

ÖZET
BİYOBELİRTEÇ TESPİTİNDE KULLANILAN BİR CİHAZ ELDE
ETME YÖNTEMİ

- 5 Buluş, biyobelirteçlerin tespit ve tayininin floresansla güçlendirilmiş ve yüzeye uzaklığı belirlenmiş metamalzeme-tabanlı plazmonik sensörler ile yapılmasını sağlayan taşınabilir bir ölçüm cihazı elde etme yöntemi (100) ile ilgilidir.

İSTEMLER

1. Kan, serum veya idrar şeklindeki biyolojik sıvılardaki hastalık yapıcı biyobelirteçlerin hem klinikte hem de hasta başında floresansla güçlendirilmiş metamalzeme plazmonik sensör kullanarak tespit eden taşınabilir bir ölçüm cihazı elde etmeyi sağlayan;
-optik disk (DVD) yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101),
-aşındırılan yüzeyin kaplanmasıyla metamalzeme plazmonik sensör elde edilmesi (102),
-metamalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) ve
-yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımları ile karakterize edilen bir yöntem (100).
2. Optik disk yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101) adımı, optik disk yüzeyinde bulunan ve istenmeyen plastiklerin bir bistüri aracılığıyla yüzeyden uzaklaştırılması ile karakterize edilen İstem 1'deki gibi bir yöntem (100).
3. Optik disk yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101) adımı, yüzeyin hacimce 1:1 oranında hazırlanan etanol-metanol karışımı ile temizlenmesi ve yüzeyden boya ile istenmeyen katmanların arındırılması ile karakterize edilen İstem 2'deki gibi bir yöntem (100).
4. Optik disk yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101) adımı, hacimce 1:4 oranında hazırlanan aseton-izopropanol karışımının temizlenen yüzeye istenilen periyodik yapı

elde edilene kadar 30-120 saniye uygulanarak kimyasal aşındırma gerçekleştirilmesi ile karakterize edilen İstem 3'teki gibi bir yöntem (100).

- 5
5. Aşındırılan yüzeyin kaplanmasıyla metamalzeme plazmonik sensör elde edilmesi (102) adımımda, aşındırılan yüzeylerin elektron-ışınlı buharlaşma yöntemi kullanılarak sırasıyla 5-15 nm titanyum, 25-50 nm gümüş ve 5-20 nm altın ile kaplanıp metamalzeme plazmonik sensör elde edilmesi ile karakterize edilen yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki gibi bir yöntem (100).
- 10
6. Metamalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) adımımda, metamalzeme sensör yüzeyine mikroakışkan bir çip entegre edilerek yüzeyde mikrokanallar oluşturulması ile karakterize edilen İstem 5'teki gibi bir yöntem (100).
- 15
7. Metamalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) adımımda, oluşturulan mikrokanalların (4-10 mm) x (10-40 mm) x (25-250 µm); en x uzunluk x yükseklik boyutlarında olması ile karakterize edilen İstem 6'daki gibi bir yöntem (100).
- 20
8. Metamalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) adımımda, plazmonik sensörün 10-20 mm x 15-50 mm boyutlarında olması ile karakterize edilen İstem 6'daki gibi bir yöntem (100).
- 25
9. Yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımımda, elde edilen metamalzeme plazmonik sensörün biyobelirteçlere karşı olan hassasiyetini artırmak amacıyla sensör yüzeyine floresans malzemelerin, biyomoleküller aracılığıyla entegre edilmesi ile karakterize edilen yukarıdaki istemlerden herhangi birindeki gibi bir yöntem (100).
- 30

5 **10.** Yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımımda, kullanılan floresans malzemenin, fluoresein izotiyonosiyanat (FITC) olması ile karakterize edilen İstem 9'daki gibi bir yöntem (100).

10 **11.** Yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımımda, floresans malzemenin biyomoleküllere bağlanması için avidin-biyotin etkileşimi kullanılması ve bu etkileşim için avidin-FITC moleküllerinin seçilmesi ile karakterize edilen İstem 10'daki gibi bir yöntem (100).

15 **12.** Yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımımda, floresans malzemenin, metamalzeme plazmonik sensör yüzeyine 6-10 nm mesafe ile uygulanması ile karakterize edilen İstem 11'deki gibi bir yöntem (100).

20

25

30

TARİFNAME
BİYOBELİRTEÇ TESPİTİNDE KULLANILAN BİR CİHAZ ELDE
ETME YÖNTEMİ

5 Teknik Alan

Buluş, biyobelirteçlerin tespit ve tayininin floresansla güçlendirilmiş ve yüzeye uzaklığı belirlenmiş metamateryal-tabanlı plazmonik sensörler ile yapılmasını sağlayan taşınabilir bir ölçüm cihazı elde etme yöntemi ile ilgilidir.

10

Önceki Teknik

Metamateryaller doğal olarak bulunmayan, rasyonel olarak tasarlanmış yapılardır. Bu materyaller uzaysal olarak düzenlenmiş meta-atomlar tarafından ışığı manipüle eden alt dalga boyu kalınlıklarındaki ince plazmonik veya dielektrik materyal katmanları içeren nanoyapılı ara-yüzlerdir. Bu meta-atomlar, faz, genlik ve polarizasyon gibi ışık özelliklerini doğrudan değiştirebilir ve böylece doğal materyallerin fotonik davranışını arttırabilirler. Bu nedenle, metamateryaller düz merceklerde, hologramlarda, görünmez cilt pelerinlerinde ve fotonik cihazlarda kullanılır. Metamateryallerin ışık kontrol kabiliyeti büyük ölçüde tasarlanmış nanoyapılara, özellikle bunların şekline ve materyal bileşimine bağlıdır. Ayrıca, metamateryal-tabanlı plazmonik yüzeyler, klasik yüzey plazmonları (YP) platformlarına göre çeşitli avantajlar sağlar: 1) Hassasiyeti artırmak için elektromanyetik spektrumların ultra-hassaslıkla ayarlanması, 2) üretimde esneklik, 3) sinyal okumada kararlılık, 4) daha düşük radyasyon sönmülmesi ve daha yüksek kalite faktörü ve 5) çoklu rezonanslar oluşturma. Bu materyaller, kolloidal, düzlemsel veya periyodik desenli nanoyapılardan oluşur. Bu yapılar sayesinde alt dalga boyu ölçeklerinde lokal ışık yapılandırmasını sağlar. Örneğin, fotonik ve plazmonik kolloidal partiküllerin birleştirilmesiyle oluşturulan metamateryaller, hücre görüntülenmesine ve hastalık biyobelirteç tayinine olanak vermiştir. Bu birleştirme işlemi sırasında, maalesef nanopartiküller ya optik ya da

fotonik davranışlarını kaybederler. Polimerik malzemeler kullanarak partiküller arasında belli bir uzaklık sağlandığında, metamalzemenin optik özellikleri kararlı kalmasına rağmen bu yapıların uygulanabilirliği hücre görüntüleme ve işaretlemeye sınırlı kalmıştır. Düzlemsel formlarda tasarlanan, hiperbolik metamalzemeler biyo-duyarlılığa karşı yüksek hassasiyet gösterir. Fakat bu yapılar birden fazla, farklı özellikteki malzemenin üst üste kaplanmasını içeren karmaşık, meşakkatli, zaman alan ve pahalı sistemlerle ancak oluşturulur. Bu sistemler, yakın kızılötesi veya kızılötesi dalga boylarındaki ölçümler ile izlenir. Bu nedenle karmaşık ekipmanlar ve uzman bir kişi olmadan hasta-başında uygulanabilirliği düşüktür.

Metamalzeme üretimindeki bu zorlukları aşmak için araştırmacılar halihazırda periyodik desenlere sahip yüzeyleri de kullanmışlardır. En önemli örneklerini doğadaki nanoboyutlu desenlerden alarak, biyo-ilham ve mikrotemas baskılama stratejileriyle üretilen periyodik nanodesenli (örneğin, bal peteği gibi) yapılar yukarıdaki belirtilen üretim sorunlarının bir kısmına çözüm bulmuştur. Ayrıca, biyoyumlu ipek kullanılarak fotonik kristal opalleri ve plazmonik sensörler üretilip, kırılma indisi farkına bağlı değişimlerle biyolojik moleküllerin varlığı tespit edilmiştir. Son zamanlarda optik diskler üzerinde bulunan periyodik nanodesenleri kullanarak araştırmacılar plazmonik yüzeyler üretmeyi başarmışlardır. Kırılma indisi değişimlerinin yanı sıra, bu yüzeylerde biyolojik molekül tespiti de yapılmıştır. Yakın zamanda, Çok Amaçlı Sayısal Disk (Digital Versatile Disc: DVD) tabanlı bir plazmonik yüzeyde biyolojik moleküllerin (proteinler ve virüs partikülleri) tayini yapılmıştır. Fakat, sadece DVD yüzeyleriyle yapılan metamalzeme plazmonik sensörler yeteri kadar hassas ölçümler alınmasına olanak vermemektedir. Bu nedenle, sensör yüzeyi üzerinde hassasiyetin artırılması gerekliliği göze çarpmaktadır. Bu tarz durumlarda, plazmonik yüzeylerde sinyal ve hassasiyetin artırımı için altın nanopartiküller ve floresans yapıda moleküller kullanılır. Özellikle, floroforlar, kuantum noktalar ve nanokristaller uzun süredir biyomoleküler görüntüleme ve sensör teknolojilerinde uygulanır. Örneğin, fotonik malzemeler kullanılarak Förster Rezonans Enerji

Transferi (FRET) ışınlayıcı olmayan dipol-dipol etkileşimleri yoluyla donör partiküllerinden alıcı partiküllere uyarmaların aktarılmasını sağlar. FRET stratejileri renk ayarından, enerji hasatına ve sensörlere kadar çeşitli uygulamalarda yaygın olarak kullanılır. Ancak, daha büyük boyutlarda nanokristaller kullanılsa bile (merkezden merkeze mesafe nedeniyle), FRET verimliliği yaklaşık 10 nm uzunluk ölçeği ile sınırlıdır. Daha uzun mesafelerde (16-20 nm), FRET'in etkisi önemsiz hale gelir. Çünkü FRET etkisi $1/r^6$ oranında düşerek yerini Purcell etkiye ($1/r^3$ oranında) bırakır (r: plazmon-florofor arasındaki ayırma mesafesi). Floroforların plazmonik yüzeylere entegre edilmesi sonucu fotoluminesans etkisi oluşturulur ve böylece donör-alıcı etkileşimlerinin gücü artırılır. Fakat bu ölçümlerin yapılması küçük bir yüzey alanında karmaşık ekipmanlarla olduğundan hasta başı tanı testlerinde kullanılabilecek sensörler değildir. Ek olarak, optik diskler üzerindeki nanoyapılar mikro-temas baskılama yöntemiyle ilkin polidimetilsiloksan (PDMS) damgaya akabinde de polimetilsilsekskuoksan (PMSSQ) malzemesine aktarılarak nanodesenli yapılar oluşturulmuştur. Yüzey duyarlılığının artırılması için nanodesenli yapılarda rastgele oluşan nanoboşluklar üzerine floresans moleküller yerleştğinde sinyalin 69 ila 118 kat daha arttığını tespit etmişlerdir. Fakat bu nanoboşluklar, plazmonik yüzeyler üretilirken tamamen rastgele oluşur ve herhangi bir şekilde bu işlemin kontrolü ve standardizasyonu bulunmaz. Ayrıca, bu periyodik nanoyapılar geniş alanda üretilemez ve belli sayıda kullanımdan sonra PDMS damga üzerindeki nanodesen boyutlarını koruyamazlar. Tüm bunlar bugün uygulanan metamateryallerin, üretim ve yöntem standardizasyonunda temel sorunlara ve akabinde de teknolojik boşluklara sahip olduklarını gösterip, hasta başında kullanılmaya uygun taşınabilir biyobelirteç tespit cihazına ihtiyaç olduğunu açıkça ortaya koymaktadır.

Tekniğin bilinen durumda yer alan W02009021964 sayılı uluslararası patent dokümanında yüzey plazmon rezonansı ve yüzey plazmonla eşleştirilmiş emisyon dahil olmak üzere plazmonik etkilerin bir kombinasyonu yoluyla optik çıktının artırılmasını sağlamak üzere yapılandırılan bir dizi optik elemandan

bahsedilmektedir. Böyle bir optik eleman, süperkritik açı floresan fenomenlerinden yararlanmak için optimize edilmiş konfigürasyonlar tarafından sağlananlar gibi, optik elemana yayılan ışığın açısal dağılımını tercihli olarak ayırt etmek için geometrik olarak konfigüre edilebilmektedir. Bir düzenlemede, bir
5 biyoçipten yüzey tarafından oluşturulan bir flüoresansın yüksek verimli bir toplayıcısına bir plazmonik güçlendirme olgusunun dahil edilmesi, küçük miktarlarda analitin saptanmasında uygulamaya sahip olan yüksek verimli optik elemanlar sağlamaktadır. Sağlanan optik eleman, özellikle biyomedikal teşhis uygulamasında kullanılan hassas bir cihazdır.

10

Buluşun Kısa Açıklaması

Bu buluşun amacı, biyobelirteçlerin tespit ve tayininin floresansla güçlendirilmiş ve yüzeye uzaklığı belirlenmiş metamalzeme-tabanlı plazmonik sensörler ile
15 yapılmasını sağlayan bir ölçüm cihazı elde etme yöntemi gerçekleştirmektir.

Bu buluşun başka bir amacı hem klinikte hem de hasta başında kullanmaya uygun taşınabilir bir ölçüm cihazı gerçekleştirmektir.

20 Bu buluşun bir başka amacı, raflarda kalmış, kullanılmayan ve âtil olarak gözüken optik disklerin üzerinde halihazırda bulunan periyodik nanodesenlerin kullanımıyla metamalzeme elde edilmesini sağlayan bir yöntem gerçekleştirmektir.

25 Bu buluşun bir diğer amacı, plazmonik, fotonik ve mikroakışkan yapıların birleştirilmesiyle ölçüm cihazı elde edilmesini sağlayan bir yöntem gerçekleştirmektir.

Bu buluşun diğer bir amacı, birden fazla biyobelirteci tanıma kapasitesine sahip
30 ölçüm cihazı gerçekleştirmektir.

Bu buluşun diğer bir amacı, düşük maliyetli, kullanımı kolay, yüksek hassasiyetle ölçüm yapabilen ve ölçüm için uzman personel gerektirmeyen bir cihaz elde etme yöntemi gerçekleştirmektir.

5 Buluşun Ayrıntılı Açıklaması

Bu buluşun amacına ulaşmak için gerçekleştirilen “Biyobelirteç Tespitinde Kullanılan Bir Cihaz Elde Etme Yöntemi” ekli şekillerde gösterilmiş olup, bu şekillerden;

10

Şekil 1. Buluş konusu yönteme ait akış şemasıdır.

Şekil 2. Buluşun izdüşümü çizimleri. a) DVD plastik kalıbı ve birden fazla metal kaplaması (Titanyum: 10 nm; Gümüş: 30 nm; Altın: 15 nm) b) 3-MNHS ile elde edilen kısa mesafeli modifikasyon (~4 nm), c) SH-PEG 600-biyotin ile elde edilen orta mesafeli modifikasyon (~6-10 nm), d) SH-PEG 2000-biyotin ile elde edilen uzun mesafeli modifikasyon (~16-20 nm).

Şekil 3. a) DVD plastik kalıbın ve b) bu kalıp üzerine birden fazla metal kaplaması (Titanyum: 10 nm; Gümüş: 30 nm; Altın: 15 nm) ile oluşturulan metalmalzeme plazmonik sensörün AFM ve SEM görüntüleridir.

Şekil 4. Yüzey kimyası uygulamaları (a-b) 3-MNHS ile kısa mesafeli (~4 nm), (c-d) SH-PEG 600-biyotin ile orta mesafeli (~6-10 nm), (e-f) SH-PEG 2000- biyotin ile uzun mesafeli (~16-20 nm) modifikasyonları gösterilmektedir.

Şekil 5. (a) Avidin-FITC ve avidin molekülleri (b) kısa, (c) orta ve (d) uzun mesafeli modifikasyonlara avidin-FITC uygulamasıdır.

Şekil 6. (a-b) Kısa mesafeli modifikasyon üzerine, (c-d) orta mesafeli modifikasyon üzerine ve (e-f) uzun mesafeli modifikasyon üzerine avidin ve avidin-FITC proteinlerinin bağlanması. (g-h) Violin-kutu grafiği ve verinin normalize edilmesiyle (0-1 arasında) tüm modifikasyonların karşılaştırılması gösterilmektedir. Parametrik olmayan Kruskal-Wallis istatistiksel analizi yapılarak veriler incelenmiş ve istatistiksel farklılık, * $p<0.05$ ve ** $p<0.01$ olarak gösterilmiştir.

Şekil 7. Avidin-FITC proteinlerinin yapay idrarda (a-b) SH-PEG 600-biyotin ile modifiye edilen sensör yüzeyi üzerine bağlanması. (c) Son ölçüm analizi yapılarak farklı gliserol çözeltilerinin (%1-%70) plazmonik rezonans değerindeki değişimleri. (d) Modifikasyon yapılan ve yapılmayan sensör üzerine farklı
5 derişimde ve kırılma indisindeki gliserol çözeltilerinin oluşturdıkları etkinin gösterimidir.

Şekil 8. Floresan mikroskobu görüntülemesi. (a) Sırasıyla boş yüzey, avidin-FITC ve yıkama sırasında elde edilen görüntüler. (b) Analiz sonucu oluşan yeşil ışık yoğunluğu karşılaştırılması ve (c) normalize edilen veriler gösterilmektedir.

10

Şekilde yer alan parçalar numaralandırılmış olup, bu numaraların karşılıkları aşağıda verilmiştir:

100. Yöntem

15

Kan, serum veya idrar şeklindeki biyolojik sıvılardaki hastalık yapıcı biyobelirteçlerin hem klinikte hem de hasta başında floresansla güçlendirilmiş metalmalzeme plazmonik sensör kullanarak tespit eden taşınabilir bir ölçüm cihazı elde etmeyi sağlayan buluş konusu yöntem (100);

20

-optik disk (DVD) yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101),

-aşındırılan yüzeyin kaplanmasıyla metalmalzeme plazmonik sensör elde edilmesi (102),

-metalmalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) ve

25

-yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metalmalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımlarını içermektedir.

30

Buluş konusu yöntemin (100) optik disk yüzeyindeki nanoperiyodik yapının açığa çıkarılarak kimyasal aşındırma yapılması (101) adımı, optik disk yüzeyinde bulunan ve istenmeyen plastikler bir bistüri aracılığıyla yüzeyden

uzaklaştırılmaktadır. Ardından yüzey hacimce 1:1 oranında hazırlanan etanol-metanol karışımı ile temizlenmekte ve yüzeyden boya ile istenmeyen katmanlar arındırılmaktadır. Hacimce 1:4 oranında hazırlanan aseton-izopropanol karışımı temizlenen yüzeye istenilen periyodik yapı elde edilene kadar 30-120 saniye uygulanarak kimyasal aşındırma gerçekleştirilmektedir.

Buluş konusu yöntemin (100) aşındırılan yüzeyin kaplanmasıyla metamalzeme plazmonik sensör elde edilmesi (102) adımı, aşındırılan yüzeyler elektron-ışınli buharlaşma yöntemi kullanılarak sırasıyla 5-15 nm titanyum, 25-50 nm gümüş ve 5-20 nm altın ile kaplanıp metamalzeme plazmonik sensör elde edilmektedir.

Buluş konusu yöntemin (100) metamalzeme plazmonik sensör yüzeyinde mikrokanal oluşturulması (103) adımı, metamalzeme sensör yüzeyine mikroakışkan bir çip entegre edilerek yüzeyde istenilen ölçülerde mikrokanallar oluşturulmaktadır. Buluşun bir uygulamasında oluşturulan mikrokanallar (4-10 mm) x (10-40 mm) x (25-250 µm); en x uzunluk x yükseklik boyutlarındadır. Buluşun bir uygulamasında plazmonik sensör (10-20 mm x 15-50 mm) boyutlarındadır.

Buluş konusu yöntemin (100) yüzeyinde mikrokanal oluşturulan metamalzeme plazmonik sensöre kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonların uygulanıp floresans malzeme entegre edilerek biyobelirteç ölçüm cihazı elde edilmesi (104) adımı, elde edilen metamalzeme plazmonik sensörün biyobelirteçlere karşı olan hassasiyetini artırmak amacıyla sensör yüzeyine floresans malzemeler, biyomoleküller aracılığıyla entegre edilmektedir. Buluşun bir uygulamasında kullanılan floresans malzeme, fluoresein izotiyonosiyanat (FITC)' dir. Floresans malzemenin biyomoleküllere bağlanması için avidin-biyotin etkileşimi kullanılmakta olup, bu etkileşim için avidin-FITC molekülleri seçilmektedir. Floresans malzeme, metamalzeme plazmonik sensör yüzeyine 6-10 nm mesafe ile uygulanmaktadır.

Buluş konusu yöntem (100) sayesinde elde edilen taşınabilir ölçüm cihazı; kan, serum veya idrar şeklindeki biyolojik sıvılardaki hastalık yapıcı biyobelirteçlerin hem klinikte hem de hasta başında düşük maliyetle ve yüksek hassasiyetle ölçülmesini sağlamaktadır.

Buluş konusu yöntem (100) sayesinde biyobelirteç tayini yapan ölçüm cihazına ulaşılması için gerçekleştirilen deneysel süreç ve karakterizasyon çalışmaları şu şekildedir: Optik disklerin (DVD) yüzeyinde bulunan nanoperiyodik yapı sensör üretimi için kullanılmaktadır. İlk olarak, DVD yüzeylerdeki periyodik yapının plazmonik etkiyi sağlayabilmesi için organik çözücülerle kimyasal aşındırma işlemi uygulanıp, bir sonraki aşamadaki metal kaplama için yüzeyler hazır hale getirildi. Bu işlem için DVD yüzeyinde bulunan istenmeyen plastikler, bir bistüri aracılığıyla basit bir şekilde yüzeyden uzaklaştırıldı. Akabinde, etanol-metanol (1:1, hacim:hacim) karışımı ile temizlenen bu yüzeylerden ilgili boya ve istenmeyen katmanlar yüzeyden arındırıldı. Literatürde belirtildiği üzere, 1:4 (hacim:hacim) oranında aseton-izopropanol karışımı 60 saniye uygulanarak, aşındırma işlemi gerçekleştirildi. Bu yüzeyler, elektron-ışınli buharlaşma yöntemiyle titanyum (10 nm), gümüş (30 nm) ve altın (15 nm) kaplanıp, metalmalzeme plazmonik sensörler elde edildi.

Sonrasında, daha geniş alanda nanoperiyodik alanın devamlılığını gözlemlemek için taramalı elektron mikroskopisi (Scanning Electron Microscope: SEM) kullanıldı. Bu işlem için 60 saniye kimyasal aşındırmaya maruz bırakılan DVD yüzeyleri ön işleme tabi tutuldu. Yüzeyler ilk önce etanol ile yıkandı ve 5 dakika boyunca sonike edildi. Böylelikle, yüzeyde bulunan yabancı maddeler ortamdan uzaklaştırıldı. DVD yüzeyler polikarbonat yapıda olduğu için bu yüzeylerin SEM cihazında görüntülenebilmesi için iletken bir madde ile kaplanması gerekmektedir. Aksi takdirde, yüzeyde biriken negatif yükler karakterizasyon metodunun doğru bir şekilde gerçekleştirilmesine engel olmaktadır. Bu nedenle, yüzeyler püskürtmeli kaplama (sputter coating) metoduyla altın-paladyum (Au-

Pd) karışımı ile kaplandı. Kaplama işlemi için hassas aşındırma ve kaplama sistemi (Precision Etching and Coating System: PECS) kullanıldı. İşlem sırasında cihaz parametreleri, kaplama özkütlesi (density) 19.32 g/cm^3 ve akustik direnç $23.20 \times 10^5 \text{ gm/cm}^2\text{s}$ (akustik empedans) olacak şekilde ayarlandı. Kaplama işlemi sonucunda oluşan film kalınlığı yaklaşık olarak 10 nm olup nanoperiyodik yapıya herhangi bir zarar vermemektedir. SEM karakterizasyonu sonucunda, nanoperiyodik yapıların geniş alanda devamlılık gösterdiği ve yer yer de kıvrımlı bir ilerleyişin olduğu gözlemlendi. Ayrıca, AFM’de bu DVD yüzeylerin daha küçük boyutta incelendiğinde ise $\sim 740 \text{ nm}$ periyotlarının olduğu hesaplandı (Şekil 3a). Benzer işlemler, metal kaplı metamalzeme plazmonik sensör için de uygulandı (altınpaladyum kaplama hariç). Burada da benzer yapıların kaplama sonrasında da geniş (SEM) ve dar (AFM) alanda devam ettiği ve yüzey periyotunun daha da düzgün olduğunu gözlemlendi (Şekil 3b).

Sonrasında, biyomoleküllerin uygulanması için mikroakışkan bir çip entegre edilerek metamalzeme plazmonik sensör ($15 \text{ mm} \times 15 \text{ mm}$) üzerine mikrokanal ($4.5 \text{ mm} \times 10.2 \text{ mm} \times 50 \text{ }\mu\text{m}$; en $\times$ uzunluk $\times$ yükseklik) oluşturuldu. Üretilen plazmonik metamalzemenin biyobelirteçlere karşı olan hassasiyetini bir adım öteye taşımak amacıyla yüzey üzerine floresans malzemeleri biyomoleküller aracılığıyla entegre edilmesi planlandı. Böylelikle, floresans moleküllerinin yüzeye olan mesafesinin değişmesi sonucunda oluşabilecek özel durumların plazmonik sinyale olan etkisi araştırılmak istendi. Literatürde, plazmonik yüzeyler ile floresans moleküllerinin olası etkileşimleri incelenmiş olup, sonuç olarak iki farklı tipte optik durum öngörülmüştür. İlk durum, floresans moleküllerinin nano-yapılarla kurmuş olduğu ışınımaya bağlı olmayan ısı enerji transferleri ile alakalıdır ve bu etki FRET olarak adlandırılır. FRET etkisi floresans moleküllerinin yüzeye olan uzaklığının yaklaşık 10 nm’nin altında tutunması ile meydana gelir. İkinci durumda ise floresans molekülünün yüzeyden yaklaşık 10 nm’den fazla uzaklaşması, FRET etkisinden kurtulması ve bunun sonucu meydana gelen emisyon sinyalinin artan elektromanyetik alan ile geliştirilmesine dayanır. Bu etki literatürde, Purcell etkisi olarak belirtilir. Yukarıda belirtilen iki optik etki

düşünülerek, çalışmada floresans malzeme olarak fluoresein izotiyonosiyanat (FITC) seçildi. Bu seçimde, emisyon dalga boyu ile plazmonik soğurma dalga boylarının spektrumunda benzer aralıklarda yer almaları etkili olmuştur. Floresans moleküllerinin biyomoleküllere bağlanması avidin-biyotin etkileşimi kullanılmak istenip, avidin-FITC molekülleri kullanıldı. FITC'nin yüzeye olan uzaklığı üç aşamada belirlendi. (1) Kısa mesafeli modifikasyonda sensör ve floroforlar arasındaki asıl mesafeyi sağlayan unsur avidin molekülleri olduğundan, avidinin boyutu belirleyici unsur olmuştur ve literatürde ~4 nm olarak raporlanmıştır. 3-merkaptopropanil- N-hidroksisüksinimidil propiyonat (10 mM) aracı molekülü burada kullanılarak, tiyol gruplarıyla metamalzeme sensörün altın kısmına bağlanma gerçekleşip süksinimit grupları da avidin-FITC moleküllerini bağlamak için kullanıldı. Bu konfigürasyonda, FRET (~4 nm) etkileşimine bakıldı. (2) Orta mesafeli modifikasyon uygulanarak, sensör ve floroforlar arasındaki mesafeyi arttırmak için SH-PEG 600-biyotin (molekül ağırlık: 600 Da) (10 mM) kullanıldı. Bu polimerik molekülün uç kısmındaki tiyol fonksiyonel grubu altın metamalzeme yüzeyle etkileşirken, yüzeye biyotin kısmını sunmaktadır. Daha sonra, avidinfloroforlar sisteme farklı derişimlerde gönderilerek, sensör yüzeyinden belli bir yükseklikte florofor kaplı bir katman oluşturuldu. Literatürde belirtildiği gibi PEG molekülünün uzunluğu sahip olduğu tekrarlı etilen glikol miktarlarıyla ilişkilidir. Etilen glikol sayısı (n), PEG moleküler ağırlığı $(18.02 + (44.05 \times n))$ formülüyle belirlenir. Örneğin, PEG 600'de 13 alt-ünite (etilen glikol) bulunur. Bağların oryantasyonuna bağlı olarak, her bir alt-ünite segmentinin boyu 0.278 nm-0.358 nm arasında değişir. Kullanılan aracı molekül entegre biyotinin avidin ile oluşturduğu kompleks boyutları da 4.2 nm-5.8 nm arasında değişir (Weber vd., 1992; Weber vd., 1989). Böylelikle, SH-PEG 600-biyotin yaklaşık 7.8 nm-10.4 nm boyutlarındadır (tiyol boyutu angstrom seviyesinde olduğundan hesaba katılmamıştır). Bu modifikasyon ile sensör ve floroforlar arasındaki mesafe 6-10 nm olarak ayarlanıp FRET-Purcell arasındaki geçiş izlendi. (3) Uzun mesafeli modifikasyon uygulayarak, daha çok Purcell etkiyi görmek amaçlandı ve (2)'de bahsedilen modifikasyon stratejisi daha uzun bir polimerik molekül olan SH-PEG 2000-biyotin (molekül ağırlık: 2000 Da) (10 mM) ile sağlandı. Yukarıda

hesaplandığı gibi, buradaki aracı molekülün florofora kattığı yükseklik yaklaşık 16.7 nm-21.9 nm arasında olmaktadır. Tüm yüzey kimya stratejileri Şekil 4 ve 5'te gösterilmektedir.

- 5 Kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyon deneyleri başlangıcında ortak olarak öncelikle ölçüm başlangıcında referans hattı oluşturmak adına boş çipten arka fon sinyali (hava) alındı. Sonra, mikroakışkan çipe hortumlarla kararlı bir sinyal değeri elde etmek için sabit hızda (5 μ L/dk) yaklaşık 350 saniye distile su şırınga pompasıyla gönderildi. Distile su ile dengeye gelen sensör yüzeyine avidin
- 10 proteini (kontrol) (100 nM) veya avidin-FITC, 3200 saniye boyunca gönderildi. Sinyal yükselen bir eğilimden dengeli bir yaklaşıma geçtiğinde, çip yüzeyine tutunamayan proteinleri uzaklaştırmak için tekrar su ile 300 saniye boyunca yıkanma işlemi uygulandı (Şekil 6a-f). Kısa, orta ve uzun mesafeli modifikasyonda, avidin protein bağlanması sırasında ortalama 1.23 nm, 0.36 nm
- 15 ve 0.22 nm bir plazmonik rezonans kaymasına neden olurken, avidin-FITC deneylerinde ise bu ortalama değerler 1.04 nm, 1.89 nm ve 0.83 nm olarak hesaplandı (Şekil 6g). Sonrasında, verileri normalize ettiğimizde (0-1) sırasıyla kısa, orta ve uzun modifiye edilmiş yüzeyler de avidin bağlandığı zaman 0.68, 0.20 ve 0.17 olarak hesaplanırken, avidin-FITC deneylerinde bu değerler 0.58,
- 20 0.90 ve 0.47 oldu (Şekil 6h). Ek olarak, her üç deney düzeneğini kendi kontrol gruplarıyla karşılaştırdığımızda, yüzeye yakın bir modifikasyon varlığında aynı derişime sahip avidin-FITC molekülün plazmonik sinyali azalttığını (kısa mesafeli modifikasyonda) ve sensör yüzeyi ile uzak bir mesafede avidin-FITC molekülü plazmonik etkiyi arttırdığı gözlemlendi (orta ve uzun mesafeli
- 25 modifikasyonlarda). Sonuç olarak, kısa mesafede yaklaşık %15 civarında bir sinyal kaybından (FRET etki), orta ve uzun mesafeli modifikasyonlarda ise yaklaşık sırasıyla 4.5 ve 2.8 kat sinyal artırımı (Purcell) gözlemlendi. Bu sonuçlar ışığında uygulamaya yönelik olarak, eğer yüzey kimyası sensöre yakın bir şekilde (~4 nm) yapılacaksa floresans molekülün sinyali azaltacağını ve eğer floresans bir
- 30 molekül kullanılıyorsa orta mesafeli yüzey modifikasyonun yapılmasının daha verimli olacağını göstermektedir.

Biyolojik sıvılar (örneğin, kan, serum veya idrar), su ve/veya fosfat tampon çözeltisiyle (PBS) karşılaştırıldıklarında hem yoğunlukları hem de içerikleri (iyonik güç, iyonik yük ve protein/şeker içerikleri) bakımından büyük farklılıklar göstermektedir. Geliştirdiğimiz sensörün performansını ve hastalık belirteçlerine özgüllüğünü anlamak adına ilkin su ortamını değiştirerek, yapay idrar örnekleri içerisinde 100 nM avidin-FITC olacak şekilde test sıvıları hazırlandı ve aynı sistem SH-PEG 600-biyotin içeren yüzeyler üzerinde denendi. Bu deney düzeneğinde yaklaşık 2.54 nm plazmonik rezonans kayması gözlemlendi (Şekil 7a-b).

10 Kontrol olarak ise iki farklı deney seti düzenlendi: (1) avidin-FITC içermeyen yapay idrar ve (2) 100 nM sığır serum albümin (BSA) sisteme verildi (Şekil 7b). Bu iki kontrolde, su ile alınan başlangıç verisi, kırılma indisi farklı olan yapay idrar verildikten sonra belli bir süre arttı ve sonra sabitlendi (Şekil 7b). Su ile yıkama yapıldıktan sonra başlangıç noktasına (su verisiyle aynı seviyeye) düşen sinyal, yüzeyde herhangi bir plazmonik rezonans kaymasına neden olmadı (Şekil 7b). Ayrıca, SH-PEG 600-biyotin modifiye yüzeylerde (Avidin FITC bağlanmasından sonra) farklı gliserol derişimleri uygulanarak (%1-%70), geliştirilen sensörün kırılma indisi değişimlerine hassasiyetine bakıldı ve herhangi bir modifikasyon yapılmamış sensör ile karşılaştırıldı (Şekil 7c-d). Gözlemlenen sonuçlarda, kırılma indisi değişimlerinde modifikasyonu ve modifikasyonsuz sensörler benzer sonuçlar gösterdi (Şekil 7c-d). Şekil 6 ve 7'daki sonuçları beraber incelediğimizde, yüzeye bağlanan avidin-FITC molekülünün yüzeyden belli bir uzaklıkta yerleştirildiğinde daha fazla plazmonik rezonans kaymasına neden olduğu ve modifikasyon olmayan sensörlerle de kırılma indisi açısından benzer sonuçlar ortaya koyması, bu yapının bağlanma hassasiyetini arttırdığını bize sundu.

Sonraki adımda, sensör hassasiyet performansı ölçümü yapıldı. Sıvılardaki kırılma indisindeki değişime bağlı olan sensör sinyal değişimleri incelenerek, sensörün kırılma indisi duyarlılığı ve liyakat rakamı (figure-of-merit: FOM) hesaplamaları yapıldı. Şekil 7'te gösterilen gliserol deneylerinde (%1-%70, hacim:hacim),

rezonans dalga boyu değerlerinde gözlemlenen kaymaların büyüklüğü kırılma indisindeki değişime bölünerek kırılma indisi duyarlılığı 338.5 nm/kırılma indisi olarak hesaplandı. Ayrıca, FOM ise kırılma indisinin yarı maksimumda tam genişlik (full width at half maximum: FWHM) değerlerine bölünmesiyle hesaplandı. Hassasiyet performansı ölçümünde kullanılan değerler Tablo 1’de özetlendi.

Tablo 1. Sensör performansı parametreleri. Gliserol derişimleri, kırılma indisi (RIU), yarı maksimumda tam genişlik (FWHM) ve liyakat rakamı (FOM).

10

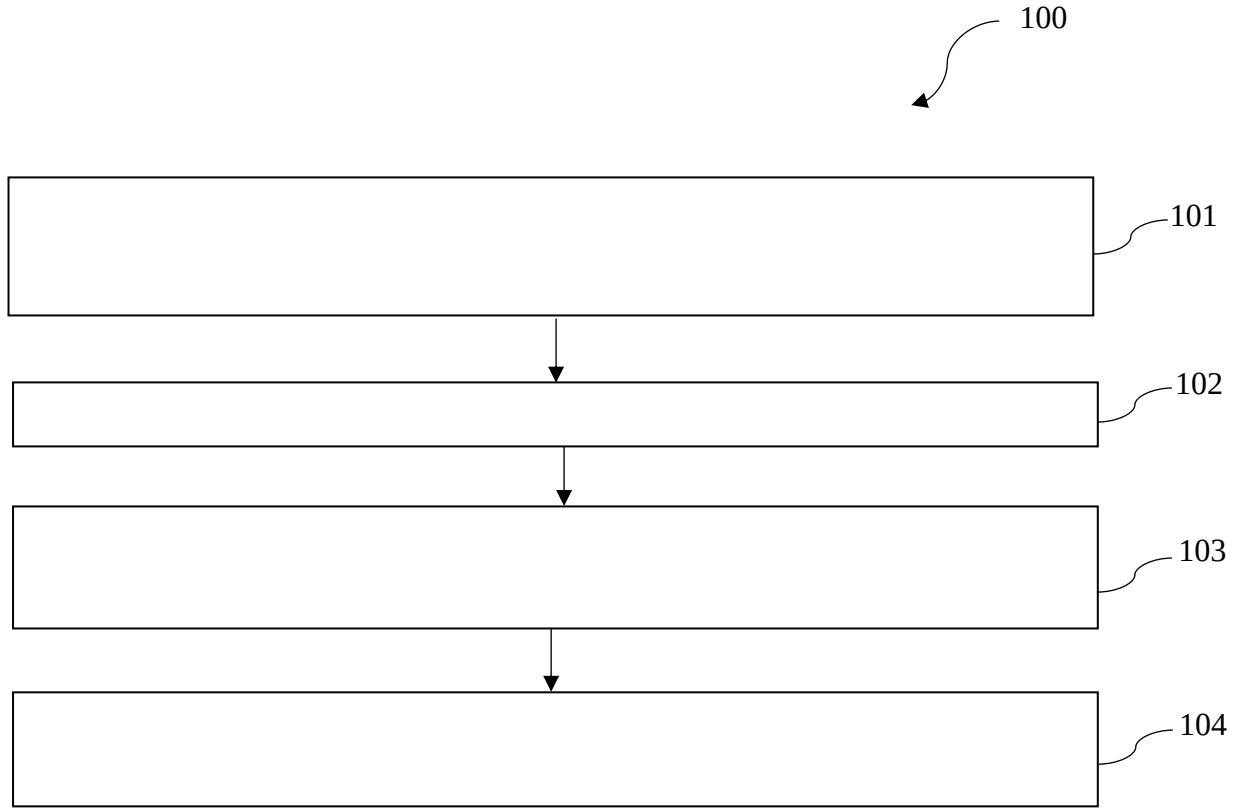
Gliserol Derişimi (%)	Kırılma İndisi (RIU)	FWHM (nm)	FOM (1/RIU)
0	1.33303	20.76071	16.30358
1	1.33416	20.65546	16.38666
2.5	1.33588	20.63678	16.40149
5	1.3388	20.02716	16.90075
10	1.34481	19.51936	17.34042
20	1.35749	18.48498	18.31076
30	1.3707	18.13052	18.66874
40	1.38413	17.55106	19.2851
50	1.39809	16.67466	20.2987
60	1.41299	16.5729	20.42334
70	1.42789	16.2797	20.79117

Ayrıca, orta mesafeli yüzey modifikasyonu (SH-PEG 600-biyotin) bulunan yüzeylerde, avidin-FITC proteini bağlanması öncesindeki boş yüzeyden (i), protein bağlanmış yüzeyden (ii) ve yıkama sonrası oluşan yüzeyden (iii) dikey ışık mikroskobu vasıtasıyla görüntüler alındı (Şekil 8a). Fiji-ImageJ (NIH) açık kaynak uygulaması kullanılarak, yukarıda bahsedilen 3 durum için alınan

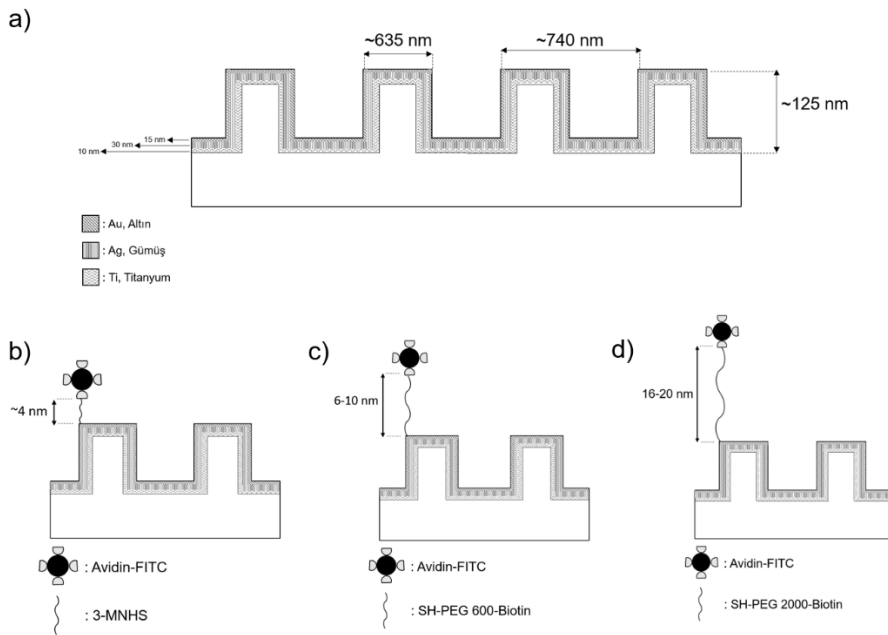
görüntüler üzerinden yeşil ışık yoğunluğu analizi yapıldı (Şekil 8b). Yeşil renk yoğunluğunun, avidin-FITC proteini bağlanmış yüzeyde en fazla olduğu, boş yüzeyde ise en düşük olduğu saptandı. Yeşil ışık yoğunluğu verileri normalize edildiğinde (0-1) sırasıyla 0.15, 0.84 ve 0.51 olarak hesaplandı (Şekil 8c). Yüzeye
5 bağlanan avidin-FITC proteinin yıkama sonrasında yüzeyde yaklaşık %60 oranında kaldığı ve parlaklığını koruduğu gözlemlendi.

Bu temel kavramlar etrafında, buluş konusu “Biyobelirteç Tespitinde Kullanılan Bir Cihaz Elde Etme Yöntemi (100)” için çok çeşitli uygulamaların geliştirilmesi
10 mümkün olup, buluş burada açıklanan örneklerle sınırlandırılmaz, esas olarak istemlerde belirtildiği gibidir.

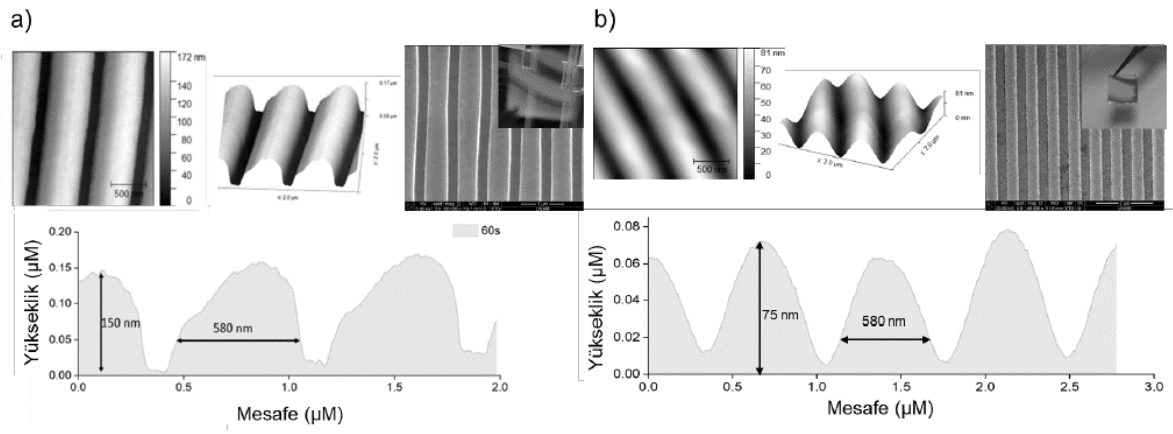
Şekil 1



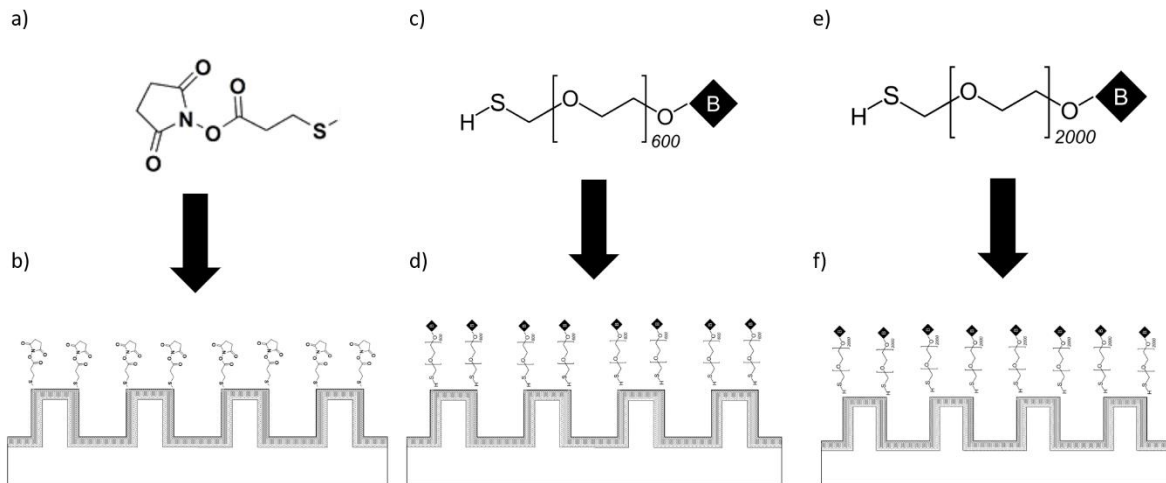
Şekil 2



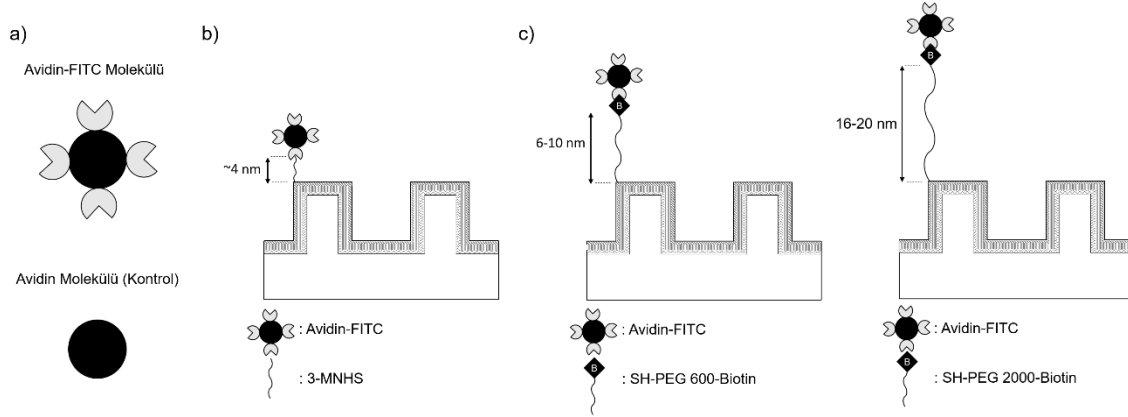
Şekil 3



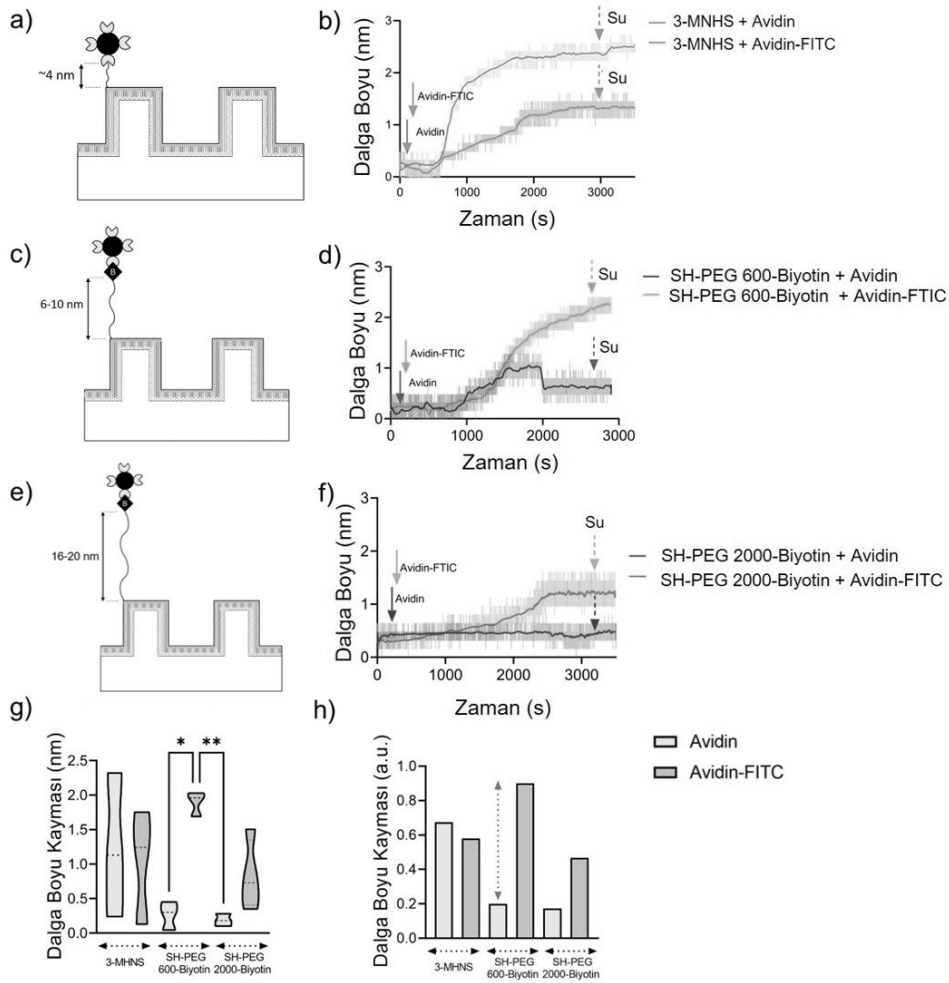
Şekil 4



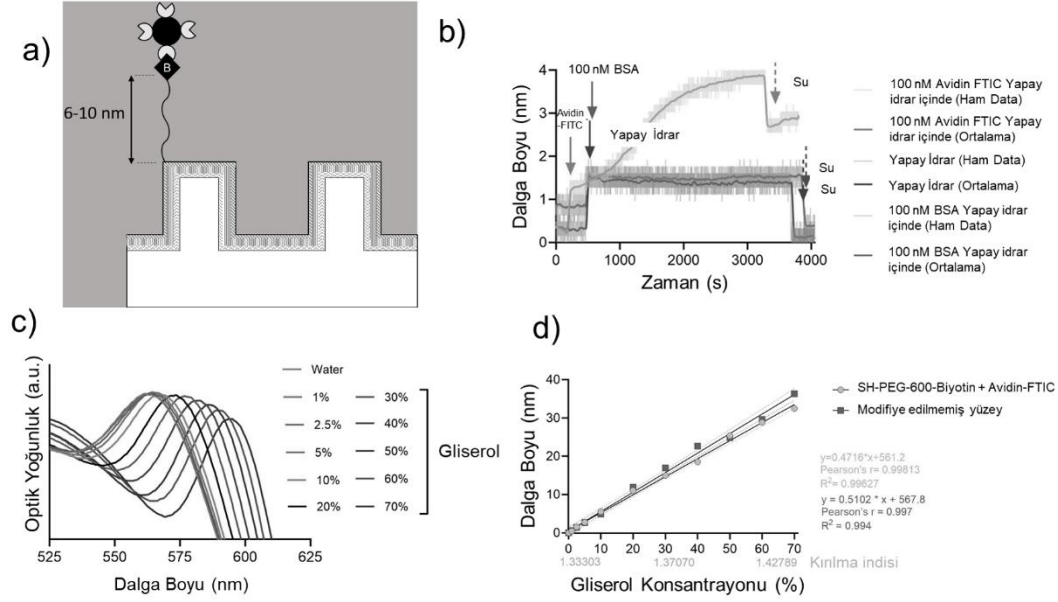
Şekil 5



Şekil 6



Şekil 7



Şekil 8

