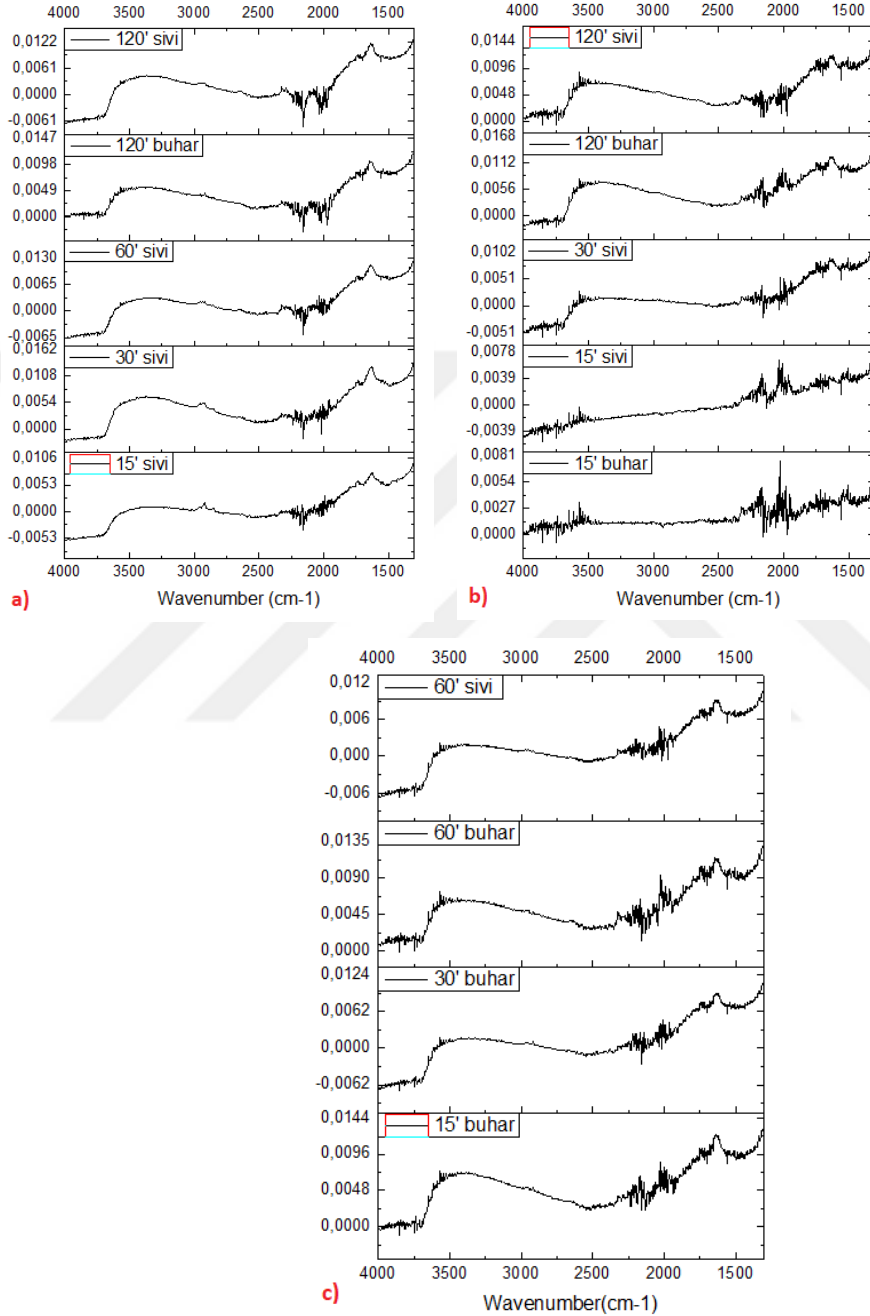
QTF'lerin frekans kaymaları GA aktivasyonu hakkında çok önemli bilgiler vermektedir. QTF'ler bu biyosensör çalışması için kütle hassas çevirici olarak kullanılacağından QTF üzerine yüklenen her yük ile frekansının düşmesi gerekmektedir. Frekansında düşme yerine yükselme görülen QTF'lerin üzerindeki filmlerin sıyrıldığı ve bu sırada da QTF yüzeyine zarar verdiği düşünülmektedir. Yüzeyinden yük kalkan çatal daha hızlı titreşeceğinden frekans yükselmektedir. GA aktivasyonları buhar ve sıvısında 4 farklı sürede bekletilmiştir. Bunlar 15, 30, 60 ve 120 dakikadır.

Bunun yanı sıra anti-TnT immobilizasyonundan önce model protein ile denemeler yapılarak QTF'lerin immobilizasyona karşı gösterdikleri performanslar incelenmiştir. Bulunan veriler aşağıdaki gibidir.

Çizelge 3.20. GA Aktivasyonu sonrası örneklerin sahip olduğu ortalama frekans kayma değerleri (5'er örnek üzerinden alınmıştır.).

	15' Buhar (Hz)	30' Buhar (Hz)	60' Buhar (Hz)	120' Buhar (Hz)	15' Soln. (Hz)	30' Soln. (Hz)	60' Soln. (Hz)	120' Soln. (Hz)
75 w 1' DACH / LF	1.24	-2.30	-3.88	-4.20	0.66	24.29	2.20	10.38
60 w 1' DACH / LF	0.36	-0.96	-1.20	3.60	-1.64	18.52	-3.68	0.36
75 w 5' AMY / RF	-9.07	-6.22	-2.88	-14.47	-8.38	-9.87	-4.44	-7.20
75 w 1' HEP / RF	-9.70	-8.20	-8.10	-4.64	-4.44	-6.86	-11.03	-8.98
90 w 1' DACH / RF	-5.40	-3.36	-7.10	-7.00	-26.90	-8.60	-11.20	-10.30

Bu veriler sonrasında örnekler arasından frekans değişimleri 10 Hz kadar azalan örnekler tekrarlanarak BSA testlerinde denenmek üzere yeniden hazırlanmıştır. Bu örneklerden elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.



Şekil 3.8. Örneklerin FTIR-ATR ile alınmış spektrumları (a) DACH örnekleri (b) AMY örnekleri (c) HEP örnekleri.

FTIR-ATR ölçümlerinde örneklerin GA ile etkileştiği süreler e göre sahip oldukları spektrumda pik yüksekliklerinin (şiddetinin) arttığı görülmektedir. Bununla beraber

C=O bağı 1690-1760 cm⁻¹, N-H bağı 3300-3500 cm⁻¹, C-H bağı 2850-2970 cm⁻¹ de görülebilmektedir. Şekil 3.8 de örneklerin FTIR spektrumları verilmiştir.

Şekillerde de görüldüğü gibi, AMY örneklerinin GA ile etkileşimi 120 dakikalık buhar ve sıvı örnekleri dışında çok etkili değildir. Bununla beraber AMY filmlerinin 15 dakikalık buhar ve sıvı örnekleri dışındaki tüm film örneklerinde C=O bağı veren pikler net olarak görülmektedir. Ayrıca yine 2500 cm⁻¹ den başlayan geniş bantta C-H ve N-H piklerinin birleştiği ve büyük bir eğri oluşturduğu görülmektedir.

Çizelge 3.21. PPF-GA-BSA etkileşimleri frekans kayma değerleri

PPF Şartları	GA şartları	PPF-GA etkileşimi	PPF-0.01ng/ml BSA	PPF-0.05ng/ml BSA
		$\Delta f \pm \sigma$ (Hz)	$\Delta f \pm \sigma$ (Hz)	$\Delta f \pm \sigma$ (Hz)
AMY 75W-5dk	15 dk GA Buhar	-6.3±4.5	14.3±46.6	27.3±39.4
	120 dk GA Buhar	-6.6±10.2	-20.4±17.3	128.1±102.0
	15 dk GA Soln.	-1.7±8.7	128.1±102.0	-
	30 dk GA Soln.	-4.4±6.5	28.4±59.6	119.9±61.9
	120 dk GA Soln.	-4.4±6.3	-2.1±2.5	89.2±35.8
DACH 90W-1dk	120 dk GA Buhar	-4.8±5.3	-4.2±52.1	42.4±27.8
	15 dk GA Soln.	-10.7±15.0	-14.8±20.9	6.0±54.9
	30 dk GA Soln.	-4.6±7.3	17.8±33.7	-
	60 dk GA Soln.	-4.2±8.2	5.3±22.2	-
	120 dk GA Soln.	-5.8±5.6	-9.4±8.0	3.0±10.8
HEP 75W-1dk	15 dk GA Buhar	-8.0±7.0	10.6±7.0	-
	30 dk GA Buhar	-0.8±14.2	-21.9±22.5	72.7±67.4
	60 dk GA Buhar	-3.3±5.3	43.1±13.3	-
	60 dk GA Soln.	-4.7±7.1	22.7±2.6	-

Frekans değişimlerine bakılınca GA ve PPF etkileşimleri başarılı bir şekilde negatif yönde frekans kaymalarına yol açmış, dolayısıyla yüzeylerde çift fonksiyonlu aldehit gruplarının yer aldığı anlaşılmıştır. Bu şekilde hem kütle birikimi hem de yüzey fonksiyonelleşmesi iki ayrı yöntem ile doğrulanmıştır.

Model protein olarak seçilen BSA ile yapılan deneylerde kullanılan tüm BSA derişimlerinde BSA'nın yüzeye bağlandığı ne yüzey analizlerinde kullanılan FTIR-ATR ölçümlerinde ne de kütle hassas ölçümlerin göstergesi olan frekans sapmalarında belirlenememiştir. Hatta frekans sapmalarında görülen pozitif artış yüzeyden kütle kaybında bir göstergesi olmuştur. Amin-aldehit grubu etkileşimini yavaş tepkime kinetiği gösterdiği ile ilgili bilgiler grubumuzda yapılan daha önceki çalışmalarda belirlendiğinden GA-PPF etkileşimi 15 güne kadar uzatılmış,fakat bu etkileşimin QTF yüzeylerinde korozyona sebep olduğu ve kütle kaybının bu örneklerde daha belirgin gözlendiği fark edilmiştir^[53-56].

QTF yüzeyini farklı amin grubu içeren monomerlerle plazma polimerizasyonu yöntemi kullanarak doğrudan modifiye etmek ve ardından TnT takibine yönelik bir biyosensör geliştirmek üzere başlatılan bu araştırma denenen bütün parametrelere karşın kararlı bir biyosensör çevirici yapısı elde edilmesine imkan sağlamamıştır.



4. SONUÇ, ÖNERİLER VE GELECEK ÇALIŞMALAR

Bu tez çalışmasında kütle hassas bir TnT biyosensörünün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda heptilamin, amilamin ve diaminosikloheksan monomerleri değişik güçlerde ve uygulama sürelerinde plazma polimerizasyonu yöntemi ile cam ve QTF örnekler üzerine uygulanmıştır. Bunun sonrasında ince film örnekleri temas açısı ölçümleri, XPS, frekans kaymaları, SEM, FTIR-ATR ile karakterize edilmiştir. PPF yüzeyleri GA ile aktif hale getirilerek protein immobilizasyonu için uygun hale getirilmiştir. Aktif yüzeye model protein olarak BSA bağlanarak, frekans kaymaları takip edilmiştir.

İnce film karakterizasyonlarında filmlerin modifiye edilmemiş camlara göre daha pürüzsüz bir yüzeye sahip olduğu görülmüştür. Bununla beraber temas açısı ölçümleri yüzeyin zamanla sahip olduğu hidrofilik karakteri kaybederek, hidrofobik karaktere doğru yönelimini göstermektedir. Bunun sebebi daha önce de bahsedildiği gibi yüzeyin termodinamik olarak uygun gruplarla yeniden yapılanması ya da oto-oksidasyon olabilir. Ayrıca plazma odacığında kalan oksijenin yüzey üzerinde aşınma yarattığı görülmektedir. Bunların dışında iletkenlik ölçümlerine bakıldığında direncin plazma parametrelerine bağlı olmadığı fakat, artan karbon gruplarının yüzey direncini arttırdığı görülmüştür. Yüzeyin kimyasal analizinde görüldü ki, yüzeyde oksidasyona uğrayan karbon grupları olduğu gibi amin gruplarının varlığı da hem karbon hem de azot ölçümlerinde teyit edilmiştir. Bunun yanı sıra temas açısı ölçümleriyle belirlenen en stabil örnekler QTF'ler üzerinden alınan frekans kayma değerleriyle teyit edilmiş ve RF/LP plazma jeneratörüyle üretilmiş örneklerin LF/LP plazma jeneratörüyle üretilmiş olanlara göre daha stabil olduğu görülmüştür.

GA ile yapılan yüzey aktivasyonunda örnekler farklı sürelerde sıvı ve buhar ortamlarında GA'ye maruz bırakılmıştır. Sonrasında yapılan frekans ölçümlerinde standard bir koşul oluşturulmaya çalışılmış fakat hem model protein testlerinde hem

de GA aktivasyonu için yapılan frekans ölçümlerinde ince filmlerin yüzeye zarar vererek yüzeyden sıyrıldığını yani aslında stabilite konusunda örneklerin zayıf oldukları ve bir biyosensör çalışması için tek basamaklı yapılacak bir plazma polimerizasyon çalışmasının bu tarz platformlar için yeterince kararlı olmadığı görülmüştür.

Bu sebeple yapılabilecek iyileştirmeler şu şekilde olabilir; plazma polimerizasyonundan önce yüzey enerjisinin artırılması bu çalışma için iyileştirici bir adım olabilir. Yüzey enerjisi artırılmış örneklerde plazma polimerizasyonu ile kaplanan ince filmlerin stabilizasyonu filmler yüzeye daha iyi tutunabileceği için uygun olabilir. Bunun yanı sıra amin içerikli monomerler kaplanmadan önce yüzeye düz zincirli ya da halkalı alkan gruplarından oluşan hidrokarbonlar kaplanarak yüzey üzerinde çapraz bağ yoğunluğu yüksek olan bir ince film oluşturulabilir. Bu yoğun çapraz bağ yapısı yüzey yeniden yapılanmasını yavaşlatarak, stabilizasyonu arttıracaktır. Bunu yanı sıra monomerlerin içine karıştırılacak amonyak ile film stabilizasyonu ile beraber amine içeriği de artırılabilir. Ayrıca düz zincirli ya da halkalı alkan gruplarından oluşan hidrokarbonlar ile kaplanan yüzeyler sonrasında amonyak ile tekrar kaplanarak daha stabil yapılar elde edilebilir.

Gelecek çalışmalarda yukarıdaki öneriler ve elde edilen veriler göz önüne alınarak QTF daha iyi bir platform haline getirilebilir. Bunun yanı sıra elde edilen amin bakımından zengin yüzeyler GA aktivasyonu sonrası istenilen protein immobilizasyonu için kullanılabilir.

Bu sonuçların elde edilmesi grubumuzda gerçekleştirilen ve QTF kullanımına yönelik kütle hassas biyosensör çalışmalarında yeni yaklaşımlara yönlendirmiştir. Bu yaklaşımların başında yüzeyin yine plazma polimerizasyonu kullanılarak kararlı alkan yapısındaki hidrokarbonlar ile nanometre kalınlıklarında bir alt film oluşturulması düşünülmüştür. Bu amaçla plazma polimerize hekzan filmler QTF yüzeyinde oluşturulmuş ve üzerine biyosensörü oluşturmak üzere gerekli modifikasyonlar başka bir araştırmacımızın tez çalışması kapsamında yapılmaktadır^[57].

KAYNAKLAR

- [1] **Yoon J-Y.** (2017) *Introduction to Biosensors: From Electric Circuits to Immunosensors* (2nd Ed.) Springer,Switzerland
- [2] **Reed G.W., Rossi J.E., Cannon C.P.** (2017) *Acute Myocardial Infarction* Lancet,Vol.389, pp-197-210
- [3] **MD. Bolooki H.M., MD. Askari A.** (2010) *Acute Myocardial Infarction* **URL-1**
<http://www.clevelandclinicmeded.com/medicalpubs/diseasemanagement/cardiology/acute-myocardial-infarction/> Alındığı tarih: 1.11.2017
- [4] **Doç.Dr. Kayıkçıoğlu M., Dr. Ildızlı M., Yrd.Doç.Dr. Hasdemir C.** (2005) *Acil Servise Göğüs Ağrısı ile Gelen Hastaya Yaklaşım* **URL-2**
http://ichastaliklaridergisi.org/managete/fu_folder/2005-02/html/2005-12-2092-102.htm Alındığı tarih:15.10.2017
- [5] **Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği** (2011) *CK Test Numuneleri* **URL-3**
<http://labtestsonline.org.tr/understanding/analytes/ck/tab/sample/> Alındığı tarih: 2.11.2017
- [6] *Troponin Nedir? Yüksekliği Ne Anlama Gelir?* (2016) **URL 4**
<https://multiyasam.com/troponin-nedir-yuksekligi-ne-anlama-gelir/> Alındığı tarih: 2.11.2017
- [7] **Mattas A.B., Freitas T.A., Silva V.L., Dutra R.F.** (2012) *A dual quartz crystal microbalance for human cardiac troponin T in real time detection* Sensors and Actuators B: Chemical, Elsevier Vol.161 pp.439-446
- [8] **Dutra R.F., Kubota L.T.** (2007) *An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyldextran-modified gold chip* Clinica Chimica Acta, Elsevier Vol.376 pp.114-120
- [9] **MD. Mueller C. Et al.** (2016) *Multicenter Evaluation of a 0-Hour/1-Hour Algorithm in the Diagnosis of Myocardial Infarction With High-Sensitivity Cardiac Troponin-T* Annals of Emergency Medicine, Elsevier Vol.68 No.1 pp76-87.e4
- [10] **Mair J., Artner-Dworzak E., Lechleitner P., Smidt J., Wagner I., Diensti F., Puschendorf B.** (1991) *Cardiac Troponin T in Diagnosis of Acute Myocardial Infarction* Clinical Chemistry Vol.37 No.6 pp.845-852

- [11] *Troponin Testi Ne İşe Yarar?* (2015) **URL 5**
<https://saglikdanisma.net/hastaliklar/kardiyoloji/troponin-testi-ne-ise-yarar.html> Alındığı tarih: 2.11.2017
- [12] **Shruthi, G. S., Amitha, C.V., Blessy, Baby, Mathew** (2014) *Biosensors: A Modern Day Achievement* Journal of Instrumentation Technology, 2 (1), pp 26-39.
- [13] **Arem J.E., Clark D., Smigel B.** (2017) Quartz Value, Prize and Jewelry **URL 6** <https://www.gemsociety.org/article/quartz-jewelry-and-gemstone-information/> Alındığı tarih: 2.11.2017
- [14] *Research Crystals* (2015) **URL 7**
<http://products.inficon.com/en-us/product/detail/p-researchcrystals/>
 Alındığı tarih: 2.11.2017
- [15] **Friedt J.M., Carry É.** (2007) *Introduction to the quartz tuning fork* Am. J. Phys. Vol.75(5) pp.415-422
- [16] *Understanding Quartz Crystals* **URL 8**
<http://www.mtronpti.com/sites/default/files/files/understanding-quartz-crystals.pdf> Alındığı tarih: 2.11.2017
- [17] **Zhang J., O'Shea S.** (2003) *Tuning forks as micromechanical mass sensitive sensors for bio- or liquid detection* Sensors and actuators B:chemical, Elsevier Vol. 94 pp-65-72
- [18] **Thiry, D., Konstantinidis, S., Cornil, J., & Snyders, R.** (2016). *Plasma diagnostics for the low-pressure plasma polymerization process: A critical review*. Thin Solid Films, vol.606, pp. 19-44. doi:10.1016/j.tsf.2016.02.058
- [19] **Yasuda H.** (1985) *Plasma Polymerization*. Academic Press, Orlando
- [20] **Choukourov A., Biederman H., Kholodkov I., Slavinska D., Trchova M., Hollander A.** (2003) *Properties of Amine-Containing Coatings Prepared by Plasma Polymerization* Journal of Applied Science Vol.92 pp.979-990
- [21] **Zajíčková L., Manakhov A., Skládal P., Eliáš M., Nečas D., Čechal J.** (2014) *Plasma Polymerization of Amine-Rich Films Aimed at Their Bioapplications* SCV Bulletin pp.26-29
- [22] **Özkarayel L.** (2013) *Elektromanyetik Spektrum bize ne anlatıyor?* **URL 9**
<http://www.acikbilim.com/2013/11/dosyalar/elektromanyetik-spektrum-bize-ne-anlatiyor.html> Alındığı tarih: 04.11.2017
- [23] **Skoog D.A., Holler F.J., Crouch S.R.** (2007) *Principles of Instrumental Analysis* (6th Ed.)Thompson Brooks/Cole, Belmont,CA. USA.

- [24] Spectro Scientific **URL 10** <https://www.spectrosci.com/product/infracal-2-atr-sp-oil-in-water-analyzer/> Alındığı tarih: 04.11.2017
- [25] **Yükseltürk A.** (2008) *Nano 101- Atomik Kuvvet Mikroskobu* **URL 11** <http://nanoturkiye.blogspot.com.tr/2008/04/nano-101-atomik-kuvvet-mikroskopu.html> Alındığı tarih: 04.11.2017
- [26] **Yılmaz D.** (2013) *Taramalı Elektron Mikroskobu* **URL 12** <https://www.slideshare.net/iuslu/taramal-elektron-mikroskobu> Alındığı tarih: 04.11.2017
- [27] *X-Ray Photoelektron Spectroscopy* (2012) **URL 13** <http://www.npl.co.uk/science-technology/surface-and-nanoanalysis/surface-and-nanoanalysis-basics/introduction-to-xps-x-ray-photoelectron-spectroscopy> Alındığı tarih: 05.11.2017
- [28] **Wen X, Zheng Y, Wu J, Wang LN, Yuan Z, Peng J, Meng H** (2015) *Immobilization of collagen peptide on dialdehyde bacterial cellulose nanofibers via covalent bonds for tissue engineering and regeneration.* Int. J. Nanomedicine Vol.10 pp.4623-4637
- [29] **Koch K., Barthlott W.** (2009) *Superhydrophobic and superhydrophilic plant surfaces: an inspiration for biomimetic materials* Philosophical transactions of the royal society Vol.367 pp.1487-1509
- [30] **Su X., Dai C., Zhang J., O'Shea S. J.** (2002) *Quartz tuning fork biosensor* Biosensors & Bioelectronics Vol.17 pp.111–117
- [31] **Betancor L., L'opez-Gallego F., Hidalgo A., Alonso-Morales N., Mateo G., Lafuente R., Guis'an J. M.** (2006) *Different mechanisms of protein immobilization on glutaraldehyde activated supports: Effect of support activation and immobilization conditions* Enzyme and Microbial Technology vol. 39 pp. 877–882
- [32] **Migneault I., Dartiguenave C., Bertrand M.J., Waldron K.C.** (2004) *Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking.* Biotechniques Vol. 37(5):790-6 pp. 798-802
- [33] **Cunningham B.** (2017)[Illinois] *ECE 416 Surface Functionalization II* **URL 14** <https://nanohub.org/resources/17670/watch?resid=17810> Alındığı tarih : 13.11.2017
- [34] **Friedli G.L.** (1997) *Interaction of SWP With Bovine Serum Albumin (BSA)* **URL 15** <http://www.friedli.com/research/phd/chapter5a.html> Alındığı tarih : 13.11.2017
- [35] **Carter, D. C., Ho, J. X.** (1994). *Structure of Serum Albumin.* Advance Protein Chemistry Vol. 45 pp. 153-203.

- [36] **Miyoglobin** (2017) **URL 16**
<http://labtestsonline.org.tr/understanding/analytes/myoglobin/tab/sample/> Alındığı tarih : 13.11.2017
- [37] **Li Y.** (2006) *Biosensors*, Section 2.3, Chapter 2 Hardware pp. 52-93, CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology.
- [38] **Otles S.** (NA) *Biyosensörün yapısı ve fonksiyonu* **URL 17**
<http://eng.ege.edu.tr/~otles/Biyosensorler/turkce/yapi.html>
Alındığı tarih : 14.11.2017
- [39] **Atmaca G.** (2012) Foton ve Fiziksel Özellikleri **URL 18**
<http://www.kuark.org/2012/08/foton-ve-fiziksel-ozellikleri/>
Alındığı tarih : 14.11.2017
- [40] **Huheey**, pps. A-21 to A-34; T.L. Cottrell, "The Strengths of Chemical Bonds," 2nd ed., Butterworths, London, 1958
- [41] **Darwent B. deB.**, "National Standard Reference Data Series," National Bureau of Standards, Washington, DC, 1970
- [42] **Benson S.W.**, (1965) J. Chem. Educ., vol.42, p.502
- [43] **Granick S.** (1996) Polymer Surface Dynamics, MRS Bull. Vol.21 pp. 33–36.
- [44] **Holly F.J., Refojo M.F.** (1975) *Wettability of hydrogels I. Poly(2-hydroxyethyl methacrylate)*, J. Biomed. Mater. Res. vol. 9 pp. 315–326.
- [45] **Yasuda H., Sharma A.K., Yasuda T.** (1981) *Effect of orientation and mobility of polymer molecules at surfaces on contact angle and its hysteresis*, J. Polym. Sci. Polym. Phys. (Ed. 19) pp. 1285–1291.
- [46] **Gengenbach T.R., Vasic Z.R., Chatelier R.C., Griesser H.J.** (1996) *Concurrent restructuring and oxidation of the surface of n-hexane plasma polymers during aging in air*, Plasmas Polym. Vol.1 pp. 207–228.
- [47] **Gengenbach T.R., Chatelier R.C., Griesser H.J.** (1996) *Characterization of the Ageing of Plasma-deposited Polymer Films: Global Analysis of X-ray Photoelectron Spectroscopy Data*, Surf. Interface Anal. Vol.24 pp.271–281.
- [48] **Gengenbach T.R., Griesser H.J.** (1999) *Aging of 1,3-diaminopropane plasma-deposited polymer films: Mechanisms and reaction pathways*, J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem. Vol.37 pp. 2191–2206.
- [49] **Strobel J.M., Strobel M., Lyons C.S., Dunatov C., Perron S.J.** (1991) *Aging of air-corona-treated polypropylene film*, J. Adhes. Sci. Technol. Vol. 5 pp. 119–130.

- [50] **Shea J.J.** (1999) *The Physics of Polymers-Concepts for Understanding Their Structures and Behavior*, 2nd Edition (book review), IEEE Electr. Insul. Mag. Vol. 15 pp.36–37..
- [51] **Girard-Lauriault P.L., Desjardins P., Unger W.E.S., Lippitz A., Wertheimer M.R.** (2008) *Chemical characterisation of nitrogen-rich plasma-polymer films deposited in dielectric barrier discharges at atmospheric pressure*, Plasma Process. Polym. Vol.5 pp.631–644.
- [52] **Esencan Türkaslan B.** (2006) İletken Polimer-kil Kompozitlerinin Sentezi ve bu Kompozitlerin Adsorpsiyon Özelliklerinin İncelenmesi. *Yüksek Lisans Tezi* Süleyman Demirel Üni., Isparta
- [53] **Çökeliler D, Erkut S, Shard AG, Akdoğan E, Özden N, İmirzaloğlu P, Mutlu M** (2008) A Novel Approach for Improvement of the Interfacial Binding of Ceramics for Dental Materials: Chemical Treatment and Oxygen Plasma Etching, *J Applied Polymer Science*, **110**, 2656-2664
- [54] **Mutlu S, Çökeliler D, Shard A, Göktaş A, Ozansoy B, Mutlu M** (2008) Preparation and Characterisation of ethylenediamine and cysteamine plasma polymerized films on piezoelectric quartz crystal Surfaces for a biosensor, *Thin Solid Films* **516**, 1279-1255
- [55] **Çökeliler D, Erkut S, Zemek J, Biederman H, Mutlu M** (2007) Modification of glass fibers to improve reinforcement: A plasma polymerization technique, *Dental Materials*, **23**, 335-342
- [56] **Çökeliler D, Erkut S, Zemek J, Biederman H, Mutlu M** (2007) Modification of glass fibers to improve reinforcement: A plasma polymerization technique, *Dental Materials*, **23**, 335-342
- [57] **Özgüzar H.F.** (2017) *Biyomedikal Uygulamalara Yönelik Amin Gruplarınca Zengin İnce Filmlerin Kararlılıklarının Geliştirilmesi: Plazma Polimerizasyon Yöntemi ile n-hekzan Alttaş Film Uygulaması* Yüksek Lisans Tezi



ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Pelin KÖMÜRCÜ
Uyruğu : T.C.
Doğum Tarihi ve Yeri : 23.12.1989 / Malatya
E-posta : komurcu.pelin@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

Lisans : 2014, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

Yıl	Yer	Görev
2012	Orta Doğu Teknik Üniversitesi	%50 Harç bursu
2015-2017	TOBB Ekonomi ve Teknoloji Üniversitesi	Burslu Y. Lisans Öğrencisi

YABANCI DİL: İngilizce (Ana dil düzeyinde), Fransızca (Başlangıç düzeyinde), Japonca (Başlangıç düzeyinde)

DiĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Komurcu P.** (2017) Low Cost and Ultrasensitive Troponin-T Detection with Quartz Tuning Fork. NanoTR-13: 13th Nanoscience and Nanotechnology Conference, October 22-25, Antalya, Turkey.
- **Komurcu P.** (2017) Simultaneous Insulation and Modification of Quartz Tuning Fork Surface by Single Step Plasma Polymerization Technique With Amine Rich Precursors, MRS 2017 Fall Meeting, Nov 26-Dec 1, Boston, Massachusetts, USA.
- **Komurcu P., Can E.K., Aydın E., Semiz L., Sankır M., Sankır N.D.,** (2016). Cost-Effective Fabrication of Nanostructured Zinc Oxide Based Electrodes for

Solar Water Splitting. Material Science in Semiconductor Processing, ELSEVIER, Vol. 42, pp. 159-164

- Aydın E., Semiz L., **Komurcu P.**, Sankır D. N. (2016). Copper Indium Sulfide Sensitized Zinc Oxide Nanowire Arrays for Solar Fuel Generation. 2016 MRS Spring Meeting, March 28- April 1, Phoenix, Arizona, USA.
- Sankır D.N., Yolaçan D., **Komurcu P.**, Sankır M. (2016). Enhanced Photoelectrochemical Performance of Nanostructured Zinc Oxide Photoelectrodes via Morphology Control. Prime 2016/ 230th ECS Meeting, Oct 2-7, Honolulu, Hawaii, USA.
- **Komurcu P.**, (2015). Indium Sulfide Sensitized Zinc Oxide Nanowires For Solar Water Splitting. SOLAR TR 3: 3rd Turkish Solar Electricity Conference and Exhibition, April 27-29, Ankara, Turkey.
- **Komurcu P.**, (2015). Cost-Effective Fabrication of Nanostructured Zinc Oxide Based Electrodes for Solar Water Splitting. E-MRS 2015 Spring Meeting, May 11-15, Lille, France.
- **Komurcu P.**, Can E.K., Aydın E., Semiz L., Gurol A.E., Alkan F.M., Sankır M., Sankır N.D., (2015). Pyrolytically Grown Indium Sulfide Sensitized Zinc Oxide Nanowires for Solar Water Splitting. *Phys. Status Solidi C*, WILEY, 12, No.9-11, pp. 1251-1255.