Çevrelenmiş Geometrilerde Tek Moleküllerin İzlenmesi

Proje No: 107T211

Yrd. Doç. Dr. Alper KİRAZ
Prof. Dr. Levent DEMİREL

TEMMUZ 2009
İSTANBUL

Önsöz

Bu raporda TÜBİTAK tarafından desteklenen 107T211 numaralı araştırma projesinden elde edilen sonuçlar özetlenmektedir. Proje kapsamında diblok kopolimer ince filmelerdeki nanometrik kanallarda tek terilen moleküllerinin yayınımı tek molekül izleme tekniğiyle incelenmiş ve kanallar içerisinde normal ve akış içeren yayınım gösterilmiştir.

İçindekiler

1. Giriş 8
2. Deneysel Düzenek ve Örnek Hazırlığı 9
2.1. Kurulan Teçhizat ve Deneysel Düzeneğin Tanıtımı 9
2.2. Tek Moleküllerin Tümüyle Sönmesi ve Yanıp Sönmesinin Fotofiziksel Karakterizasyonu 11
2.3. Histogram Analizi 12
2.4.PB-PEO Sisteminden İnce Film Üretiminin Optimize Edilmesi 13
3. Tek Molekül Yörünge Analizi ve Kalibrasyon Deneyleri 16
3.1. Mekansal duyarlılık kalibrasyonu deneyleri 16
3.2. Açı Analizi 19
3.3. Ortalama Karesel Yer Değişim (OKY) Analizi 19
3.4. Tek Molekül Yörünge Analizinde Kullanılan MATLAB Programı 20
4. Deneysel Sonuçlar 21
5. Sonuç 24
Referanslar 25
EK-1 Projede Kullanılan MATLAB Programları 26
KUNRL_trajectory_analyze.m 26
Gaussian2D.m 27
fitgaussian1D.m 28
TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU 29

Şekiller Listesi

Şekil 2.1.1 (a) Spin kaplama aygıtı (b) Azot gazı ve vakum pompası sistemi ile kurulumu tamamlanmış spin kaplama aygıtı (c) Vakumlu fırın (d) UV sterilizasyon aleti (d) buzdolabı..... 9
Şekil 2.1.2 (a) Optik deney düzeneği çizimi (b) Ters geometride bulunan mikroskop, uyarıcı laserin izlediği optik yol (beyaz renk ike gösterilmektedir) ve hassas kameranın içinde bulunduğu karanlık kutu (c) Hassas CCD kamera ve teleskop düzeneği (d) Hassas CCD kamera kontrol ünitesi (e) Hassas CCD kamera su soğutma sistemi..... 10
Şekil 2.2.2. 3mL'lik 3mg/mL PMMA çözeltisi içerisine 0,2 nM Rhodamine B çözeltisinden 1 damla damlatılarak hazırlanan yüzeyden tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak tek moleküllerden gelen floresans sinyallerin zamana bağlı değişimleri incelendi. Görüntü kaydı için 0.1 saniye ışınlama zamanı kullanıldı. Şekil 4'deki sonuçtan farklı olarak bu incelemede tek moleküllerin yanıp sönme hareketleri incelendi. Alınan görüntü kaydında yanıp sönme hareketini gösteren tek molekülden toplana ışıma şiddetinin zamana göre değişimi yukarıda gösterilmektedir. Zamana bağlı olarak floresans sinyal şiddetinde ani artma ve azalmalar görülmektedir. Bu bize tek moleküllerin karakteristik yanıp sönme fenomenini gözlediğimizi göstermektedir. Ancak, kullanılan sistemin ışınlama zamanı (exposure time) yetisi istenilen seviyelerde olmadığı için tek moleküllerin bu karakteristik özelliği tam olarak çözümlenememiştir. Şekil içerisinde ani artma ve azalmanın gözlemlendiği bir zaman aralığı için görüntüler gösterilmektedir..... 12
Şekil 2.4.1. (a) Kullanılan PB-PEO diblok-kopolimerin molekül formülü, oluşması beklenen yapının temsili resmi ve terilen molekülünün çizimi. (b,c) Optimize edilmiş örnek hazırlanma yöntemi kullanılarak hazırlanmış PB-PEO ince filminin AKM faz görüntüleri..... 13
Şekil 2.4.2. Cam alttaş üzerinde hazırlanan PB-PEO diblok-kopolimer örneğinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. 14
Şekil 2.4.3. Silikon alttaş üzerinde hazırlanan PB-PEO diblok-kopolimer örneğinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri. 15
Şekil 3.1.1 – 3mg/mL PMMA çözeltisi içerisine 0.2 nM Rhodamine B çözeltisinden 1 damla damlatılarak çözeltinin spin kaplama tekniği ile lamel üzerine kaplanması ile örnek hazırlandı. Daha sonra tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak tek moleküller uyarıldı ve saniyede iki görüntü alınarak video kaydedildi. Bu sırada piezoelektrik hareket sehpası alınan her 10 görüntüden sonra 20 nm adımlarla hareket ettirildi. Tek moleküllerden gelen floresans sinyallerden bir tanesi geliştirilen Labview programı kullanılarak 12 piksel x 12 piksellik alan içerisinde seçildikten sonra her yarım saniyelik basamaktaki hareketi program sayesinde algılandı ve zamana bağımlı olarak çizildi. Sonuç olarak 20 nm'lik adımlar çizilen grafik üzerinde yaklaşık 20'şer nm'lik artan basamaklar olarak gözlendi. Bu deneyin sayısal istatistiksel analizi yapıldı ve adımların istatistiksel dağılımı çizildi. Yapılan hesaplamalarda elde edilen ortalama adım mesafesinin 21.83 nm ve standart sapmanın 1.48 nm olduğu gözlendi..... 17
Şekil 3.1.2 – Şekil 2'de bahsedilen gözlem aynı örnek kullanılarak 15 nm'lik adımlar için tekrarlandı. Spin kaplama tekniği ile hazırlanan örnek içerisindeki Rhodamine B molekülleri tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak 532 nm'lik lazerle uyarıldı. Saniyede iki görüntü alınarak video kaydedilirken piezoelektrik hareket sehpası alınan her 10 görüntüden sonra 15 nm adımlarla hareket ettirildi. Tek moleküllerden gelen floresans sinyallerden bir tanesi geliştirilen Labview programı kullanılarak 12 piksel x 12 piksellik alan içerisinde seçildikten sonra her yarım saniyelik basamaktaki hareketi program sayesinde algılandı ve zamana bağımlı olarak çizildi. Sonuç olarak 15 nm'lik adımlar çizilen grafik üzerinde yaklaşık 15'er nm'lik artan basamaklar olarak gözlendi. Bu deneyin sayısal istatistiksel analizi yapıldığında ortalama adım mesafesinin 17.32 nm ve standart sapmanın 1.98 nm olduğu hesaplandı 17
Şekil 3.1.3 – Labview programlama dili kullanılarak geliştirilen parçacık izleme programının görüntüleri. Programın ön paneli (a) ve blok şeması (b) gösterilmektedir..... 18
Şekil 3.2.1. Açı analizinde hesaplanan açının (α) temsili gösterimi..... 19
Şekil 4.1. Glükoz / su çözeltisinde yayınım gösteren tek Rhodamine B molekülünün izlediği yörünge ve bu yörüngenin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları..... 21
Şekil 4.2. PB-PEO içinde yayınım gösteren 4 adet tek terilen molekülünün izledikleri yörüngeler ve bu yörüngelerin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları..... 21
Şekil 4.3. PB-PEO içinde yayınım gösteren 2 adet tek terilen molekülünün izledikleri yörüngeler ve bu yörüngelerin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları..... 22
Şekil 4.4. PB-PEO sistemi içerisinde normal yayınım ve akışın bir arada gözlendiği üç terilen molekülünün yörüngeleri ile yörüngeler kullanılarak yapılan ortalama kare yer değişim ve açı analizleri sonuçları. 22

Şekil 4.5. Terilen moleküllerinin 1 boyutlu PB kanallarında ve 2 boyutlu PB tabakalarında yayınım sabitlerinin normalize edilmiş histogramı. 1 ve 2 boyutta yayınım sabitleri OKY eğrilerinin $OKY(\tau) = 2D\tau$ ve $OKY(\tau) = 4D\tau$ formüllerine benzeştirilmesi ile elede edilmiştir..... 23

Özet

Bu TÜBİTAK 1001 projesi kapsamında tek terilen moleküllerinin bir asimetrik diblok kopolimer (poly(butadiene)-poly(ethylene oxide), PB-PEO) ince filmde bulunan çevrelenmiş kanallardaki hareketi tek molekül izleme tekniği ile incelendi. Önce, polimer ince filmlerde sabitlenmiş terilen veya Rhodamine B molekülleri ile kalibrasyon deneyleri yapıldı. Bu deneylerde bir piezoelektrik hareket sehpasının attığı 20-25 nm'lik adımlar tek molekül görüntüleri ile izlendi. Adım mesafesi yaklaşık 1.5 nm'lik doğruluk ile belirlendi. Daha sonra diblok kopolimer ince film örneklerin hazırlanması için kullanılan yöntemler (spin kaplama ve tavlama) optimize edildi. İnce filmlerde bir boyutlu kanalların oluşumu atomik kuvvet mikroskobu (AKM) faz görüntüleri ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri ile teyit edildi.

Daha sonra tek terilen moleküllerinin PB-PEO diblok kopolimer ince filmlerdeki çevrelenmiş PB kanallarında bir boyutlu yayınımı deneysel olarak gözlendi. Tek molekül yörüngelerinde gözlenen paralel ve eğik kanalların AKM ve TEM görüntüleri ile uyumlu olduğu gözlendi. Tek molekül yörüngelerinin analizi sonucu terilen moleküllerinin bir boyutlu yayınım sabitlerinin iki boyutlu yayınım sabitlerine göre oldukça küçük olduğu ve geniş bir dağılıma sahip olduğu ortaya çıktı. Bazı moleküllerin yönlü hareket ettikleri ortalama karesel yer değişimi fonksiyonunun gecikme zamanına ile parabolik bir ilişki içinde olmasıyla görüldü. Bu davranış muhtemelen PB kanallarının genişliğinde ve yoğunluktaki lokal değişiklerden kaynaklandı. Proje süresince elde edilen sonuçlar kanalların heterojenliklerinin tek moleküllerin hareketine etkilerini gösterdi. Elde edilen sonuçlar tek molekül izleme tekniğinin beraberinde getirdiği hassasiyetin kendinden oluşan blok kopolimer morfolojilerin incelenmesinde kullanımının dünya literatüründe ilk gösterimi oldu.

Projeden elde edilen sonuçlar ile Koç Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Mühendisliği programında bir yüksek lisans çalışması tamamlandı, Journal of Physical Chemistry B dergisinde 1 yayın ve uluslararası ve ulusal konferenslarda 6 sunum yapıldı.

Anahtar Kelimeler

Tek molekül izleme, içten tam yansımalı flöresans mikroskopi, diblok-kopolimer, terilen, flöresans görüntüleme

Abstract

In this TÜBİTAK 1001 project, the motion of single terrylene molecules has been investigated in confined channels of an asymmetric diblock copolymer (poly(butadiene)-poly(ethylene oxide), PB-PEO) by single molecule tracing. First, calibration measurements have been performed using single terrylene and Rhodamine B molecules stabilized in polymer thin films. In these measurements a piezoelectric translation stage was moved with 20-25 nm steps. The accuracy in determining the steps by using the single molecule images was shown to be ~1.5 nm. Sample preparation of the diblock copolymer thin films that involves spin coating and annealing has been optimized. One dimensional channel formation has been confirmed using atomic force microscope (AFM) phase images and scanning electron microscope (SEM) images.

One dimensional diffusion of single terrylene molecules in confined PB channels of PB-PEO diblock copolymer thin films were then observed by single molecule tracing. Parallel and curved channels observed in single molecule trajectories greatly resembled those observed in AFM and SEM images. Analyses perfomed on single molecule trajectories showed that the one-dimensional diffusion coefficients were significantly smaller and had a narrower distribution compared to two-dimensional diffusion coefficients of terrylene molecules in PB. The trajectories of some single molecules also showed unusual behavior of directed motion where mean square displacement had a parabolic dependence on lag time. The likely origin of this behavior was the local variations in the PB channel width and the resulting change in the local density. The results obtained during the course of this project showed the effect of nonuniformities and heterogeneities in the channels on the motion of single molecules. To the best of our knowledge, these have been the first demonstrations using the high sensitivity of single molecule tracing in characterizing self-assembled block copolymer morphologies.

The results obtained from this project have been the subject of an M.S. thesis in Materials Science and Engineering at Koç University. The results have been published as 1 journal paper in the Journal of Physical Chemistry B, and they have been presented in 6 international/national conferences.

Keywords
Single molecule tracing, total internal reflection fluorescence microscopy, diblock copolymer, terrylene, fluorescence imaging

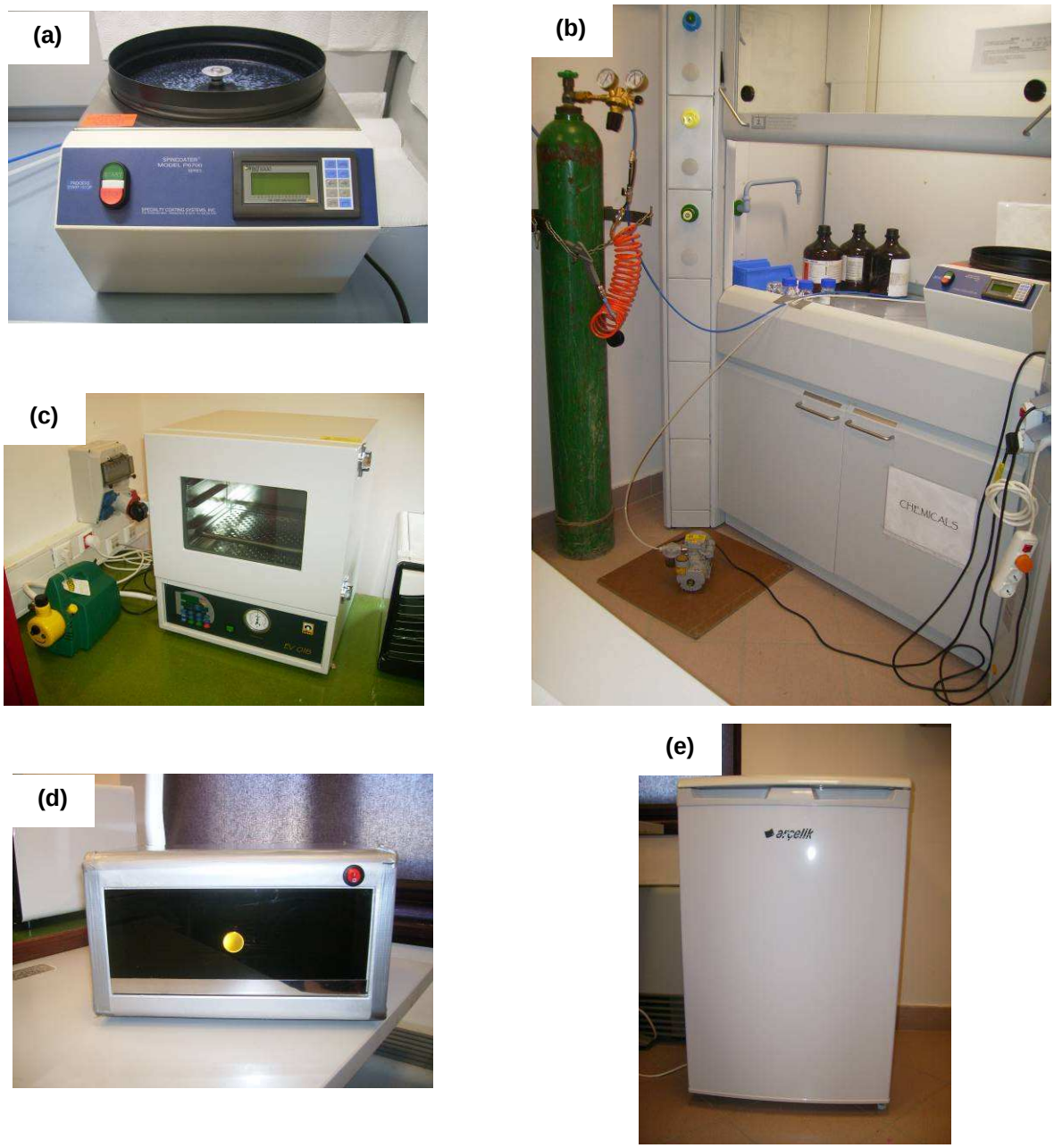
1. Giriş

Proje kapsamında literatürde ilk defa tek molekül izleme tekniği ile diblok kopolimer bir malzemede bulunan çevrelenmiş kanallarda tek moleküllerin hareketleri incelendi. Tek terilen moleküllerinin görüntüleri içten tam yansımalı flöresans görüntüleme tekniğiyle izlendi. Çevrelenmiş kanallar poly(butadiene)-poly(ethylene oxide) (PB-PEO) diblok kopolimer malzemenin bir lamel üzerine spin kaplama yöntemi ile kaplanması ile elde edildi. Kanal oluşumunun sağlanması için örnekler tavlandı. Oluşan kanallar atomik kuvvet mikroskobu (AKM) faz görüntüleri ve taramalı elektron mikroskobu (TEM) görüntüleri ile teyid edildi. Çevrelenmiş kanallar içinde hareket eden tek moleküllerin yörüngelerinde paralel ve eğri kanal morfolojileri gözlendi. Yörüngeler üzerinde yapılan açı analizi bir boyutta yayınımı doğruladı, ortalama karesel yer değişimi (OKY) analizi ise tek moleküllerin yayınım sabitlerinin ölçülmesini sağladı. Ölçülen yayınım sabitleri iki boyutta yayınım yapan tek moleküllerin yayınım sabitleri ile karşılaştırıldı. Projede elde edilen sonuçlar Journal of Physical Chemistry B dergisinde yayınlandı ve uluslararası ve ulusal konferenslarda 6 sunum yapıldı.

Proje sonuç raporu önceki paragrafta özetlenen ilerlemeleri içermektedir. Sonuç raporunun ikinci bölümünde kurulan deneysel düzenek tanıtılmakta ve optimize edilen örnek hazırlama adımları açıklanmaktadır. Optik düzeneğin tek molekül görüntüleme hassasiyetine ulaştığı bu bölümde gösterilmektedir. Çevrelenmiş kanalların teyid edildiği AKM faz görüntüleri ve TEM görüntüleri de bu bölümde verilmektedir. Üçüncü bölümde tek molekül izleme tekniği ile gerçekleştirilen kalibrasyon deneyleri açıklanmaktadır. Bu sonuçlar hedeflenen 1.5 nm'lik lokalizasyon doğruluğuna ulaşıldığını göstermektedir. Deneysel sonuçlar dördüncü bölümde verilmektedir. Tek terilen moleküllerinin çevrelenmiş kanallarda hareketi, açı ve OKY analizi sonuçları bu bölümde sunulmakta ve tartışılmaktadır. Beşinci bölümde projede elde edilen sonuçlar özetlenmektedir.

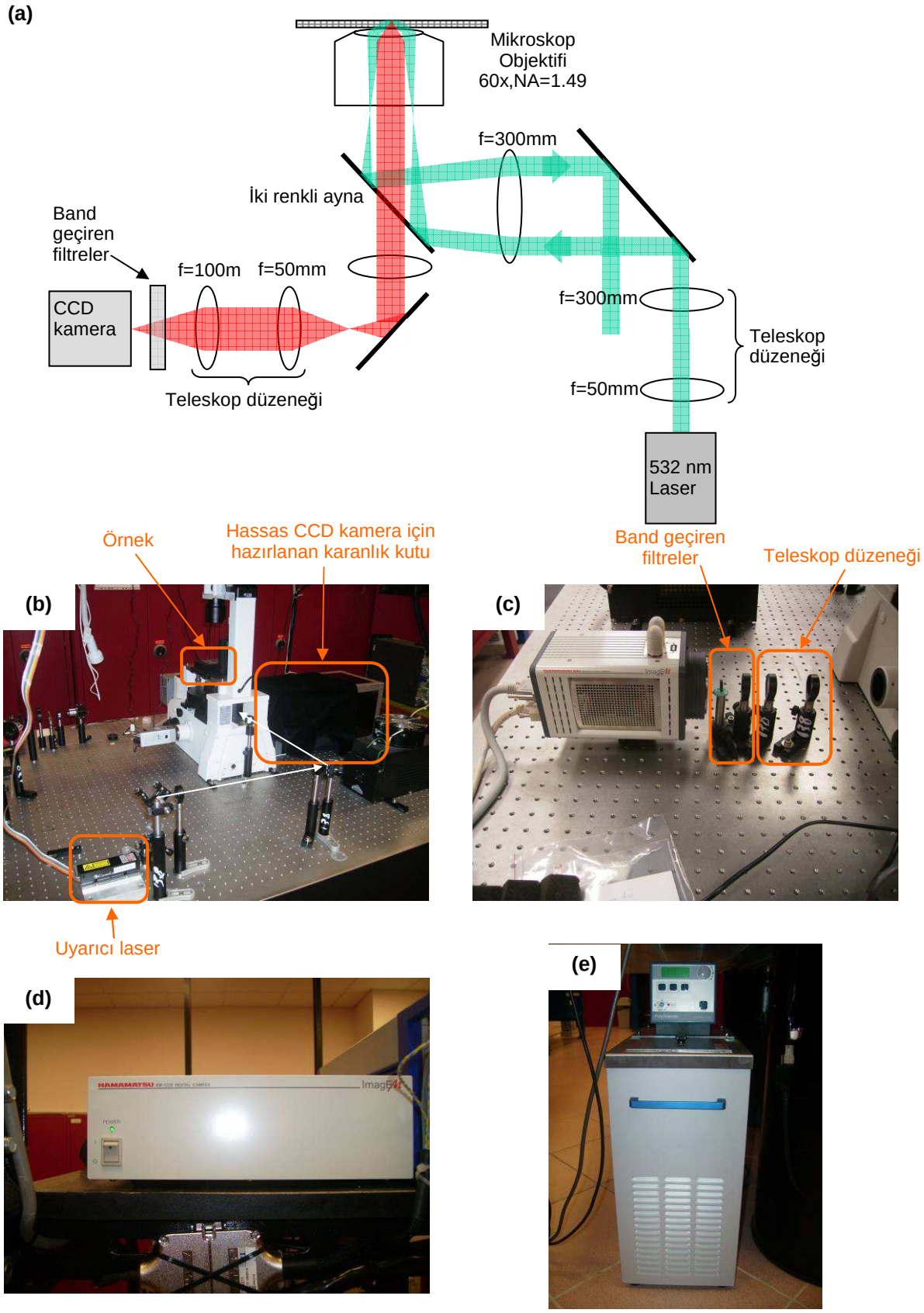
2. Deneysel Düzenek ve Örnek Hazırlığı

2.1. Kurulan Teçhizat ve Deneysel Düzeneğin Tanıtımı



Şekil 2.1.1 (a) Spin kaplama aygıtı (b) Azot gazı ve vakum pompası sistemi ile kurulumu tamamlanmış spin kaplama aygıtı (c) Vakumlu fırın (d) UV sterilizasyon aleti (d) buzdolabı.

Projede örnek saklanması ve hazırlığında kullanılan alımı ve kurulumu yapılan teçhizat Şekil 2.1.1'de gösterilmektedir. Teçhizat hassas CCD kamera, spin kaplama aygıtı, vakumlu fırın, UV sterilizasyon cihazı ve mini buzdolabını içermektedir.

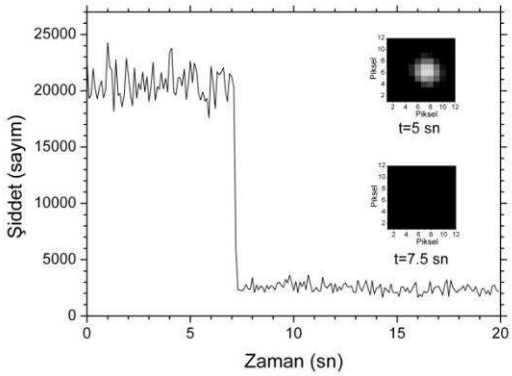


Şekil 2.1.2 (a) Optik deney düzeneği çizimi (b) Ters geometride bulunan mikroskop, uyarıcı laserin izlediği optik yol (beyaz renk ile gösterilmektedir) ve hassas kameranın içinde bulunduğu karanlık kutu (c) Hassas CCD kamera ve teleskop düzeneği (d) Hassas CCD kamera kontrol ünitesi (e) Hassas CCD kamera su soğutma sistemi.

Optik deneyler için kurulan optik deney düzeneği Şekil 2.1.2'de gösterilmektedir. Deney düzeneğinde uyarıcı laser ışığının çapı bir teleskop ile büyütüldükten sonra bir mercek ile mikroskop objektifinin (Nümerik açı=1.49, 60x) arka odak düzlemine odaklanır. Böylece laser demetinin objektiften paralel çıkışı sağlanır. Bir aynanın açısı değiştirilerek paralel laser demetinin polimer-hava ara yüzüne kritik içten tam yansıma açısından büyük bir açıyla gelmesi sağlanır. Böylece içten tam yansıma koşulları sağlanmış olur. Örnekden yayılan ışıma aynı mikroskop objektifi ile toplandıktan sonra bir başka teleskopdan geçirilir ve hassas CCD kameraya odaklanır. Kurulan teleskop ile birlikte görüntülemede elde edilen toplam büyütme oranı x180'dir. 16μmx16μm CCD kamera piksel boyutu göz önüne alındığında bu her pikselde 89 nmx89 nm'ik bir alanın görüntülenmesine karşılık gelir.

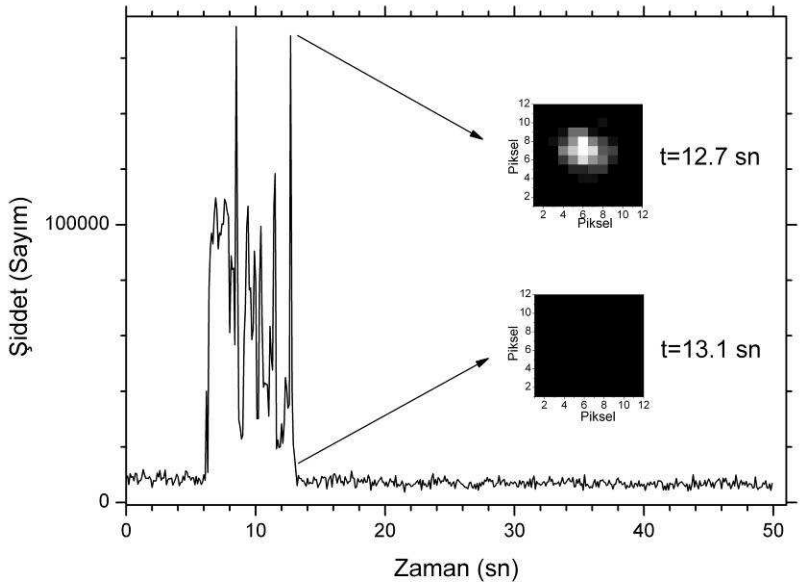
2.2. Tek Moleküllerin Tümüyle Sönmesi ve Yanıp Sönmesinin Fotofiziksel Karakterizasyonu

PMMA ince filmi içinde sabitlenmiş Rhodamine B molekülleri kullanılarak tümüyle sönme deneyleri gerçekleştirildi. Şekil 2.2.1'de bir molekülden gelen ışımanın aniden sönmesi gösterilmektedir. Bu şekilde molekülün merkezinde bulunduğu 4 piksel x 4 piksellik bir alandan toplanan ışımanın zamana bağlı olan grafiği gösterilmektedir. t=7.3sn'de toplanan ışımanın aniden yaklaşık 400000 sayım seviyesinden 40000 saım seviyesine düştüğü görülmektedir. Gözlenen bu ani düşüşten sonra aynı alandan çok az şiddette algılama yapılabilmektedir. Bu tek molekülün tümüyle sönmesini (photobleaching) gösterir. Şekildeki küçük görüntülerde gösterildiği gibi t=20.5 sn'de kırınım sınırlı molekül ışıması görülmemektedir.



Şekil 2.2.1. 1mL 40mg/mL PB-PEO/Toluene çözeltisi ile 3 mL 20 nM Terilen/Toluene çözeltisinin karıştırılması ile elde edilen karışımdan hazırlanan örnek tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak incelendi. Tek moleküllerden gelen floresans sinyallerin zamana bağlı değişimleri gözlendi. Bunun için 0.1 saniye ışınlama zamanıyla 20 saniye boyunca görüntü kaydı yapıldı. Alınan görüntü kaydında 4 x 4 piksellik alandan kaydedilen toplam floresans şiddetinin zaman içerisindeki değişimi yukarıdaki grafikte gösterilmektedir. Toplanan ışığın t=7.3 sn anında tek bir basamakta gürültü düzeyine indiği gözlendi. Yukarıdaki grafikte ayrıca incelenen tek molekül daha iyi görülebilmesi açısından 12 x 12 piksellik alan içerisinde gösterilmektedir. Bu görüntülerde de floresans sinyalin gürültü düzeyine indiği gözlenmektedir.

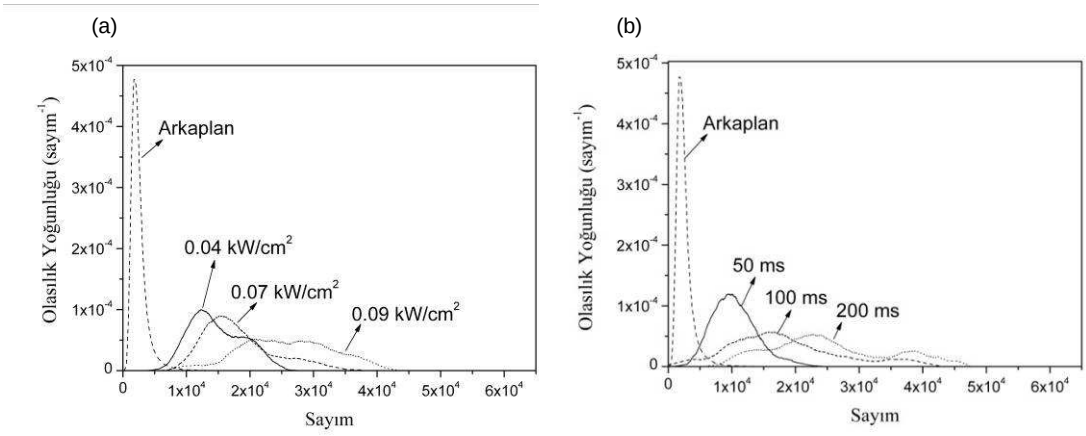
Tek moleküllerde yanıp sönme fenomeninin gözlenmesi için gerçekleştirilen bir deneyin sonuçları Şekil 2.2.2'de gösterilmektedir. Bu şekilde 4 piksel x 4 piksellik bir alandan toplanan ışığın şiddetinin zamana göre değişim grafiği verilmektedir. Toplanan ışık şiddeti başlangıçta gürültü seviyesinde iken t=6 sn'den itibaren artmış ve t=13.1 sn'ye kadar yüksek seviyede gözlenmiştir. Bu arada ışık şiddetinde yüksek seviyerden düşük seviyeye ani geçişler görülmüştür. Bu geçişler yanıp sönme fenomenine t=13.1 sn'den sonra toplanan ışığın tekrar gürültü seviyesine düşmesi ise tümüyle sönme fenomenine karşılık gelir. t=6 sn ile t=13.1 sn arasında görülen yanıp sönme davranışında sönme anında toplanan ışık şiddetinin gürültü seviyesine düşmediği görülmektedir. Bunun nedeni Rhodamine B moleküllerinin karakteristik yanıp sönme zamanının Şekil 5'te gösterilen deneyde kullanılan ışınlama zamanı olan 100 ms'den daha düşük olmasıdır [1]. Rhodamine molekülleri için yanıp sönme zamanının 1-10 ms mertebesinde olduğu aşağıdaki referansta gösterilmektedir. Kullanılan kameranın zaman çözünürlüğü 31.25 ms olduğu için, deneysel düzeneğimizle yanıp sönme fenomenini tam olarak karakterize etmemiz mümkün olmamıştır.



Şekil 2.2.2. 3mL'lik 3mg/mL PMMA çözeltisi içerisine 0,2 nM Rhodamine B çözeltisinden 1 damla damlatılarak hazırlanan yüzeyden tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak tek moleküllerden gelen floresans sinyallerin zamana bağlı değişimleri incelendi. Görüntü kaydı için 0.1 saniye ışınlama zamanı kullanıldı. Şekil 4'deki sonuçtan farklı olarak bu incelemede tek moleküllerin yanıp sönme hareketleri incelendi. Alınan görüntü kaydında yanıp sönme hareketini gösteren tek molekülden toplana ışıma şiddetinin zamana göre değişimi yukarıda gösterilmektedir. Zamana bağlı olarak floresans sinyal şiddetinde ani artma ve azalmalar görülmektedir. Bu bize tek moleküllerin karakteristik yanıp sönme fenomenini gözlediğimizi göstermektedir. Ancak, kullanılan sistemin ışınlama zamanı (exposure time) yetisi istenilen seviyelerde olmadığı için tek moleküllerin bu karakteristik özelliği tam olarak çözümlenememiştir. Şekil içerisinde ani artma ve azalmanın gözlemlendiği bir zaman aralığı için görüntüler gösterilmektedir

2.3. Histogram Analizi

Tek molekülleri içeren görüntülerin flöresans sinyal histogramı ölçüldü. Bu çalışmalarda Poly(caprolacton) (PCL) polimeri Terilen molekülleri ile katkılandırıldı. Literatürde gösterilen [2,3] analiz yöntemi kullanılarak elde edilen histogramlar aşağıda verilmektedir.

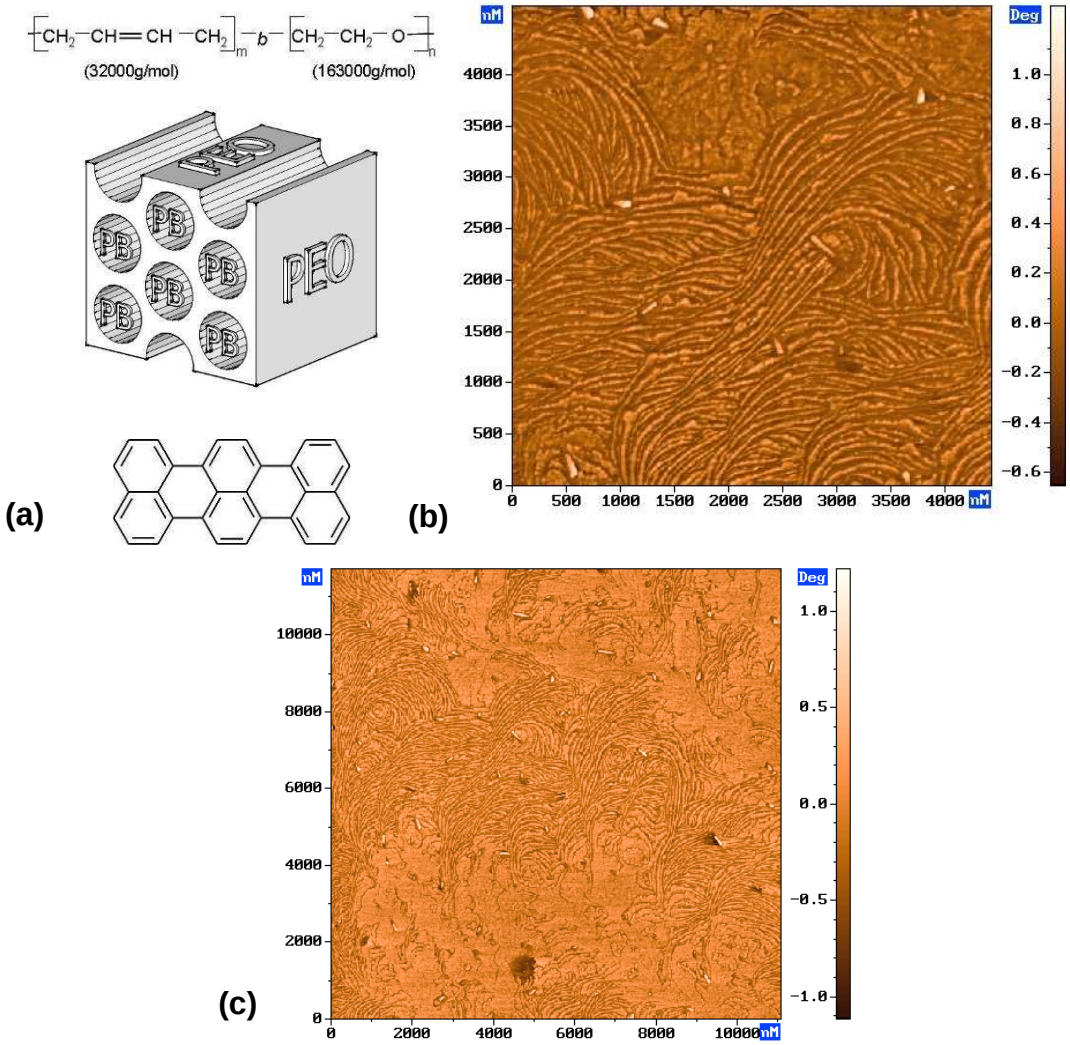


Şekil 2.3.1. Tek moleküllerin floresans sinyal değerlerinin olasılık yoğunluğu histogramları. Arkaplan sinyal değerlerinin olasılık yoğunluğu da karşılaştırma için hesaplandı. (a) Sabit 100 ms' de toplam 100 imgedeki 20 sabit tek molekülden gelen floresans sinyal değerlerinin 0.04, 0.07 ve 0.09 kW/cm2 laser güç değerleri için hesaplanan olasılık yoğunlukları. (b) Sabit 0.07 kW/cm2 laser güç değerinde 100 görüntüdeki 20 sabit tek molekülden gelen floresans sinyal değerlerinin 50, 100 ve 200 ms ışınlama zamanlarında hesaplanan olasılık yoğunlukları.

Bu histogramlar [3] numaralı referansta Şekil 2.3.1'de sunulan histogramın hesaplandığı şekilde hesaplanmıştır. Beklendiği gibi histogramlarda 0 sayıma yaklaşıldıkça olasılık yoğunluğu 0 değerine

düşmektedir ve belli bir sayım değerinde maksimum değere ulaşmaktadır. Ayrıca laser gücü ve ışınlama (exposure) zamanının arttırılması ile histogramların tepe noktalarının daha yüksek sayım değerlerine doğru kaydığı görülmektedir. Bu sonuçlar literatür ile tam uyum içerisindedir. Deneylerde kullandığımız laser gücü kW/cm^2 cinsinden ifade edilmiştir. Bu değerlerin [3] numaralı referansta kullanılan laser güç değerlerinden (0.5-25 kW/cm^2) küçük olması deneylerde kullandığımız CCD kameranın hassasiyetinden kaynaklanmaktadır. Kullandığımız laser güç değerleri son zamanlarda yapılan [4] numaralı çalışmadaki laser güç değeri olan 0.3 kW/cm^2 'ye yakındır.

2.4.PB-PEO Sisteminden İnce Film Üretiminin Optimize Edilmesi

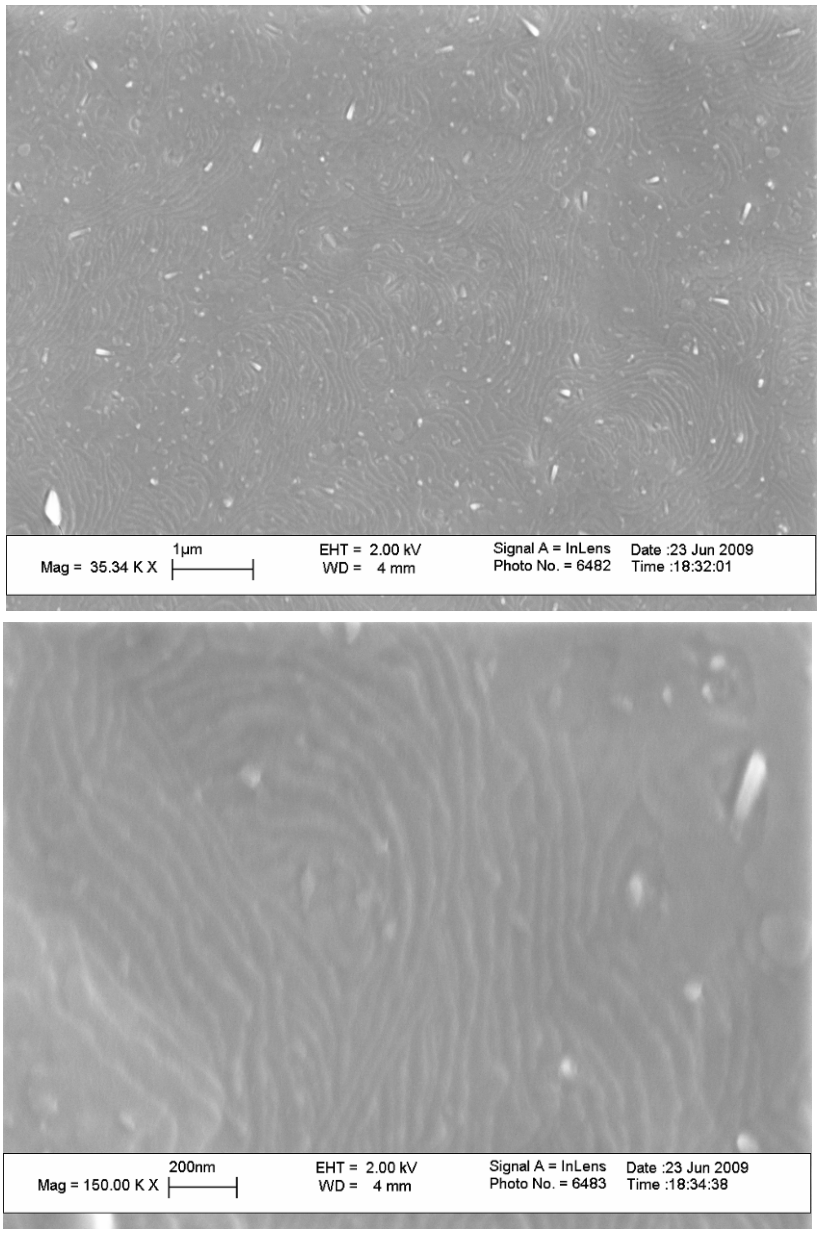


Şekil 2.4.1. (a) Kullanılan PB-PEO diblok-kopolimerin molekül formülü, oluşması beklenen yapının temsili resmi ve terilen molekülünün çizimi. (b,c) Optimize edilmiş örnek hazırlanma yöntemi kullanılarak hazırlanmış PB-PEO ince filminin AKM faz görüntüleri.

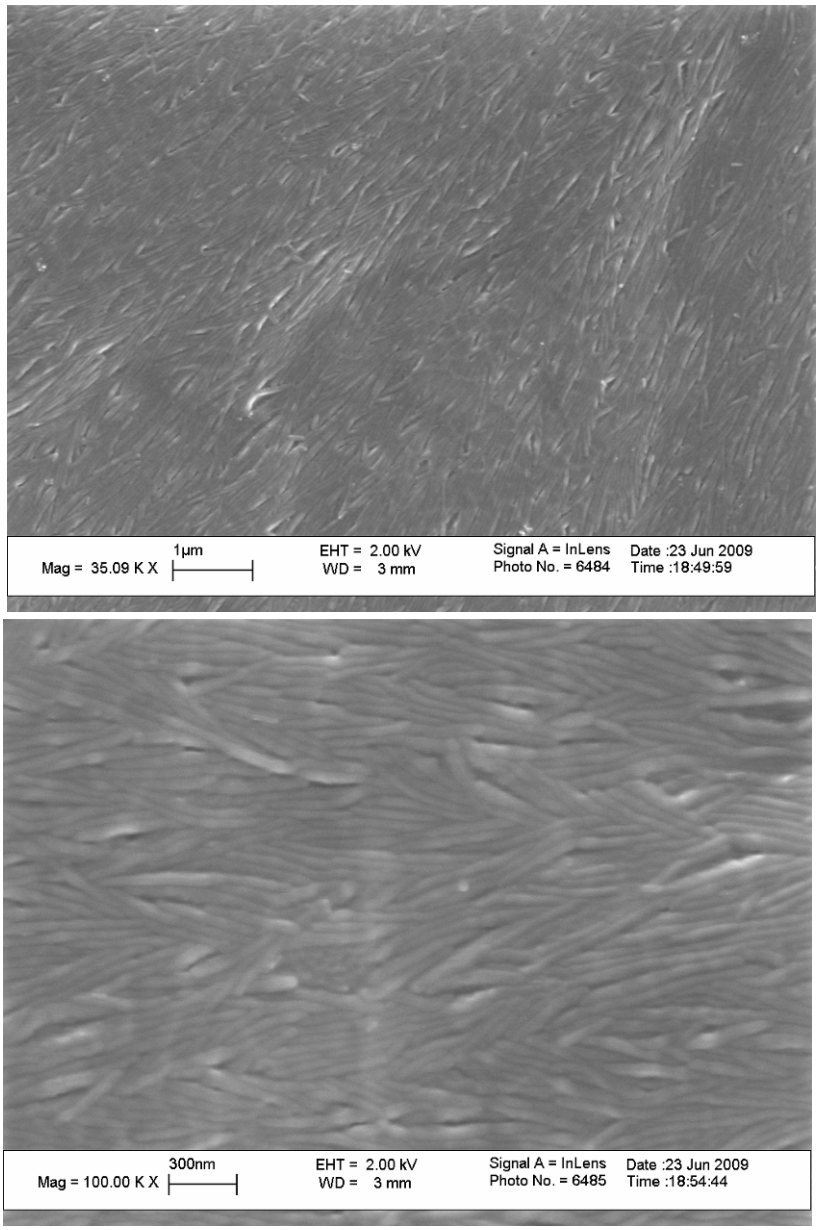
Proje süresince Polibutadien (PB) - Polietilen Oksit (PEO) sisteminden kanallı yapılar içeren ince filmlerin hazırlanmasında kullanılan adımlar optimize edilmiştir. 32000g/mol-163000g/mol molekül ağırlık oranına sahip PB-PEO sisteminden (PB_{593}-PEO_{3705} altyazılar ortalama monomer sayılarını ifade eder) kanallı yapılar içeren ince filmler elde edilmesinde en iyi örneklerin elde edilmesi için belirlenen örnek hazırlama adımları aşağıdaki gibidir:

- 20 nm Terilen/Toluene çözeltisi 40 mg/ml'lik PB-PEO/Toluene çözeltisi ile birleştirilmesi
- Elde edilen çözeltinin lamel üzerine 2000 rpm'de 1 dakika spin kaplanması
- Kaplanmış ince filmin 60 ℃'de 4-6 saat tavlanması.

Bu adımların takibinden sonra elde edilen tipik bir ince filmin AKM faz görüntüleri Şekil 2.4.1b ve 2.4.1c'de gösterilmektedi. Bu şekilde karanlık bölgelerin ifade ettiği PB bölgelerinde kanallı yapılar net olarak görülmektedir. Elde edilen kanallı yapının ve terilen boya molekülünün çizimleri de Şekil 2.4.1a'da gösterilmektedir. Şekil 2.4.2 ve 2.4.3'te ise cam ve silikon alttaşlar üzerlerinde hazırlanan PB-PEO diblok-kopolimer örneklerin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri gösterilmektedir. Kanallı yapı bu görüntülerde açık olarak gözükmektedir.



Şekil 2.4.2. Cam alttaş üzerinde hazırlanan PB-PEO diblok-kopolimer örneğinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.



Şekil 2.4.3. Silikon alttaş üzerinde hazırlanan PB-PEO diblok-kopolimer örneğinin taramalı elektron mikroskobu görüntüleri.

3. Tek Molekül Yörünge Analizi ve Kalibrasyon Deneyleri

3.1. Mekansal duyarlılık kalibrasyonu deneyleri

Dönem içinde projemizde kullanılmak üzere 2 boyutlu Gaussian analizini temel alan bir Labview tek molekül izleme programı geliştirildi. Programda yükten bağlaşık aygıt kamerasıyla (CCD kamera) kaydedilen 512 piksel x 512 piksellik görüntülerden tek bir molekülün içinde olduğu belli bir bölge seçilir. Toplam 180 kat büyütme ile kaydedilen görüntülerde kırınım sınırlı alanın 4 piksel x 4 piksel olması nedeniyle, tek molekül izlenmesi için tipik olarak 12 piksel x 12 piksellik bir alanın seçilmesi uygun olmuştur. Bu alandaki görüntü şiddeti aşağıdaki fonksiyon ile karşılaştırılır ve en uygun sabitler hesaplanır.

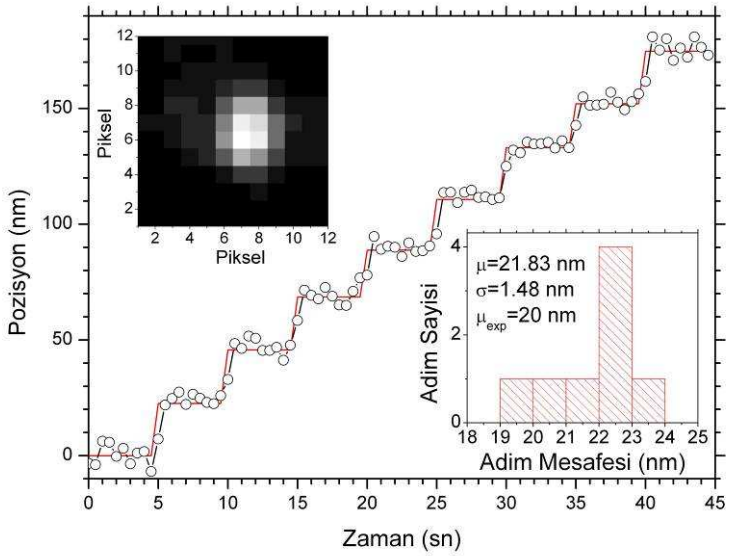
$$I(x,y) = b + A \cdot \exp\left(-\frac{(x-x_m)^2}{2\sigma_x^2} - \frac{(y-y_m)^2}{4\sigma_y^2} \right)$$

Hesaplanan bu sabitlere göre işaret gürültü oranı $SNR = \frac{A}{\sqrt{A+b}}$ ifadesi ile hesaplanır. Geliştirilen programın görüntüleri Şekil 3.1.1'de gösterilmektedir. Aşağıda açıklandığı gibi deneylerimizde 200'ün üzerinde işaret gürültü oranlarına ulaşılmıştır. Bu sayede 1.5 nm seviyesinde konumsal çözünürlük elde edilmiştir.

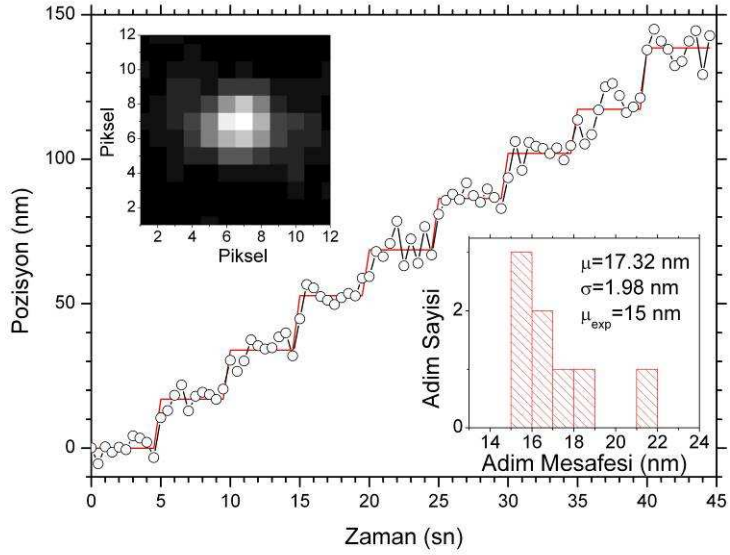
Projemizde tek moleküllerin hareketlerinin detaylı izlenmesi yukarıdaki paragrafta açıklanan kendi geliştirdiğimiz program ile yapılmaktadır. Kaydedilen verilerin ilk analizlerinde ImageJ progamının eklentisi olarak ETH Zürich Hesaplamalı Bilimler Enstitüsü tarafından geliştirilmiş olan nokta takibi ve yörünge analizi algoritması da kullanılmaktadır. Bu iki program da 2 boyutlu Gaussian analizini temel almaktadır. 2 boyutlu Gaussian analizinde [5,6,7] numaralı referanslardan faydalanılmıştır.

Kurulan düzeneğin mekansal duyarlılığının belirlenmesi için PMMA içinde sabitlenmiş tek Rhodamine B molekülleri gözlenirken örneğin bağlı bulunduğu bir piezoelektrik hareket sehpası tek boyutta hareket ettirildi. Piezoelektrik hareket sehpasının hareketleri tek moleküllerin görüntüleri ile karşılaştırıldı. Kullanılan örnekler 3mL'lik 3mg/mL PMMA çözeltisi içerisine 0.2 nM Rhodamine B çözeltisinden 1 damla damlatılarak çözeltinin spin kaplama tekniği ile lamel üzerine kaplanması ile hazırlandı.

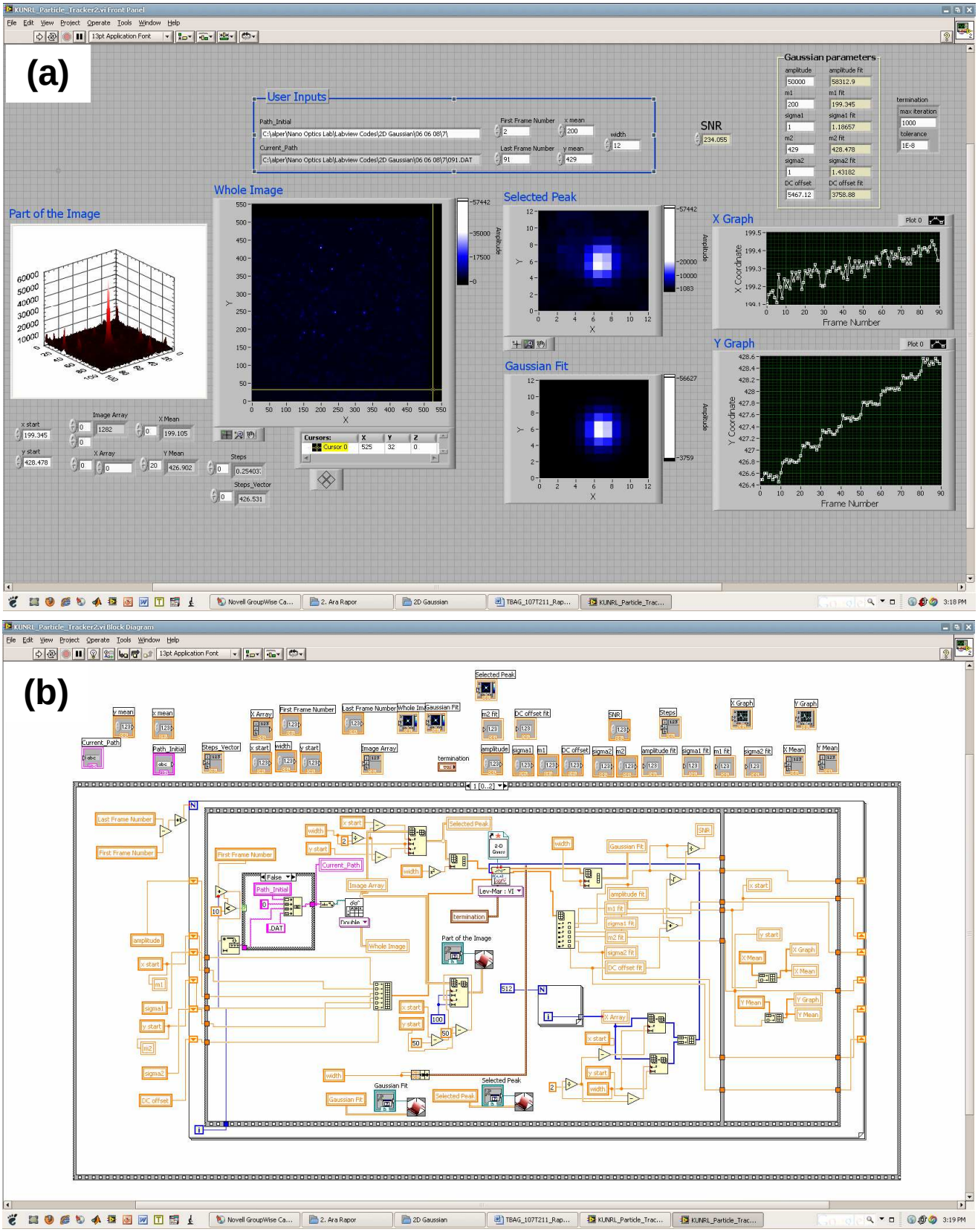
Piozoelektrik hareket sehpasının 20 nm'lik ve 15 nm'lik adımlar atması ile gerçekleştirilen deneylerde incelenen iki ayrı molekül için toplanan verilerin analizleri Şekil 3.1.1 ve 3.1.2'de gösterilmektedir. Bu şekillerde saniyede iki görüntü alınarak yapılan kayıtlar incelendi. Toplam kayıt süresi olan 45 saniye boyunca piezoelektrik hareket sehpası her iki durumda da 8 adım hareket ettirildi. Her adımda 10 görüntü boyunca tek molekülün bulunduğu konum hesaplandı, bu konumların ortalaması tek molekülün o adımdaki ortalama konumunu verdi. Her adımdaki ortalama konumlar arasındaki mesafenin hesaplanması ile adım mesafeleri elde edildi. Hesaplanan adım mesafelerinin histogramları Şekil 3.1.1 ve 3.1.2'de gösterilmektedir. Bu histogramlardan her iki deney için ortalama adım mesafeleri 21.93 nm ve 17.32 nm olarak hesaplandı. Bu sonuçların deneylerde beklenen adım mesafeleri olan 20 nm ve 15 nm ile iyi bir uyum içerisinde olduğu görüldü. Adım değerleri histogramları kullanılarak standart sapma değerleri Şekil 3.1.1 ve 3.1.2 için sırasıyla 1.48 nm ve 1.98 nm olarak hesaplandı. Bu standart sapma değerleri deneylerde ulaşılan ölçüm duyarlılığını göstermektedir. Ölçüm sonuçları projede hedeflenen 1.5 nm'lik mekansal duyarlıllığa ulaşıldığını göstermektedir. Ölçümler için kullanılan Labview programı Şekil 3.1.1'de gösterilmektedir. Labview program dosyası sonuç raporuna da eklenmiştir.



Şekil 3.1.1 – 3mg/mL PMMA çözeltisi içerisine 0.2 nM Rhodamine B çözeltisinden 1 damla damlatılarak çözeltinin spin kaplama tekniği ile lamel üzerine kaplanması ile örnek hazırlandı. Daha sonra tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak tek moleküller uyarıldı ve saniyede iki görüntü alınarak video kaydedildi. Bu sırada piezoelektrik hareket sehpası alınan her 10 görüntüden sonra 20 nm adımlarla hareket ettirildi. Tek moleküllerden gelen floresans sinyallerden bir tanesi geliştirilen Labview programı kullanılarak 12 piksel x 12 piksellik alan içerisinde seçildikten sonra her yarım saniyelik basamaktaki hareketi program sayesinde algılandı ve zamana bağımlı olarak çizildi. Sonuç olarak 20 nm'lik adımlar çizilen grafik üzerinde yaklaşık 20'şer nm'lik artan basamaklar olarak gözlendi. Bu deneyin sayısal istatistiksel analizi yapıldı ve adımların istatistiksel dağılımı çizildi. Yapılan hesaplamalarda elde edilen ortalama adım mesafesinin 21.83 nm ve standart sapmanın 1.48 nm olduğu gözlendi



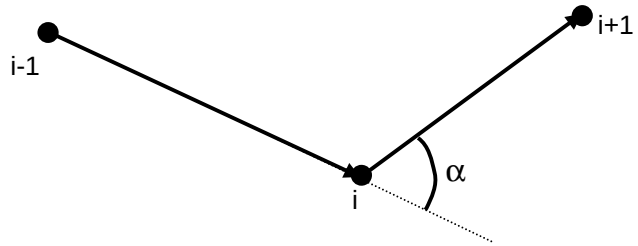
Şekil 3.1.2 – Şekil 2'de bahsedilen gözlem aynı örnek kullanılarak 15 nm'lik adımlar için tekrarlandı. Spin kaplama tekniği ile hazırlanan örnek içerisindeki Rhodamine B molekülleri tam yansımalı floresans mikroskop tekniği kullanılarak 532 nm'lik lazerle uyarıldı. Saniyede iki görüntü alınarak video kaydedilirken piezoelektrik hareket sehpası alınan her 10 görüntüden sonra 15 nm adımlarla hareket ettirildi. Tek moleküllerden gelen floresans sinyallerden bir tanesi geliştirilen Labview programı kullanılarak 12 piksel x 12 piksellik alan içerisinde seçildikten sonra her yarım saniyelik basamaktaki hareketi program sayesinde algılandı ve zamana bağımlı olarak çizildi. Sonuç olarak 15 nm'lik adımlar çizilen grafik üzerinde yaklaşık 15'er nm'lik artan basamaklar olarak gözlendi. Bu deneyin sayısal istatistiksel analizi yapıldığında ortalama adım mesafesinin 17.32 nm ve standart sapmanın 1.98 nm olduğu hesaplandı



Şekil 3.1.3 – Labview programlama dili kullanılarak geliştirilen parçacık izleme programının görüntüleri. Programın ön paneli (a) ve blok şeması (b) gösterilmektedir

3.2. Açı Analizi

Açı analizi, tek molekülün yörüngesindeki herhangi bir noktayı bir sonraki ve bir önceki noktalarla bağlayan doğrular arasındaki açının (Şekil 3.2.1'de gösterilen α açısı) bulunması ile gerçekleştirilir. Tek boyutta hareket durumunda bu açının 0 *rad* ve π *rad* değerlerinde bulunması beklenir. 2 boyutta Brownian harekette ise açının 0 *rad* ile π *rad* arasında herhangi bir değeri alması beklenir. Özellikle Şekil 4.2b ve c'de gösterilen açı histogramlarının 0 *rad* ve π *rad* değerlerinde tepe değerlerine ulaşmaları tek moleküllerin tek boyutlu kanallar içerisinde hareket ettiğinin göstergesidir. Şekil 4.2a ve d'deki açı histogramlarının 0 *rad* ve π *rad* değerlerinde tepe değerlerine ulaşmamaları seçilen ışınlama zamanı ile molekülün yayınım zamanının uygun olmamasından kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.2.1. Açı analizinde hesaplanan açının (α) temsili gösterimi.

3.3. Ortalama Karesel Yer Değişim (OKY) Analizi

Belirli ışınlama zamanında (δt) kaydı alınan görüntülerde yayınım yapan tek boya molekülünün her bir görüntüdeki pozisyon bilgileri $(r_1(x_1, y_1), r_2(x_2, y_2), r_3(x_3, y_3), ...)$ kullanılarak molekülün ortalama karesel yer değişimleri (mean square displacement) herbir adım-aralığı (lag time), $\tau = n\delta t$ (*n* : iki adım-aralığı arasındaki adım sayısı), için ayrı ayrı hesaplanır. Genel olarak $\tau = n\delta t$ için yer değişimler şu şekildedir:

$$x_1 = x(t_1) \quad x_{n+1} = x(t_1 + \tau) \quad \Delta x_1(\tau) = x_{n+1} - x_1$$
$$y_1 = y(t_1) \quad y_{n+1} = y(t_1 + \tau) \quad \Delta y_1(\tau) = y_{n+1} - y_1$$
...
$$x_i = x(t_i) \quad x_{n+i} = x(t_i + \tau) \quad \Delta x_i(\tau) = x_{n+i} - x_i$$
$$y_i = y(t_i) \quad y_{n+i} = y(t_i + \tau) \quad \Delta y_i(\tau) = y_{n+i} - y_i$$

Karesel yer değişimler ise

$$\Delta r_1(\tau)^2 = \Delta x_1(\tau)^2 + \Delta y_1(\tau)^2$$
$$\Delta r_2(\tau)^2 = \Delta x_2(\tau)^2 + \Delta y_2(\tau)^2$$
...
$$\Delta r_i(\tau)^2 = \Delta x_i(\tau)^2 + \Delta y_i(\tau)^2$$

olarak hesaplanır. Belli bir adım-aralığındaki OKY, hesaplanan tüm karesel yer değişimlerin toplamının periyodik adım-aralığı sayısına bölünmesiyle elde edilir.

$$OKY(\tau) = \frac{1}{N-n}\left(\Delta r_1(\tau)^2 + \Delta r_2(\tau)^2 + ...\right) = \frac{1}{N-n}\sum_{i=1}^{N-n} \Delta r_i(\tau)^2$$

Yukarıdaki ifadede *N* toplam periyodik adım-aralığı sayısını ifade eder.

Normal Brownian yayınım durumunda OKY ile adım-aralığı arasında doğrusal bir ilişki vardır. İçerisinde akış barındıran yayınım hareketinde ise OKY ile adım-aralığı arasında parabolik bir ilişki gözlenir. Beklenen ilişkiler aşağıdaki gibidir:

Normal yayınım

$$OKY(\tau) = 2D\tau$$

Normal yayınım ve akış

$$OKY(\tau) = 2D\tau + (V\tau)^2$$

Raporun 4. bölümünde de açıklandığı gibi, örneklerimizde değişik tek molekül yörünge analizleri sonucu normal yayınım ile birlikte normal yayınım ve akış da gözlenmiştir.

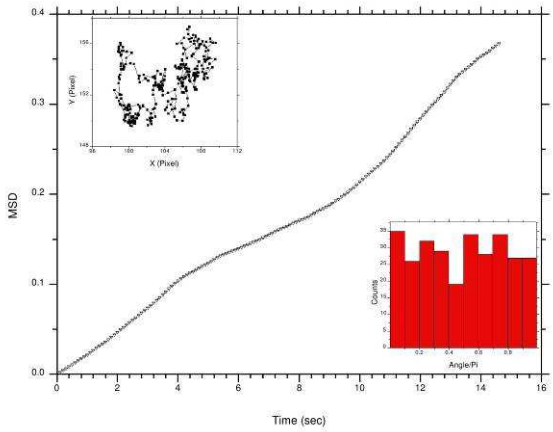
3.4. Tek Molekül Yörünge Analizinde Kullanılan MATLAB Programı

Tek moleküllerin yörüngelerinin belirlenmesi, açı ve OKY analizlerinin gerçekleştirilmesi için MATLAB programlama dilinde bir program yazıldı. Yörünge analizinde öncelikle ImageJ programının "Particle Tracker" eklentisi kullanılarak tek moleküllerin yaklaşık yörüngeleri belirlendi ve fotofiziksel özellikleri iyi olan tek moleküller seçildi. Daha sonra MATLAB programında belirlenen yörünge bilgisi 2 boyutlu Gaussian benzeşimde kullanılarak yörüngeler daha kesin olarak belirlendi. Aynı program kullanılarak elde edilen yörüngeler ile açı ve OKY analizleri yapıldı, ayrıca lokalizasyon kesinliği hesaplandı. Lokalizasyon kesinliğinin hesaplanmasında aşağıdaki formül kullanıldı [8,9]:

$$\sigma(r) = \sqrt{3.53\left[\sum_{i=-N_x}^{N_x}\sum_{i=-N_y}^{N_y}\frac{\left(I_0^2 x_i^2/\sigma_{xy}^4\right)\exp\left[-\left(x_i^2+y_i^2\right)/\left(2\sigma_{xy}^2\right)\right]}{\sigma_{bg}^2+\sigma^2\left(I(x)\right)}\right]}$$

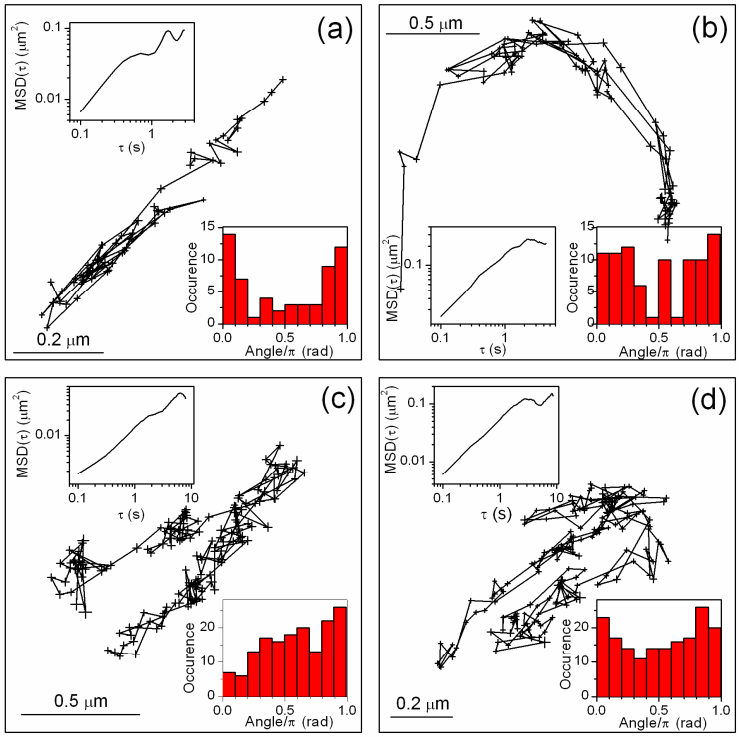
Bu formülde I_0, N_x, N_y, x_i, y_i, σ_{xy}, σ^2_{bg}, ve $\sigma^2(I(xi, yi))$ maksimum genliği, x ve y yönlerindeki piksel sayılarını, x ve y koordinatlarını, 2 boyutlu Gaussian'ın standard sapmasını, arkaplan genliğinin varynasını, ve *(xi,yi)* pozisyonunda sinyal genliğinin lokal varyansını belirtir. Deneysel koşullarımızda elde edilen sinyal gürültü oranları ve lokalizasyon kesinliği tipik olarak 4 ve 8 nm olmuştur. Tek moleküllerin yörünge analizinde kullanılan MATLAB programları sonuç raporuna eklenmiştir.

4. Deneysel Sonuçlar



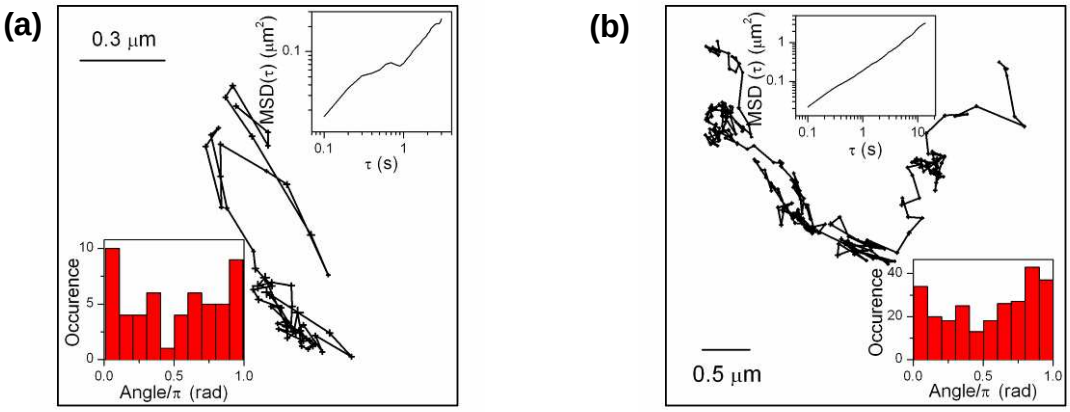
Şekil 4.1. Glükoz / su çözeltisinde yayınım gösteren tek Rhodamine B molekülünün izlediği yörünge ve bu yörüngenin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları.

Şekil 4.1'de herhangi bir nanometrik yapı barındırmayan glükoz / su çözeltisinde yayınım gösteren tek bir Rhodamine B molekülünün analiz sonuçları gösterilmektedir. Bu örnek 20 nm Rhodamine B / su + 3mg/ml glükoz / su çözeltisinden bir lamelin üstüne 60 – 80 µl damlatılması ile elde edildi. İncelenen molekülün izlediği yörünge Brownian hareket yapan bir parçacığın yörüngesine benzemektedir ve nanometrik bir kanalın içinde gidip gelme hareketi gözlenmemektedir. Kanalların bu sistemde bulunmadığı açı analizi sonucu çıkan homojen dağılımdan da anlaşılır. Takip eden bölümlerde açıklandığı gibi kanallı bir yapıda hareket eden moleküller için elde edilen açı analizi histogramının 0 *rad* ile π *rad* değerlerinde tepe yapması beklenmektedir. Son olarak ortalama karesel yer değişimin (mean square displacement) adım aralığı ile değişimi hemen hemen doğrusal bir ilişki ile değişmektedir. Bu da Brownian hareket özellikleri ile uyumlu bir gözlemdir.



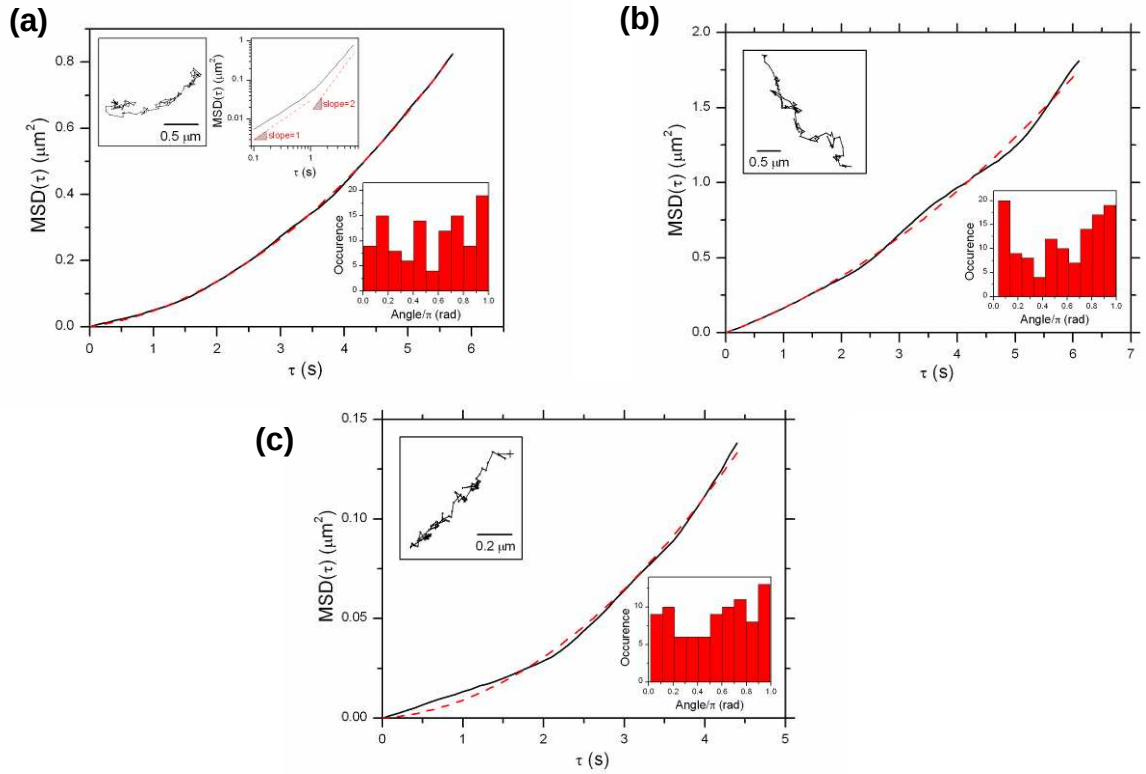
Şekil 4.2. PB-PEO içinde yayınım gösteren 4 adet tek terilen molekülünün izledikleri yörüngeler ve bu yörüngelerin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları.

Optimize edilen PB-PEO sisteminin kanallı yapılarında yayınım gösteren değişik terilen moleküllerinin yörüngeleri, açı ve OKY analiz sonuçları Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4'de gösterilmektedir. Bu şekillerde çizilen yörünge grafiklerinde her noktada tek molekülün iki boyutlu Gaussian dağılımının tepe noktasının lokalizasyon kesinliği hata payları (error bar) ile gösterilmektedir. Optik düzeneğin toplam büyütme miktarı 180 ve CCD kameranın piksel boyutu 16 μm x 16 μm olduğu için şekillerde bir piksel 88.9 nm'lik uzunluğa denk gelmektedir. Şekillerde uzunluk bir ölçek ile gösterilmiştir.



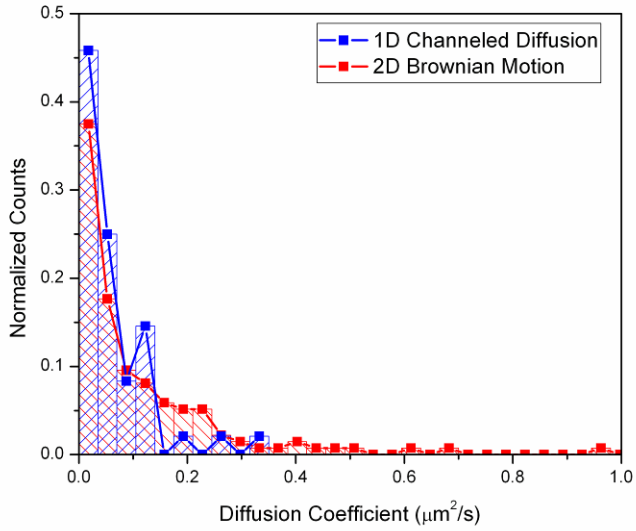
Şekil 4.3. PB-PEO içinde yayınım gösteren 2 adet tek terilen molekülünün izledikleri yörüngeler ve bu yörüngelerin ortalama karesel yer değişimi ve açı analizleri sonuçları.

Şekil 4.2 ve 4.3'de altı ayrı molekülün izlediği yörüngeler ve yörünge analiz sonuçları verilmektedir. Yörüngeleri çıkarılan moleküllerin hareketleri izlendiğinde, moleküllerin aynı yol üzerinde gidip gelme hareketi yapıyor olduğu görülür. Bu durum kanal varlığının bir işaretidir. Şekil 4.2a, c, d ile Şekil 4.3a, b'de incelenen moleküllerin paralel kanallardaki hareketi yörünge çizimlerinden açık olarak görülmektedir. Şekil 4.2b'de gösterilen molekül ise eğik bir yörünge izlemektedir. Paralel ve eğik kanalların gözlenmesi Şekil 2.4.1, 2.4.2 ve 2.4.3'de gösterilen AKM faz görüntüleri ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile tam bir uyum içerisindedir. Tüm bu sonuçlar, kullanılan polimer ince film morfolojisi hakkında bilgi sahibi olunduğunu açık bir şekilde gösterir.



Şekil 4.4. PB-PEO sistemi içerisinde normal yayınım ve akışın bir arada gözlendiği üç terilen molekülünün yörüngeleri ile yörüngeler kullanılarak yapılan ortalama kare yer değişim ve açı analizleri sonuçları.

Tek moleküllerin tek boyutlu kanallar içerisinde hareketi açı analizi ve ortalama karesel yer değişimi (OKY) analizi ile incelenmiştir. Bu iki analiz yöntemi 3.2 ve 3.3 numaralı bölümlerde açıklanmıştır. Şekil 4.2 ve 4.3'de incelenen moleküllerin OKY analizleri sonucu adım-aralığının 0'a yaklaştığı zaman hemen hemen doğrusal ilişkiler gözlenmektedir. Bu sonuçlar normal yayınımı ifade eder. Bazı moleküllerde yüksek adım aralıklarında OKY eğrisinde bir plato gözlenir bu moleküllerin sınırlandırılmış hareket yaptığının bir göstergesidir (confined motion). Deneylerimizde bazı moleküller için OKY ile adım-aralığı arasında parabolik bir ilişki de gözlenmiştir. Bu tür bir ilişki açığa çıkaran üç molekülün yörüngeleri ile açı ve OKY analiz sonuçları Şekil 4.4'de gösterilmektedir. Parabolik ilişki, bu moleküllerin kanallar içinde yayınım ve belli bir yönde akışa maruz kaldıklarını belirtmektedir. Bu akış kanal genişliğinin sabit olmamasıyla ve viskositenin kanal genişliğiyle değişmesiyle açıklanabilir.



Şekil 4.5. Terilen moleküllerinin 1 boyutlu PB kanallarında ve 2 boyutlu PB tabakalarında yayınım sabitlerinin normalize edilmiş histogramı. 1 ve 2 boyutta yayınım sabitleri OKY eğrilerinin $OKY(\tau) = 2D\tau$ ve $OKY(\tau) = 4D\tau$ formüllerine benzeştirilmesi ile elede edilmiştir.

Ölçülen 1 boyutlu yayınım sabitleri 2 boyutlu yayınım sabitleri ile karşılaştırıldı. Bunun için poly(butadiene)-poly(ethylene oxide) (PB_{593}-PEO_{989}, altyazılar ortalama monomer sayısını ifade eder) diblok kopolimer ince filmleri (film kalınlığı ~27 nm) hazırlandı. Bu ince filmlerde PEO bloğunun lamele temas etmesi ve PB'nin PEO ile hava/ince film arayüzeyin arasında iki boyutlu bir tabaka oluşturması beklenmektedir. Hazırlanan ince filmler üzerinde su damlalarının kontak açılarının 90°den büyük olduğu ölçülmüştür. Bu örneklerde PB'nin hacim oranı (f_{PB} = 0.49) temel alındığında PB tabakanın kalınlığının 13 nm olması beklenmektedir. Şekil 4.5'de PB_{593}-PEO_{3705} diblok kopolimeri ile elde edilen ince filmin çevrelenmiş PB kanallarında bir boyutlu yayınım gösteren 48 molekülün ve PB_{593}-PEO_{989} diblok kopolimeri ile elde edilen PB tabakalarında iki boyutlu yayınım gösteren 136 molekülün yayınım sabitleri karşılaştırılmaktadır. Bu karşılaştırma normalize edilmiş histogramlar ile yapılmaktadır. Bir boyutlu ve iki boyutlu yayınım durumlarında ortalama yayınım sabitleri 0.061 $\mu m^2/s$ ve 0.112 $\mu m^2/s$ olarak belirlendi. Özellikle 0.15 $\mu m^2/s$ değerinden yüksek yayınım sabitlerinde bir ve iki boyutlu yayınım durumlarında önemli farklar saptandı. İki boyutlu yayınım sabitlerinin bir boyutlu yayınım sabitlerinden daha büyük olduğu ve yaklaşık 1 $\mu m^2/s$ değerine kadar ulaştığı gözlendi. Bu maksimum değerin bir boyutlu yayınım sabitlerinde gözlenen maksimum değerden yaklaşık üç kat daha büyük olduğu saptandı.

5. Sonuç

Bu proje ile literatürde ilk defa tek molekül izleme yöntemi ile diblok kopolimer ince filmlerde bulunan nanometrik çevrelenmiş kanallarda hareket eden moleküllerin yayınımı incelendi. Poly(butadiene)-poly(ethylene oxide) (PB_{593}-PEO_{989}, altyazılar ortalama monomer sayısını ifade eder) diblok kopolimerinin spin kaplama ile lamellere kaplanması ile ince filmler elde edildi. İnce filmlerin tavlanmasından sonra oluşan kanallı yapı AKM faz görüntüleri ve TEM görüntüleri ile doğrulandı. Kanallar içinde hareket eden tek terilen moleküllerin yörüngelerinin paralel ve eğik kanal morfolojileri ile uyumlu olduğu görüldü.Yörüngeler üzerinde yapılan açı ve ortalama karesel yer değişimi analizleri bir boyutta yayınımı doğruladı ve yayınım sabitlerinin hesaplanmasını sağladı. Ortalama karesel yer değişimi analizleri ile bir boyutlu kanallar içinde bazı moleküllerin normal yayınım gösterirken bazılarının akış içeren yayınım gösterdiğini gözlendi. Hesaplanan yayınım sabitleri PB tabakalarında iki boyutta yayınım yapan terilen moleküllerinin yayınım sabitleri ile karşılaştırıldı.

Elde edilen sonuçlar tek molekül izleme tekniğinin blok kopolimer ince filmlerdeki morfolojiyi anlamakta kullanılabileceğini göstermektedir. Bu teknik tek moleküllerin kanallar içindeki yayınımı detaylı olarak çalışılabilir. Tek moleküllerin kanallardaki tek kusurlar ile etkileşimi detaylı çözümlenebilir. Yayınımı etkileyen diğer faktörler de böylece anlaşılabilir.

Referanslar

[1] Zondervan, R., Kulzer, F., Orlinskii, S. B., and Orrit, M., Photoblinking of Rhodamine 6G in Poly(vinyl alcohol): Radical Dark State Formed through the Triplet, *J. Phys. Chem. A*, Vol. 107, 6770-6776 (2003).

[2] Schmidt, T., Schütz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J., and Schindler, H., Characterization of Photophysics and Mobility of Single Molecules in a Fluid Lipid Membrana, *J. Phys. Chem*, Vol. 99, 17662-17668 (1995).

[3] Schmidt, T., Schütz, G. J., Baumgartner, W., Gruber, H. J., and Schindler, H., Imaging of single molecule difusion, *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Vol. 93, 2926-2929 (1996)

[4] Kirstein, J., Platschek, B., Jung, C., Brown R., Bein, T., and Bräuchle, C., Exploration of nanostructured channel systems with single-molecule probes, *Nature Materials*, Vol. 6, 303-310 (2007).

[5] Sbalzarini, I. F., and Koumoutsakos, P. , Feature point tracking and trajectory analysis for video imaging in cell biology, *J. Struct. Biol.*, Vol. 151 (2), 182-195 (2005).

[6] Thompson, R. E., Larson, D. R., and Webb, W. W., Precise Nanometer Localization Analysis for Individual Fluorescent Probes, *Biophys. J.*, Vol. 82, 2775-2783 (2002).

[7] Yildiz, A., Forkey, J. N., McKinney, S. A., Ha, T., Goldman, Y. E., and Selvin, P. R., Myosin V Walks Hand-Over-Hand: Single Fluorophore Imaging with 1.5-nm Localization, *Science*, Vol. 300, 2061-2065 (2003).

[8] Kubitscheck, U., Kückmann, O., Kues, T., and Peters, R., Imaging and tracking of single gfp molecules in solution. *Biophys. J.*, Vol. 78, 2170–2179 (2000).

[9] Kirstein, J., *Diffusion of single molecules in nanoporous mesostructured materials*. (Doktora Tezi), Ludwig-Maximilians Üniversitesi, Münih (2007)

EK-1 Projede Kullanılan MATLAB Programları

KUNRL_trajectory_analyze.m

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% To fit a 2-D gaussian
%% m = Image
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%

%m=gbell([50 50],[-10 10],[0 3],1);
%clc;
clear all;

tol=1e-7;
n_pixels=10;

date=sprintf('%s','14_11_08/');
number1=sprintf('%s','4');
number2=sprintf('%s','8685');

outfile_trace=sprintf('%s%s%s%s%s%s',date,'Results_',number1,'/Results_',number2,'_trace.txt');
outfile_MSD=sprintf('%s%s%s%s%s%s',date,'Results_',number1,'/Results_',number2,'_MSD.txt');
outfile_angle=sprintf('%s%s%s%s%s%s',date,'Results_',number1,'/Results_',number2,'_angle.txt');
outfile_jpg=sprintf('%s%s%s%s%s%s',date,'Results_',number1,'/Results_',number2,'_trace_analysis');

pos_m=load(sprintf('%s%s%s%s%s%s',date,'Results_',number1,'/Results_',number2,'.txt'));
initial_frame=pos_m(1,1);
final_frame=initial_frame+length(pos_m)-1;

out_m=[];

for ii=initial_frame:final_frame;
    if ii<10
        image_m=load(sprintf('%s%s%s%i%s',date,number1,'/00',ii,'.DAT'));
    elseif ii<100
        image_m=load(sprintf('%s%s%s%i%s',date,number1,'/0',ii,'.DAT'));
    else
        image_m=load(sprintf('%s%s%s%i%s',date,number1,'/',ii,'.DAT'));
    end;
    r_xce=round(pos_m(ii-initial_frame+1,2));
    r_yce=round(pos_m(ii-initial_frame+1,3));
    image_m=image_m((1+r_xce-n_pixels/2):(1+r_xce+n_pixels/2),...
        (1+r_yce-n_pixels/2):(1+r_yce+n_pixels/2));
    image_m=image_m';
    [cx,cy,sxy,PeakOD,bgnd] = Gaussian2D(image_m,tol);
    image_m=image_m-bgnd;

    [sizey sizex] = size(image_m);
    [x,y] = MeshGrid(1:sizex,1:sizey);
    fit_m = abs(PeakOD)*(exp(-0.5*(x-cx).^2./(sxy^2)-0.5*(y-cy).^2./(sxy^2)));
    figure(1)
    subplot(311)
    pcolor(image_m)
    subplot(312)
    pcolor(fit_m)
    subplot(313)
    bgnd_m=image_m-fit_m;
    pcolor(bgnd_m)

    var_bg=var(reshape(bgnd_m,length(bgnd_m)^2,1));
 %   sxy
    var_I0=var(reshape(fit_m,length(image_m)^2,1));
    SNR=PeakOD/sqrt(var_bg+var_I0)

    mean_I0=mean(reshape(image_m,length(image_m)^2,1));
    var_local=(fit_m-mean_I0).^2;
    delta_x= (PeakOD^2)*((x-cx).^2/(sxy^4))...
        .*exp(-0.5*( (x-cx).^2 + (y-cy).^2) / (sxy^2) ) ...
        ./(var_bg + var_local)  ;
    sigma_xy= sqrt( 3.53 / (sum(sum(delta_x))) );
    if sigma_xy>0.3
            out_m=[out_m ; out_m(length(out_m),:)];
            fprintf('BAD FIT!\n');
    else
            [cx+r_xce-((n_pixels+1)/2)-1 sigma_xy cy+r_yce-((n_pixels+1)/2)-1 sigma_xy]
            out_m=[out_m ; cx+r_xce-((n_pixels+1)/2)-1 sigma_xy cy+r_yce-((n_pixels+1)/2)-1 sigma_xy];
    end;
    ii
%    pause;
end;

save(outfile_trace,'out_m','-ASCII','-TABS')

xx = out_m(:,1)*0.08889;
yy = out_m(:,3)*0.08889;
delta_r_2=[];
```

```
delta_t=0.1;
MSD=[];
T=[];
t=0;
for jj=1:(length(xx)-1);
    for ii=(jj+1):length(xx)
        a=xx(ii)-xx(ii-jj);
        b=yy(ii)-yy(ii-jj);
        dr_2=a^2+b^2;
        delta_r_2=[delta_r_2 dr_2];
    end
    MSD=[MSD sum(delta_r_2)/length(delta_r_2)];
    delta_r_2=[];
end;

MSD_sub=MSD(1:(length(MSD)/2));

for jj=1:(length(xx)-2)
    mag_A=sqrt((xx(jj+1)-xx(jj))^2+(yy(jj+1)-yy(jj))^2);
    mag_B=sqrt((xx(jj+2)-xx(jj+1))^2+(yy(jj+2)-yy(jj+1))^2);
    angle_v(jj)=acos( ( (xx(jj+1)-xx(jj))*(xx(jj+2)-xx(jj+1))+...
    (yy(jj+1)-yy(jj))*(yy(jj+2)-yy(jj+1)) ) / (mag_A*mag_B) ) / pi ;
end;

[n, xout]=hist(angle_v);
ANGLE=zeros(length(n),2);
ANGLE(:,1)=n;
ANGLE(:,2)=xout;

MSD2=zeros(length(MSD_sub),2);
MSD2(:,2)=MSD_sub(1:length(MSD_sub));

for ii=1:length(MSD_sub);
    MSD2(ii,1)=ii*delta_t;
end;

figure(2)
subplot(1,3,1)
plot(xx,yy,'-o')
title('Trajectory of the particle');
xlabel('x (um)')
ylabel('y (um)')
subplot(1,3,2)
plot(MSD_sub,'-*')
title('MSD vs Time for all steps')
xlabel('time (s)')
ylabel('MSD (um^2)')
subplot(1,3,3)
hist(angle_v);
title('Histogram of angles between each steps')
xlabel('angle')
ylabel('occurance')

saveas(gcf,outfile_jpg,'jpg');
save(outfile_MSD,'MSD2','-ASCII','-TABS');
save(outfile_angle,'ANGLE','-ASCII','-TABS');
```

Gaussian2D.m

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%% a function to fit a thermal cloud 2-D
function [cx,cy,sxy,PeakOD,bgnd0] = Gaussian2D(m,tol);
%% m = image
%% tol = fitting tolerance

options = optimset('Display','off','TolFun',tol,'LargeScale','off');

[sizey sizex] = size(m);
[cx,cy,sx,sy] = centerofmass(m);
pOD = max(max(m));

mx = m(round(cy),:);
x1D = 1:sizex;
ip1D = [cx,sx,pOD];
fp1D = fminunc(@fitgaussian1D,ip1D,options,mx,x1D);

if fp1D(1)<sizex
    cx = fp1D(1);
else
    cx = 6;
end;
sx = fp1D(2);
PeakOD = fp1D(3);

my = m(:,round(cx))';
y1D = 1:sizey;
ip1D = [cy,sy,pOD];
fp1D = fminunc(@fitgaussian1D,ip1D,options,my,y1D);

if fp1D(1)>sizey
```

```
    cy = fp1D(1);
else
    cy = 6;
end;
sy = fp1D(2);
PeakOD = fp1D(3);
[X,Y] = meshgrid(1:sizex,1:sizey);

bgnd0=m(1,1);

initpar = [cx,cy,sqrt(sx^2+sy^2),PeakOD,bgnd0];
%initpar = [6,6,1.8,PeakOD,bgnd0];
fp = fminunc(@fitgaussian2D,initpar,options,m,X,Y);
cx = fp(1);
cy = fp(2);
sxy = fp(3);
PeakOD = fp(4);
bgnd0=fp(5);
```

fitgaussian1D.m

```
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%%
function [z] = fitgaussian1D(p,v,x);

%cx = p(1);
%wx = p(2);
%amp = p(3);

zx = p(3)*exp(-0.5*(x-p(1)).^2./(p(2)^2)) - v;

z = sum(zx.^2);
```

TÜBİTAK PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje No: 107T211

Proje Başlığı: Çevrelenmiş Geometrilerde Tek Moleküllerin İzlenmesi

Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Yrd. Doç. Dr. Alper Kiraz (Yürütücü)

Araştırmacılar: Prof. Dr. Levent Demirel

Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: Koç Üniversitesi, Fizik Bölümü,

Rumelifeneri Yolu, Satıyer, 34450, İstanbul

Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: Destekleyen kuruluş yoktur.

Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: 01/07/2007 – 30/06/2009

Öz (en çok 70 kelime)

Literatürde ilk defa, tek molekül izleme tekniği ile diblok kopolimer bir malzemede bulunan nanometrik kanallarda yayınım incelendi. Poly(butadiene)-poly(ethylene oxide) diblok kopolimerinde oluşan kanallar atomik kuvvet mikroskobu ve taramalı elektron mikroskobu görüntüleri ile teyid edildi. Kanallar içinde hareket eden terilen moleküllerinin yörüngeleri ile yapılan açı analizi bir boyutta yayınımı doğruladı. Ortalama karesel yer değişimi analizi ile yayınım sabitleri ölçüldü. Ölçülen yayınım sabitleri iki boyutta yayınım yapan moleküllerin yayınım sabitleri ile karşılaştırıldı.

Anahtar Kelimeler:

Tek molekül izleme, içten tam yansımalı flöresans mikroskopi, diblok-kopolimer, terilen, flöresans görüntüleme

Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu mu? **Evet** ☐ **Gerekli Değil** ☒

Fikri Ürün Bildirim Formu'nun tesliminden sonra 3 ay içerisinde patent başvurusu yapılmalıdır.

Projeden Yapılan Yayınlar:

Tez:

No	Yayın Bilgileri
T1	Yorulmaz, M., *Single Molecule Tracking in Confined Geometries,* (Yüksek Lisans Tezi), Koç University, Malzeme Bilimleri ve Mühendisliği Programı, Ağustos 2009.

Uluslararası Dergilerde Yapılan Yayın: Yayın kopyası ektedir.

No	Indeks	Yayın Bilgileri
Y1	SCI	Yorulmaz, M., Kiraz, A., and Demirel, A. L., *Motion of Single Terrylene Molecules in Confined Channels of Poly(butadiene)-Poly(ethylene oxide) Diblock Copolymer, J. Phys. Chem. B,* Vol. 113 (29), 9640-9643 (2009).

Sunulan Bildiriler: Bildiri özetleri ektedir. Sunum tipleri uluslararası (UA) ve ulusal (U) olarak belirtilmiştir.

No	Sunum Tipi	Yayın Bilgileri
S1	UA	(POSTER SUNUMU) Yorulmaz, M., Kiraz, A., and Demirel, A. L., “Single Molecule Imaging to Analyze Diffusion and Dipole Orientation”, PhOREMOST “ADVANCES IN NANOPHOTONICS' Workshop, Eylül 2007, İstanbul
S2	U	(POSTER SUNUMU) Yorulmaz, M., Kiraz, A., ve Demirel, A. L., “Tek Molekül Görüntülemesi Yöntemi ile Moleküllerin Yayınımı ve Dipol Yönelimlerinin İncelenmesi”, 9. Ulusal Optik, Elektro-Optik ve Fotonik Çalışma Toplantısı, Eylül 2007, Ankara
S3	UA	(SÖZLÜ SUNUM) Yorulmaz, M., Kiraz, A., and Demirel, A. L., “Single Molecule Tracing in Confined Geometries”, MPI Bilateral Workshop, Mayıs 2008, Koç Üniversitesi, İstanbul
S4	U	(POSTER SUNUMU) Yorulmaz, M., Kiraz, A., ve Demirel, A. L., "Blok Kopolimerler ile Oluşturulan Çevrelenmiş Geometrilerde Tek Moleküllerin İzlenmesi” , 10. Ulusal Optik, Elektro-Optik ve Fotonik Çalışma Toplantısı, Kocaeli Üniversitesi, Kocaeli (17 Ekim 2008)
S5	UA	(POSTER SUNUMU) Yorulmaz, M., Kiraz, A., and Demirel, A. L., "Single Molecule Imaging to Analyze Diffusion and Dipole Orientation”, MediNano, İstanbul (6 - 7 October 2008)
S6	UA	(SÖZLÜ SUNUM) Yorulmaz, M., Kiraz, A., and Demirel, A. L., "Single Molecule Tracing to Analyze the Surface Morphology of Block-Copolymer Thin Films," DPG Spring Meeting, Dresden (22-27 March 2009)