YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE DNA HASSAS TAYİNİ VE NANOPARTİKÜLLER ARASI MESAFELERİN OPTİMİZASYONU

SENSITIVE DETERMINATION OF DNA AND OPTIMIZATION OF DISTANCE BETWEEN NANOPARTICLES WITH SERS

GÜLÜZAR GÖRKEM BÜYÜKGÖZ

PROF. DR. İSMAİL HAKKI BOYACI

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2014

Gülüzar GÖRKEM BÜYÜKGÖZ'ün hazırladığı "**Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi ile DNA'nın Hassas Tayini ve Nanopartiküller Arasi Mesafelerin Optimizasyonu**" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANA BİLİM DAL**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Nihal Aydoğan
Başkan .....

Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı
Danışman .....

Prof. Dr. Şadan Özcan
Üye .....

Doç. Dr. Uğur Tamer
Üye
.....

Y. Doç. Dr. F. Ceyda D. Şeker
Üye .....

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen bilimleri Enstitüsü tarafından **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr.Fatma SEVİN DÜZ
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

...../…./…

İmza

Gülüzar GÖRKEM BÜYÜKGÖZ

ÖZET

YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ İLE DNA HASSAS TAYİNİ VE NANOPARTİKÜLLER ARASI MESAFELERİN OPTİMİZASYONU

GÜLÜZAR GÖRKEM BÜYÜKGÖZ

Yüksek Lisans, Gıda Mühendisliği Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

Haziran 2014, 115 sayfa

Bu çalışmada yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) kullanılarak hassas ve seçici biyoanaliz yöntemi geliştirilmiştir. Bu amaçla, nanopartiküllerin özelliklerinden yararlanılarak sandiviç yapı oluşturulmuştur. Hedef olarak genetiği değiştirilmiş organizma (GDO) olan Bt-176 mısır geninin 35-S promoter bölgesi kullanılmış olup farklı uzunluktaki baz dizilimleriyle ideal uzunluk belirlenmiştir. Hedef dizilim konsantrasyonlarına karşı DTNB'nin simetrik NO_2 gerilmesine ait bandın grafiğe geçirilmesi ile kalibrasyon grafikleri elde edilmiştir. 5 spacer prob kullanılarak hedef dizilim için 0-1 μM konsantrasyonları arasında lineer korelasyon elde edilmiştir (R^2=0.992). Paralel amplifikasyonun 2. katmanında sinyal artışı %141 olarak bulunmuştur. Yöntemin seçiciliğini belirlemek adına negatif kontrol ve gerçek örnek denemeleri yapılmıştır.

Anahtar kelimeler: YGRS, GDO, paralel amplifikasyon, altın ve manyetik nanopartiküller, nano partiküller arası mesafe, sandiviç yapı

ABSTRACT

SENSITIVE DETERMINATION OF DNA AND OPTIMIZATION OF DISTANCE BETWEEN NANO PARTICLES WITH SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY

GÜLÜZAR GÖRKEM BÜYÜKGÖZ

Master of Science, Food Engineering Deapartment

Supervisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

June 2014, 115 pages

In this study, the selective and sensitivie bioanalysis methods based on surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) were developed. The sandwich structure was established with using preferences of nanoparticles. The target molecule is gene of 35-S promoter part of Bt-176 maize that is genetically modified organism. The ideal distance could be determined with the different prob spacer. The calibration graphs were plotted with the changes of the symmetric NO_2 stretching bands of DTNB vs. the different concentrations of target. Lineer correlation was obtained between the 0-1 µM target concentration for the 5 spacer probe (R^2=0.992). In the parallel amplification, signal enhancement was found % 141 at the second layer. In order to exhibit selectivity of the system, negative control and real sample experiments were performed.

Key Words: SERS, GMO, parallel amplification, gold and magnetic nano particles, distance between nanoparticles, sandwich assay.

TEŞEKKÜR

Tezim sırasında bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarıma yön veren, karşılaştığım güçlükler karşısında desteğini esirgemeyen, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Çalışmalarım kapsamında kullandığım nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu konularında yardımlarından dolayı değerli hocam Sayın Doç. Dr. Uğur TAMER, Arş. Gör. Üzeyir DOĞAN, Yük. Kimyager Aykut ÖNAY'a

Gıda mühendisliğine ilk adımımda destek ve tavsiyeleriyle bana yön veren kuzenim Şadan AKKAYA'ya

Çalışmalarım boyunca, zamanını, desteğini ve tecrübelerini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Arş. Gör. Akif Göktuğ BOZKURT, Arş. Gör. Burcu GÜVEN, Arş. Gör. Havva Tümay TEMİZ, Arş. Gör Ayşe Gamze KORKMAZ YILMAZ ve Yük. Gıda Müh. Kerem İlaslan'a

Her türlü ilgi ve anlayışlarından ötürü H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümüne ve BBRG grubuna,

Bilimsel ve teknolojik araştırma projelerini destekleme programı kapsamında maddi destek sağlayan TUBİTAK'a

Her zaman dostluklarıyla yanımda bulduğum Gıda Müh. Ayşe ALTUNBOY, Gıda Müh. Cennet Arslan, Gıda Müh. Emine YALGI UYGUR, Gıda Müh. Büşra ERDEMİR, Fizyoterapist Naila ANVARKIZI, Sosyolog Ömer Faruk ÇETİN'e, sevgilerini ve tavsiyelerini esirgemeyen GÖRKEM, BARGÜZ ve CAYMAZ ailelerine,

Sevgisini ve desteğini esirgemeyen en kıymetli varlıklarım; annem Ayfer GÖRKEM, babam Yaşar GÖRKEM ve kardeşim Resul Metehan GÖRKEM'e

Sevgisi, sabrı ve her konuda güveni ile yanımda olan kıymetli eşim Dr. Cihangir BÜYÜKGÖZ'e teşekkürlerimi borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖZET ..... **i**
ABSTRACT ..... **ii**
TEŞEKKÜR ..... **iii**
SİMGELER ve KISALTMALAR ..... **x**
1. GİRİŞ **1**
2. Genel Bilgiler **3**
2.1. Raman Spektroskopisi 3
2.1.1. Raman SpektroskopisininTarihçesi 3
2.1.2. Raman Spektroskopisinin Prensibi 4
2.2. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi 7
2.2.1. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi için Güçlendirme Mekanizmaları 9
2.2.2. YGRS Substratları 11
2.3. Genetiğin İlkeleri Ve Analizi 18
2.3.1. Genetiğin modern hikayesine kısa bir bakış 18
2.3.2. Genetiğin Moleküler Temelleri 19
2.3.3. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO) 21
3. Materyal ve Metot **28**
3.1. Materyal 28
3.1.1. Kimyasallar ve Biyokimyasallar 28
3.1.2 Oligonükleotit Dizilimleri 28
3.1.3. Tampon Çözeltiler 29
3.1.4 Ölçüm sistemleri 30
3.2. Metot 30
3.2.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi 30
3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 32
3.2.3 Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu 32
3.2.4 Nanopartikül Yüzeyine Prob İmmobilizasyonu 33
3.2.5 Nanopartiküller Arası Seçici Olmayan Etkileşmelerin Önlenmesi 34
3.2.6 Nanopartiküller Arası Optimum Mesafenin Belirlenmesi 40

3.2.7 Paralel Amplifikasyon 41
4. BULGULAR 44
4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 44
4.1.1 Altın Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu 44
4.1.2 Manyetik Olmayan Çubuk Şekilli Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu. 45
4.2. YGRS ile Hedef Dizilim Tayini 47
4.2.2. Nanopartiküller Arası Mesafenin Optimizasyonu 48
4.2.3. Nanopartiküller Arası Spesifik Olmayan Etkileşmeler 53
4.3 DNA Analiz Yönteminin Geliştirilmesi 79
4.3.1 Paralel Amplifikasyon Stratejisi 80
4.3.2. Geliştirilen Yöntem için Pozitif ve Negatif Kontroller 84
5. SONUÇ ve TARTIŞMA 87
KAYNAKLAR 92
ÖZGEÇMİŞ 99

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Hintli bilim adamı Sir C.V Raman ve nobel ödülü kazandığı çalışmanın ön sayfası 4

Şekil 2.2. Enerji diyagramı üzerinde Stokes ve anti-stokes saçılımları 5

Şekil 2.3. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi 8

Şekil 2.4. Çekirdek çözeltisi ve boy/en oranı ile ilişkisi..... 15

Şekil 2.5. DNA çift sarmal yapısı ve baz dizilimleri 20

Şekil 3.1. Altın manyetik küre ve Au çubuk nanopartiküller ile hibridize sandviç yapının oluşumu 34

Şekil 4.1. Altın manyetik nanopartiküllerin HRTEM görüntüsü..... 44

Şekil 4.2. Altın manyetik nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları. 45

Şekil 4.3. Çubuk formunda altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü 46

Şekil 4.4. Çubuk formunda altın nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları 46

Şekil 4.5. 10 spacer prob kullanılarak elde edilen YGRS sinyalleri (offset 1000 a.u.) 49

Şekil 4.6. 10 spacer prob kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği..... 50

Şekil 4.7. Farklı uzunluklardaki problar ile yapılan denemeler (a: 1 spacer prob, b: 5 spacer prob, c: 10 spacer prob)..... 52

Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan BSA'nın spesifik olmayan bağlanmaya etkisi..... 54

Şekil 4.9. Yıkama sularının UV ölçümleri, a. prob bağladıktan sonra alınan yıkama suları, b. BSA ile blokasyon yapıldıktan sonra alınan yıkama suları, c. modifiye altın çubuk ile 1 μM konsantrasyonunda hedef dizilim etkileştikten sonra alınan yıkama suyu, d. hibridizasyon sonrası alınan yıkama suları 57

Şekil 4.10. Farklı blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisi 58

Şekil 4.11. Altın çubuk ve yıkama sularına ait UV spektrumlar..... 59

Şekil 4.12. PEG'in partiküller arası spesifik olmayan bağlanmaya etkisi 60

Şekil 4.13. PEG'in DTNB sinyali üzerine etkisi 61

Şekil 4.14. Farklı blokasyon ajanlarının altın çubuklardan alınan YGRS sinyallerinin üzerine etkisi 62

Şekil 4.15. Farklı blokasyon ajanlarının altın çubuklardan alınan UV sinyallerinin üzerine etkisi..... 63

Şekil 4.16. Farklı blokasyon ajanlarının partikül-hedef molekül etkileşimi üzerine etkisi 64

Şekil 4.17. Blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin UV sinyalleri ile incelenmesi 65

Şekil 4.18. Blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin UV sinyalleri ile incelenmesi 66

Şekil 4.19. Alanin blokasyon ajanının spesifik olmayan bağlanmalara etkisi..... 67

Şekil 4.20. 10 spacer prob için elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 68

Şekil 4.21. 1 spacer prob ile elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 69

Şekil 4.22. 1 spacer prob ile elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 70

Şekil 4.23. 1 spacer prob ile elde edilen bar grafiği 71

Şekil 4.24. 5 spacer prob ile elde edilen bar grafiği 71

Şekil 4.25. 10 spacer prob ile elde edilen bar grafiği 72

Şekil 4.26. Altın manyetik ve altın çubuk nanopartiküllerin birbiri ile etkileşimi ve yıkama sonrası YGRS şiddeti..... 74

Şekil 4.27. Altın çubuk partikülün DTNB sinyali ve iki partikülün karşılaşması sonrası alınan sinyal..... 75

Şekil 4.28. Altın çubuğun modifikasyon aşamaları ve partiküllerin birbiriyle etkileşiminden sonra altın partiküllerin üzerinde kalan DTNB sinyali 76

Şekil 4.29. Hedef dizilim varlığında elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 77

Şekil 4.30. Farklı yıkama çözeltilerinin spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisi 78

Şekil 4.31. % 2'lik Tween 20 ile elde edilen yıkama sularının UV spektrumları 79

Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlerden elde edilen YGRS spektrumları (offset 4000 intensite), b. Sandviç yapıdan elde edilen kalibrasyon eğrisi..... 81

Şekil 4.34. Amplifikasyon basamakları gerçekleştirildikten sonra alınan YGRS şiddetleri 83

Şekil 4.35. Sandiviç yapı ve paralel amplifikasyon sonrası elde edilen kalibrasyon grafikleri 84

Şekil 4.36. Hedef dizilim ile hedef dizilimden farklı dizilimin relatif intensiteleri..... 85

ÇİZELGELER

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan oligonükleotid dizilimleri 28

Çizelge 3.2. PZR koşulları..... 43

Çizelge 4.1. 0.2 ve 0.5 µM PCR ürünü ile kalibrasyon eğrisinden elde edilen YGRS şiddetlerinin kıyaslanması 86

Çizelge 5.1. Paralel amplifikasyon stratejisi için elde edilen sonuçlar……..89

SİMGELER ve KISALTMALAR

SİMGELER

α : Polarlanabilirlik

μ : Dipol Momenti

KISALTMALAR

AFM : Atomik Kuvvet Mikroskobu

Au-Rod : Altın Çubuk

CT : Yük aktarım modeli

CTAB : Katyonik surfaktan

DLS : Dinamik Işık Saçıcı

DNA : Deoksiribonükleik Asit

DTNB : 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoik asit)

ELISA : Enzim İlintili İmmün Testi

E :Elektrik Alanı şiddeti

EM : Elektromanyetik Model

FTIR : Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi

GMO : Genetik Modifiye Organizma

GDO : Genetiği Değiştirilmiş Organizma

LOD : Gözlenebilme Sınırı

LOQ : Tayin Alt Sınırı

MES : 2-morfolinoetanesulfonik Asit Monohidrat

MNPS : Altın Kaplı Manyetik Nanoküre

PBS : Fosfat Tamponlu Tuz

PZR : Polimeraz Zincir Reaksiyonu

QCM : Kuartz Kristal Mikrobalans

SAM : Kendiliğinden Düzenlenen Tabaka

SEM : Taramalı Elektron Mikroskobu

SERS : Yüzeyde Güçlendirilimiş Raman Spektroskopisi

SPR : Yüzey Plazmon Rezonans

TAE : Tris-Asetat-EDTA

TEM : Geçişli Elektron Mikroskobu

TLC : İnce Tabaka Kromatografisi

Tm : Erime Noktası

UV : Ultraviyolet

XPS : X Işını fotoelektron Spektroskopisi

XRD : X Işını Difraksiyon Spektroskopisi

YGRS : Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Büyük bir hızla gelişen gen teknolojisi artık sadece bir araştırma alanı değil, sağlıktan tükettiğimiz besinlere, kullanılan eşyalardan evcil hayvanlara kadar bir çok alanda gündelik hayatımızın bir parçası olmuştur. Gen teknolojisi alanının en çok ses getiren meyvesi genetiği değiştirilmiş organizmalar olup (GDO) dünya gündeminde hala ilk sıralarda yerini almaktadır [1]. GDO bir organizmanın gen dizilimindeki istenilen bir özelliğinin başka bir organizmanın genine aktararak o organizmaya kendi doğasında bulunmayan bir özelliğin kazandırılmasıyla elde edilmiş olur. GDO'nun bitkisel ve hayvansal ürün veriminin artışı, meyve ve sebzelerde raf ömrünün uzatılması, biyofabrikalar, yenilebilir ilaç ve aşı üretimi gibi potansiyel yararlarının yanında genetik kirlenme riski, zararlılarda dayanıklılığın artması, organizmaların genom yapısındaki etkileşimden doğabilecek riskler gibi olumsuz etkilerinden bahsetmek de mümkündür [2]. Bu nedenle, özellikle GDO'nun ticari ürünlerde kullanımın artmasıyla dünya genelinde bir çok ülkede sıkı yasal düzenlemeler yapılmıştır [3]. Bir çok ülke GDO'lu ürünlerde etiketleme konusunda zorunluluklar ve belirli bir sınır getirmişlerdir (avrupa birliği %0.5). Bu sebeple GDO tayini ihtiyacı önemli bir şekilde artış göstermiştir [4].

GDO tayini için yapılan analizler üç kategoride değerlendirilebilir. Bunlar; protein temelli metotlar, nükleotit-baz amplifikasyonuna dayalı metotlar ve enzim aktivitesine bağlı yöntemlerdir [5]. Yapılan analizler arasında en çok öne çıkan ve hızlı ve güvenilir yöntem polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) [6-8] olmakla birlikte, DNA tayini için kullanılan yöntemler arasında enzimatik döngü ile ilişkilendirilmiş nanopartikül temelli amplifikasyon metodu [9], kolorimetrik biyosensör metodu [10], elektrokimyasal yöntemler [11-13], elektrokemülüminesans [4, 5] ve mikro dizilim teknolojisi [3] gibi bir çok yöntem literatürde mevcuttur. Bununla birlikte proteine dayalı yöntemler arasında ELISA [14, 15] öne çıkmaktadır. Bu analitik yöntemlerle, güvenilir, doğru ve seçici sonuçlar elde edilebilmekle beraber GDO tayini için daha hızlı ve zahmetsiz yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (YGRS, surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)) güçlü bir analitik teknik olarak karşımıza çıkmaktadır ve titreşim özelliğinden yararlanılarak kullanılan spektroskopinin kimyasal ve biyokimyasal alanda ölçüm sınırlarını genişletmektedir. Aslında YGRS, Raman

spektroskopisinin genişletilmiş bir varyansıdır [16] ve Raman spektroskopisinden elde edilen sinyallerde 10^{14} seviyelerinde artış sağlayarak tek bir molekül seviyesinde ölçüme olanak sağlamaktadır [17]. Bu önemli artışın keşfedilmesiyle YGRS ile yapılan çalışmalar öne çıkmış ve analitik çalışmalarda ultra hassasiyet elde edilerek bu alanda yapılan çalışmalar hız kazanmıştır. YGRS' nin keşfinden sonra birçok alanda kullanılmaya başlanmış ve bakteri karakterizasyonu ve tayini [18-22], YGRS substratları [23-25], biyoanaliz [26], antijen, antikor ve immuno analiz [27-29], glukoz tayini [30, 31], virus analizi [32, 33] gibi çok farklı alanlarda kullanılabilen hassas bir teknik olarak ses getirmiştir. Bu teknik aynı zamanda deoksiribonükleik asit (DNA) [34-37] tayininde kullanılmıştır.

YGRS, DNA tayini için çok kullanılan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve enzim bağlı immün test (ELISA) yöntemlerine alternatif bir yöntem olmakla birlikte literatürde DNA ile ilgili YGRS'ye dayalı çalışmalar nispeten sınırlıdır. Bu çalışma kapsamında GDO'da bulunan spesifik DNA sekansını saptamaya yönelik hızlı, hassas ve güvenilir bir yöntem hedeflenmiştir. Bunun için nanopartiküllerin manyetik ve etiket özelliklerinden yararlanılarak manyetik ayırım, partiküller arası mesafenin sinyallere etkisi, optimum mesafenin belirlenmesi, paralel çoğaltma ile hassasiyetin arttırılması ve YGRS tekniği temelli bir yaklaşım geliştirilmeye çalışılmıştır.

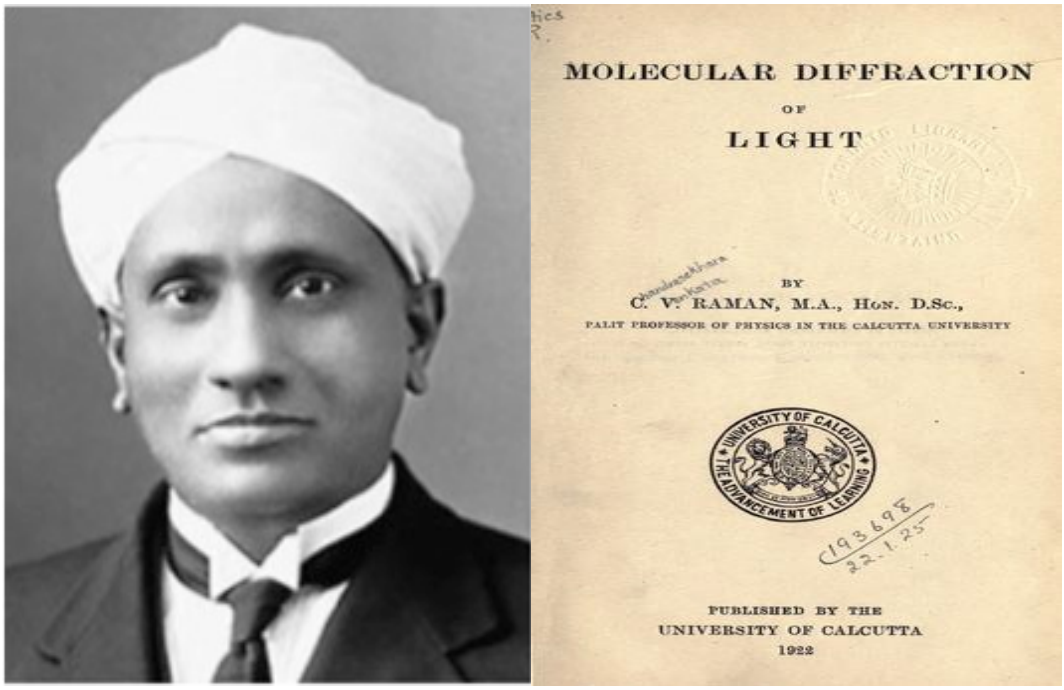
2. Genel Bilgiler

2.1. Raman Spektroskopisi

2.1.1. Raman SpektroskopisininTarihçesi

Işığın elastik olmayan saçılması ile ilgili ilk fenomen 1923 yılında Smekal tarafından öne sürülmüş olup 1928 yılında deneysel olarak ilk ortaya koyan hint bilim adamları Chandrasekhara Venkata Raman ve Kariamanickam Srinivasa Krishnan olmakla birlikte daha sonraları sadece Raman olarak adlandırılmıştır [38, 39].

1921 yazında Avrupa'ya seyehati sırasında Akdenizin mavi sularında opelesansı ilk gözlemleme fırsatı bulduğunu söyleyen Sir C.V Raman, okyanusun mavi renginin gökyüzü renginin yansımasından veya absorplanmasından kaynaklanmadığını ve asıl rengin saçılmadan kaynaklandığını göştermiştir. Su molekülleriyle ışığın saçılmasını saçılma etkisinin orjini olarak belirtmiş ve bu olay ışığın saçılması ile ilgili bilimsel çalışmalarının başlangıcı olmuştur [40, 41]. Sir C. V. Raman 1928 yılında adını taşıyan bir fenomen ortaya koyduğunda ilkel enstrümanlar olarak adlandırılabileceğimiz; ışık kaynağı olarak güneş ışığını, toplayıcı olarak teleskopu ve dedektör yerine gözlerini kullanmıştır [42]. Daha sonra Calcutta üniversitesi'ndeki araştırmalarına konu olan Avrupa'da yaptığı gezinin verdiği fikir 11 Aralık 1930 yılında Sir Raman'a nobel ödülü kazandırmıştır (Şekil 2.1) [40, 41].



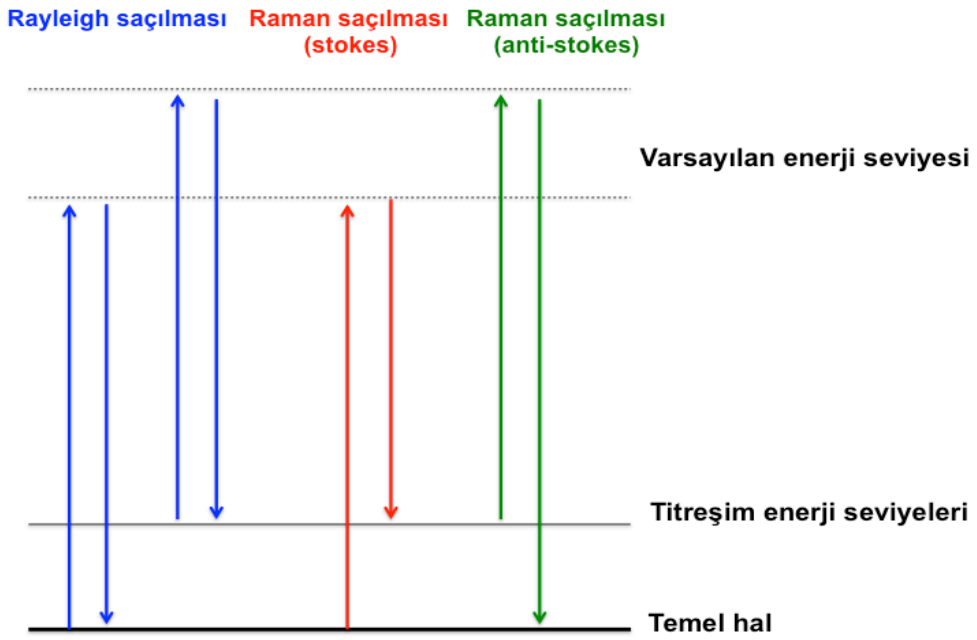
Şekil 2.1. Hintli bilim adamı Sir C.V Raman ve nobel ödülü kazandığı çalışmanın ön sayfası [43, 44]

2.1.2. Raman Spektroskopisinin Prensibi

Bir cisim üzerine ışık gönderildiğinde fotonlardan meydana gelen ışık dört şekilde farklı davranış gösterebilir; soğurulabilir, saçılabilir, soğurulup yeniden yayınlanabilir ya da cisimle etkileşmeden doğrudan geçebilir. Eğer gelen fotonun enerjisi temel enerji düzeyi ile uyarılmış enerji düzeyi arasındaysa, foton soğurulabilir ve molekül yüksek enerjili uyarılmış seviyeye çıkabilir. Işıkta meydana gelen enerji değişimi absorbsiyon spektroskopisi ile ölçülür [38, 45]. Saçılım yaygın bir teknik olmakla birlikte moleküllerin tanımlanması için kullanılan temel saçılım tekniği Raman saçılmasıdır [38]. Raman spektroskopisi, moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında meydana gelen saçılmanın dedektör tarafından takip edilmesine dayanan bir yöntem olup saçılan ışığın frekansında meydana gelen değişimi temel alır [39, 45].

Raman saçılması enerji seviyesi (jablonski) diyagramıyla (Şekil 2.2) açıklanabilir. Foton bir cisimle etkileştiğinde molekülün enerjisi temel enerji seviyesinden uyarılmış enerji seviyesine yükselir. Uyarılmış seviye lazerin elektronla etkileştiği sırada geçici olarak oluşan enerji seviyesidir ve polarlanmaya neden olur. Molekül uyarılmış seviyeye çıktıktan hemen sonra yayılan bir fotonla orjinal elektronik

seviyesine geri döner [46]. Gelen fotonun enerjisi cisimle karşılaştıktan sonra değişmediği durumda saçılan foton ile gelen fotonun frekansı aynı kalır ve bu duruma elastik saçılma ya da diğer isimleriyle "*Rayleigh"*, "*Mie"* ya da "*Tyndall"* saçılımı denir [47]. Saçılma sürecinde çekirdek hareketi indüklendiğinde enerji, gelen fotondan moleküle ya da molekülden saçılan fotona aktarılacaktır. Bu nedenle saçılma elastik olmayan bir saçılma gösterir ve saçılan ışığın çok az bir kısmı molekül ile etkileşen ışığın enerjisinden daha farklı enerjiler ile saçılır. Bu tür saçılmaya ise Raman saçılması denilir [38, 45]. Gelen ışık ile saçılan molekül arasındaki enerji değişiminden oluşan bu proses "Raman etkisi (Raman effect)" olarak bilinir [40]. Raman saçılması iki yolla gerçekleşir; eğer gelen fotonun enerjisi saçılan fotonun enerjisinden büyükse Stokes Raman saçılması, eğer gelen fotonun enerjisi saçılan fotonun enerjisinden düşükse Anti-Stokes Raman saçılması meydana gelir [48].



Şekil 2.2. Enerji diyagramı üzerinde Stokes ve anti-stokes saçılımları

Bir çok molekül lazer ile etkileşmeden önce kararlı haldedirler ve oda sıcaklığında en düşük titreşim enerji seviyesinde gibidirler. Stokes ve Anti-Stokes Raman saçılımı birbiriyle karşılaştırıldığında Anti-Stokes Raman saçılımı uyarılmış titreşim seviyesinde gerçekleştiği için olasılığı daha düşüktür. Stokes ve Anti-Stokes Raman saçılma yoğunluğunun oranı temel ve uyarılmış titreşim seviyelerinde

bulunan moleküllerin miktarına bağlıdır ve Boltzman eşitliği ile hesaplanabilir [38]. Boltzman dağılım yasasına göre, fotonla etkileşmeden önce uyarılmış titreşim enerji düzeylerinde bulunan moleküllerin sayısı temel enerji düzeyinde bulunan moleküllerin sayısından çok daha az olduğu için Anti-Stokes Raman saçılmasının meydana gelme olasılığı Stokes saçılım türünden oldukça düşüktür [49]. Bu nedenle Raman saçılımı daha çok Stokes saçılımı olarak gerçekleşir [38].

Raman spektrumları gelen ve saçılan foton arasındaki enerji farkının bir fonksiyonu olarak saçılma şiddetinin bir gösterimidir ve monokromatik lazer ışığının örneğe teması ile elde edilir. Kaybedilen ya da kazanılan foton enerjileri etkileşime giren molekülün balangıç ve son titreşim enerji seviyeleri arasındaki farkla uyumludur. Elde edilen spektrumlar dalga numaralarının kayması ile karakterize edilir. Gelen ve saçılan ışık arasındaki frekans farkı Raman kayması olarak adlandırılır ve cm^{-1} olarak gösterilir. Her bir molekülün kendine özgü Raman kayması vardır [50].

Bir molekülün Raman türü saçılma gösterebilmesi için molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi (**α**) yani geçici bir dipol momentinin (μ) olması gerekmektedir [45]. Bir molekülün titreşim esnasında polarlanabilirliği değişiyorsa o molekül Raman aktiftir bir moleküldür. Ayrıca molekülün simetrik gerilime sahip olması Raman spektrumu elde etmek için temel gereksinimlerden biridir [51]. Asimetrik gerilme titreşimi sırasında molekülün dipol momentinde titreşim ile aynı fazda bir değişim oluyorsa ve titreşim sırasında oluşan polarlanabilme değişim frekansı, titreşim frekansı ile aynı değilse bu titreşim türü Raman aktif değildir [45]. Yüksek polarlanabilme özelliğine sahip -C–X (X = F, Cl, Br (ya da I), –C–NO_2, –C–S–, –S–S–, –C C–, –C S–, –N N–, –S–H–, –CN, vb., fonksiyonel gruplar güçlü Raman sinyali verirler [51]. Raman spektrumu bir molekülün yapısı ile ilgili çok fazla bilgi verir ve o molekülün kimyasal olarak tanımlanmasına olanak sağlar [17].

Bir molekülün Raman ve infrared spektrumlarının birlikte değerlendirilmesi sonucu o moleküle ait titreşimlerinin hemen hemen tümü incelenebilir ve böylece molekülün yapısı veya nitel analizi daha güvenilir bir biçimde yapılabilir. Bu açıdan bakıldığında, titreşimsel spektroskopi tekniği olan Raman, infrared spektroskopisinin tamamlayıcısı niteliğindedir [49, 52]. Bir molekülün saçacağı

ışığın enerjisi molekülün absorplayacağı fotonun enerjisine çok yakın ise saçılan ışığın şiddetinde artış meydana gelir çünkü saçılan ışığın şiddeti saçılan ışığın frekansının dördüncü kuvvetiyle orantılı olarak artar. Bu yönteme rezonans Raman spektroskopisi (RRS) denir. Normal Raman spektroskopisi saf katı ve sıvılar ile çok derişik (0.10 M) çözeltilerden sinyal almaya izin verirken RRS ile 10^{-6} M gibi seyreltik çözeltilerden dahi sinyal elde edilebilir [49].

Ramana dayalı diğer bir yöntem ise yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) tekniğidir. Bu teknikte yapıya metalik nano yapıların bağlanmasıyla molekülden alınan Raman sinyallerinin artması esas olup 1977 yılında Van Duyne ve Jeanmaire ile Albrecht ve Creighton tarafından keşfedilmiştir [17]. Yüksek hassasiyet ve alınan sinyallerde seçicilik elde edilebilmesi sayesinde yüzey bilimi, tıbbı kimya ve analitik kimya gibi bir çok alanda uygulanmıştır [53].

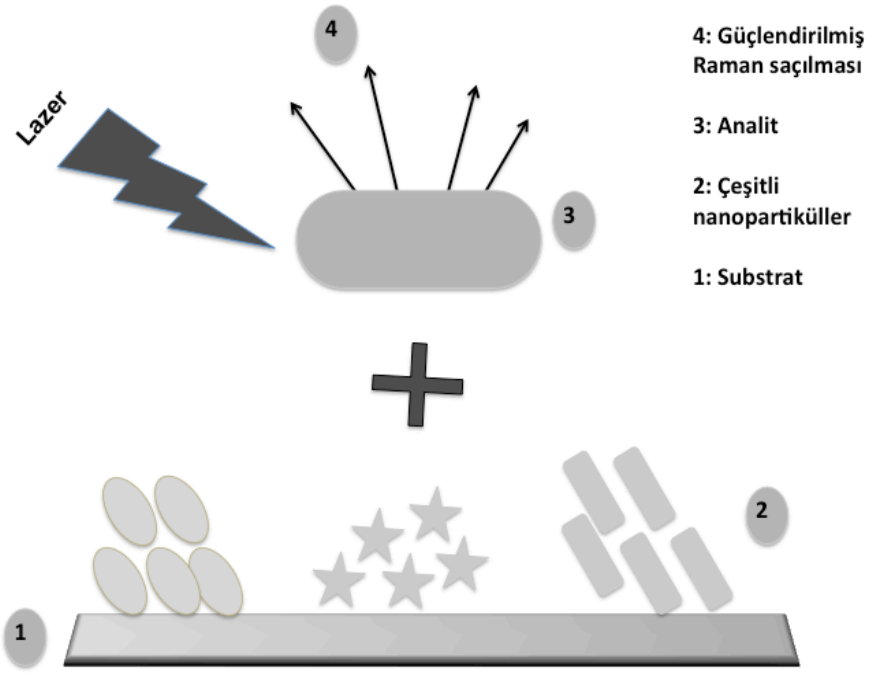
Raman spektroskopisi güçlü ve çok yönlü bir tekniktir ve hem laboratuvar alanında hem de kendi alanında çok hızlı bir şekilde popülarite kazanmıştır. Raman spektroskopisi için bir çok varyans mevcuttur ve bunlar; spontane Raman saçılımı, eş fazlı anti-Stokes Raman saçılımı, optikçe aktif Raman ve hiper-Raman spectroskopi olarak sayılabilir. Bu tekniklerin her biri enstrümantasyon için spesifik araçlar gerektirir [54].

Temel olarak bir Raman spektroskopisi; ışık kaynağı, monokromatör, örnek haznesi ve dedektörden oluşur. Uyarı kaynağı olarak bir çok lazer kullanılabilir: argon iyon (488.0 and 514.5 nm), kripton iyon (530.9 ve 647.1 nm), He:Ne (632.8 nm), Nd:YAG (1064 nm ve 532 nm) ve diot lazer (630 ve 780 nm) örnekleri verilebilir [51]. Su soğutmalı argon iyon lazer laboratuvar Raman spektroskopisi için en ideal lazer çeşitidir ve yüzden binlerce miliwatt'a kadar optik güce sahip olan birçok mavi, yeşil ve yakın ultraviyole lazer çizgisi (line) sağlar [54].

2.2. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

Raman saçılmasından elde edilen düşük intensiteli sinyallerin arttırılmasına yönelik yapılan araştırmalarda YGRS'nin keşfi bu probleme etkili bir çözüm olmuştur [48]. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman spektroskopisi bir molekülün Raman saçılım sinyallerinin nano yapılı metalik yüzeyler varlığında güçlendirilmesiyle meydana gelir (Şekil 2.3). YGRS güçlendirme faktörü (metalik nano yapılı yüzeylerin varlığında ve yokluğunda bir molekülden elde edilen Raman

sinyalleri arasındaki oran) etkiye sebep olan nano yapıların önemli ölçüde şekillerine ve boyutlarına bağlıdır [55].



Şekil 2.3. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi

Temel düzeydeki elektron dizilişi $d10s^1$ ile biten altın (Au), gümüş (Ag) veya bakır (Cu) gibi soy metaller son yörüngelerinde bulunan serbest elektronlar nedeniyle YGRS' de kullanılmaktadırlar. Raman saçılımının artması bu özel dokuya sahip metalik yüzeyler üzerine kimyasalların adsorpsiyonu sonucu soy metal yüzeyinde veya bu metallerin nanopartiküllerin yüzeylerine veya çok yakın mesafeye getirilmesiyle meydana gelmektedir. Uygun koşullarda YGRS, Raman Spektroskopisine göre 10^{14} defa spektral zenginleştirme verdiği yaygın olarak bildirilmektedir [17, 56].

Otuz yıldan daha uzun bir zaman önce piridin molekülünün elektrokimyasal olarak pürüzlendirilmiş gümüş ile elde edilen Raman saçılımında 10^6 kat güçlendirme sağladığı bulunmuştur ve bu göze çarpan artış YGRS'nin ortaya çıkmasına öncülük etmiştir [57]. Fleischmann vd. tarafından elektrod yüzey alanının artması için daha çok piridin molekülünün yüzeye adsorblanması önerilmiştir [58]. Ancak sinyal artışının yüzey alanının artışıyla olmayacağını çünkü eğer sinyal artışı

pürüzlü yüzeye bağlı olsaydı gözlenen sinyal intensitesi 10^6 iken artış miktarının 10 faktörden daha düşük bir değer olacağı farklı iki grup tarafından ispatlanmıştır. Jeanmaire and Van Duyne [59] elektromanyetik sinyal güçlendirmesi mekanizmasını önerirken diğer bir grup olan Albrecht ve Creighton [60] kimyasal sinyal güçlendirmesi mekanizmasını önermiştir. Aslında iki mekanizmada doğrudur bu nedenle YGRS bu iki mekanizmanın getirdiklerinin bir sonucudur [48]. Dolayısıyla sinyal artışı mekanizması elektromanyetik etki ve kimyasal etki olmak üzere iki grupta değerlendirilir [17, 53]. Raman Saçılması $\mu=E.\alpha$ arasındaki bağıntı ile ilişkili olmasına rağmen, YGRS hem E (elektrik alanının şiddeti) hem de α (moleküler polarlanabilirlik)'nın artması ile ilgilidir. Elektromanyetik Model (EM) kuramı E güçlendirilmesini konu alırken, Yük Aktarım Modeli (CT) α güçlendirilmesi kısmını ele almaktadır. Bu iki kuram için temel ortak nokta ikisinin de spektral güçlendirmenin oluşabilmesi için yüzey pürüzlendirmesi gerektirmesidir [56].

2.2.1. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi için Güçlendirme Mekanizmaları

2.2.1.1. Elektromanyetik Mekanizma

Elektromanyetik mekanizma iki temel güçlendirmeden oluşmaktadır. Bunlardan ilki metal parçacıkların polarlanması ile tetiklenmiş ek bir alana bağlı olarak lazer elektromanyetik alanının güçlendirilmesidir. İkincisi ise Raman spektroskopisinde ışıma veren bir molekül daha sonra metal parçacıklar ile polarlanıp bu yolla daha güçlü Raman sinyalleri vermesidir. Yüzey pürüzlülüğü YGRS için temel bir gereksinimdir [51, 61]. Elektromanyetik mekanizma adsorplanan molekül ile metal yüzey arasında kimyasal bir bağa ihtiyaç duymaksızın, metal yüzeyindeki yüzey plazmonu ile adsorplanan molekülün arasında gerçekleşen etkileşim sonucu oluşur [53]. Pürüzsüz yüzeylerde yüzey plazmonları metal yüzeylere bağlı elektron dalgaları olarak görülürler ve yalnızca metal yüzeylere paralel olarak hareket edebilirler. Pürüzlü metal yüzeylerde ise plazmonlar artık tutuklu değildir ve metal yüzeylere parallel ve dik olarak ışıma yapabilirler [61].

Nano metal yapısındaki iletkenliği sağlayan elektronların salınım frekansı ile ışığın görünür bölgedeki dalga boylarından birinin rezanons oluşturmasıyla yüzey plazmonları elde edilir ve bu yüzey plazmonları yüzeye paralel olarak uzanan

elektromanyetik dalgalardır. Yüzey plazmonları ara yüzeyin her tarafında üssel olarak azalan elektromanyetik alanları titreştirmektedir. Böylece yüklü bir foton pürüzlü bir yüzeyle karşılaştığı zaman, metalin plazmon rezonansı uyarılır ve saçılma gerçekleşir. Nano yapı yüzeyinde oluşan elektromanyetik alan metal yüzeyinde veya çok yakınında bulunan molekülün Raman saçılmasında güçlendirme sağlar. Birbirine çok yakın nanopartiküllerin yüzey plazmonlarının üst üste çakışmasıyla Raman saçılmasındaki zenginleşme 10^{14} veya 10^{15} kat artabilmekte ve böyle noktalar "temas bölgeleri (hot points)" olarak adlandırılmaktadır [56, 61]. Elektromanyetik etki analit molekül ve metal yüzey arasında direk temas gerektirdiği için "ilk tabaka etkisi (first-layer effect)" olarak da adlandırılmaktadır [51].

Elektromanyetik Mekanizma için Seçim Kuralları

Seçim kuralları elektromanyetik YGRS güçlendirmesi için üretilmiştir. Elektromanyeik güçlendirmede yüzey üzerinde yeni kimyasal türler oluşmaması seçim kuralları açısından avantaj sayılabilir çünkü, seçim kuralları anlaşılması güç yüzey komplekslerinden ziyade, molekülün adsorbat özelliklerini temel alabilir. En basit formunda, spesifik simetri kuralı olmadığı kabülü yapılarak, en yoğun şiddette bantlar, bir polarize adsorbat elektron bulutu metal yüzeye dik olarak indüklendiğinde gerçekleşir. Ancak, molekül simetrik elementler içeriyorsa seçim kuralları daha ayrıntılı elde edilebilir [53].

2.2.1.2. Kimyasal Mekanizma

Bir çok araştırmacı yük transfer mekanizmasının varlığını açıklayabilmek için çalışmalar yürütmektedir. Bazıları bu durumu açıklamak için birinci adsorblanan katmanda oluşan güçlendirme faktörünün neden diğer katmanlardan çok daha yüksek olduğunu kullanmaktadırlar. Temel olarak molekül pürüzlü yüzeyden doğrudan fiziksel ya da kimyasal olarak emildiğinde yük transferi ile gerçekleşen güçlendirme adsorblayıcı-metal kompleksi ile sonuçlanmaktadır. Eğer emilim kimyasal yollarla gerçekleşmişse adsorblanan yüzeyin moleküler orbitalleri metal yüzeyin bantları ile etkileşerek genişleme gösterir. Bu durum elektronlarda transfere ve metalden adsorblanan yüzeye ve adsorblanan yüzeyden metale yayınıma sebep olur. Kimyasal mekanizmanın ilkesi bu etkileşimlere ve bu etkileşimler ile molekülün polarlanmasına dayanmaktadır. Fotonlar, metal

yüzeyden elektronları adsorblanan molekülün içine doğru harekete geçirerek negatif yüklü uyarılmış molekül oluşturmaktadır. Böylece gerçekleşen yük transferi, molekülün içindeki çekirdek dinlenmesini indüklemekte ve bunun sonucu elektron metal yüzeye geri dönmek isteyerek, molekül tekrar nötr hale geçmiş olmaktadır [56, 61]. Yük transfer mekanizması olarak da adlandırılan kimyasal mekanizmanın, elektromanyetik mekanizmadan ayrılan en önemli özelliği; metal ile adsorblanan molekül arasında belirli bir bağ ve Raman saçılımı süresince metal ve adsorplanan yüzey arasında enerji transferi gerektirir [53].

2.2.2. YGRS Substratları

YGRS substratları genel bir isimlendirmeyle güçlü Raman sinyalleri üreten plazmon-rezonansa yardımcı yapılardır. YGRS substratları üç şekilde sınıflandırılabilir;

- Metalik parçacıklar (genellikle nano-parçacıklar), kolloidal çözeltiler gibi çözelti içinde
- Planar (düzlemsel) metalik yapılar, planar substratlarla (cam, silikon, metalik vb.) desteklenen metalik nano-parçacıklı dizilimler (arrays)
- Metalik elektrotlar

Metalik elektrotlar YGRS'nin tarihsel gelişiminde çok önemli rol oynamalarına rağmen düşük sinyal güçlendirme etkisinden dolayı bahsedilen önemi zamanla azalmıştır. YGRS substratlarının diğer iki sınıfı arasında metalik kolloid çözeltileri (baskın olarak Gümüş (Ag) ve Altın (Au) ile elde edilen çözeltiler) YGRS'de tartışmasız üstün bir yer oluşturmaktadırlar. Sulu çözeltilerde bulunan bu kolloidler kurutularak veya uygun bir substrata bağlanarak ikincil tip yapılar olan planar metalik substratlar elde edilebilir [62]. Bu kapsamda belirtilen metallerden elde edilen nanopartiküller YGRS substratları açısından öne çıkmakta ve önem kazanmaktadırlar.

2.2.2.1. Nanopartiküller

Boyutları 100 nm ve altında kalan parçacıklar olarak tanımlan nanopartiküller nanoboyutlu malzemelerin dolayısıyla nanoteknolojinin temelini oluşturmaktadır. Sıkça üzerinde durulan nanopartikül özelliklerinin çekiciliğinin günümüzde belirtilen nedenleri ise; kuantum boyut etkileri, elektronik yapısının boyut bağımlılığı, yüzey

atomlarının karakterleri ve yüksek yüzey/hacim oranı olarak bilinmektedir [63]. Ayrıca boyut, şekil ve kompozisyonları değiştirilmesiyle iyi tanımlanmış nano ölçekli optik, elektrik, manyetik ve katalitik özellikleri geliştirilebilir [64]. Bu sayede özellikle çeşitli optik ve elektrik analizlerde kullanılması mümkün olabilmektedir [65]. Nanoteknoloji alanındaki yeni gelişmeler için en önemli ilk adım nanopartiküllerin üretimidir. Nanopartiküller geniş bir kimyasal aralık ve morfolojide üretilebilirler. Günümüzde çekirdek-kabuk, katkılı, sandviç, boşluklu, küresel, çubuk benzeri ve çok yüzlü gibi farklı morfolojilere sahip metal, metal alaşımı, seramik ve polimer esaslı veya bunların karışımından istenilen özelliklere sahip nanopartiküller hazırlamak mümkündür [63]. Nanopartiküller genellikle spesifik uygulamalara uygun yüzey modifikasyonlarının kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için uygun şekilde tasarlanırlar. Nanopartiküller kimyasal yapılarında meydana gelen bu çok çeşitlilik, şekil ve morfolojileri, bulundukları ortama uygunlukları ve ortamda dağılma şekilleri nedeniyle bilim dünyasında önemli uygulama alanlarında aktif olarak yer almaktadırlar [66].

Nanopartiküller farklı kimyasal çeşitlilikteki materyallerden üretilebilmektedirler. Bu materyallerden genel olarak kullanılanlar; metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküllerdir. Metallerden, gümüş, altın ve bakır nanopartiküllerinin hazırlanmasında en sık kullanılan yöntemler arasında organik veya inorganik maddelerle indirgeme yöntemleri yer almaktadır. Organik maddelerle indirgeme yönteminde en çok kullanılan sodyum sitrat ile indirgeme yöntemi iken inorganik maddelerle indirgeme yönteminde ise sodyum bor hidrür ($NaBH_4$) ile indirgeme yöntemi kullanılmaktadır [56]. Ayrıca metalik ve oksit esaslı nanopartikülllerin üretilmesinde kimyasal buhar yoğunlaştırma (CVC), hidrojen redüksiyonu, asal gaz yoğunlaştırma (AGY) , mikroheterojen sistemlerden üretim, alev sentezi, mekanik aşındırma ve ultrasonik sprey piroliz metotları gibi farklı yöntemler de literatürde yer almaktadır. Bunların dışında mekanik enerji kullanılarak yukarıdan aşağıya “Top Down” ve aşağıdan yukarıya “Bottom Up” üretim yaklaşımları da mevcuttur [63]. Nanopartikül sentezi bu yapıların gösterdikleri özelliklerden dolayı yüksek aktiviteli katalizörler, optik uygulamalar için özel teknolojik malzemeler ile birlikte süper iletkenler, aşınmaya karşı katkılar, yüzey aktif maddeler, ilaç taşıyıcılar ve özel teşhis aletleri gibi birçok teknolojik ve farmakolojik ürünlerin hazırlanmasına öncülük etmektedir. Bunlara ek olarak,

malzemelerin nano boyut seviyesinde kontrollü nano taşıyıcılar, sensörler, nano makinalar ve yüksek yoğunluklu veri depolama hücreleri gibi kendine özgü işlevselliğe sahip minyatürleştirilmiş aygıtların gerçekleştirilmesine olanak sağlamaktadır [63].

Biyolojik alanda ilk nanopartikül uygulamaları, 1970'lerde 5-50 nm çaplı kolloidal altın kullanımı ve elektron mikroskop için immünositokimyasal prob kullanımı ile başlamıştır. Daha sonra yüksek duyarlılığa sahip olduğu için biyolojik ölçümlerde bir devrim gözüyle bakılan radyo-immunoanalizin (RIO) ise 1990'lı yıllarda metal nano partiküllerin kullanılması sebebiyle popülaritesi doruk noktasına ulaşmıştır. Nano partiküller 100 nm'den küçük ve boyutlarına özgül özellikler (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) taşıdıkları için biyolojik sistemlere kolayca entegre olabilirler. Günümüzde nanopartiküller biyoölçümler için farklı amaçlarla kullanılabilmektedir [66].

2.2.2.2. Altın Nanopartiküller

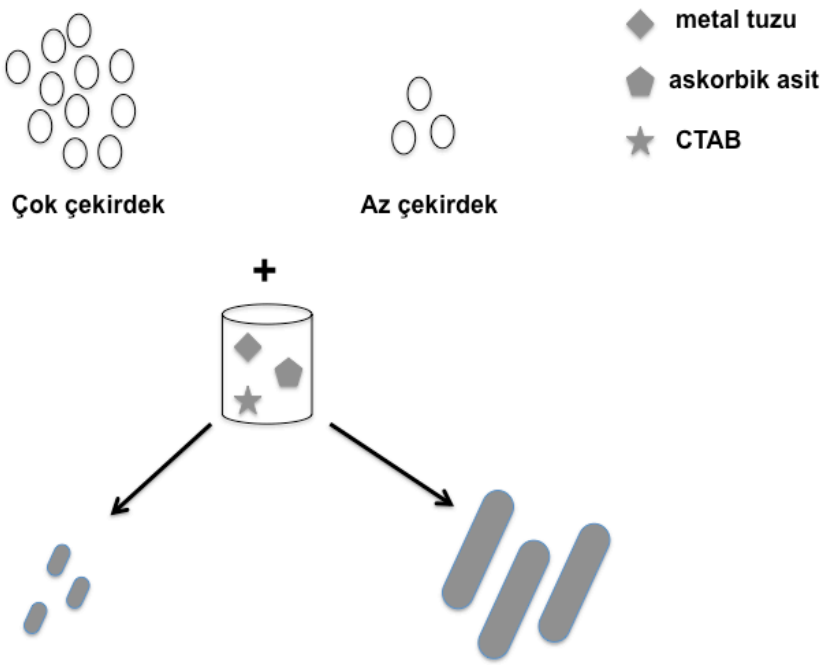
Biyomedikal alanda altın nanopartiküller sıklıkla antimikrobiyel ilaç sistemlerinde ilaç taşıyıcı olarak kullanılırlar. Bir grup araştırmacı bir antibiyotik çeşidi olan ciprofloxacin (cfh)'i altın nanopartiküllerle kaplayarak hızlı desorpsiyonunu sağlamışlardır. Bu noktada altın nanopartiküllerin öne çıkan özelliklerinden partikül boyutundan yararlanılmıştır [67]. Biyolojik sistemler üzerine nanopartiküllerin boyut ve şekillerinin etkisi ile medikal alanda nanopartiküllerin dizaynı ve toksik etkilerinin irdelenmesini içeren çalışmalar önemli bir boyut kazanmıştır. Bu çalışmalar doğrultusunda altın nanopartiküllerin sentezi tipik olarak altın klorürün sodyum borhidrür ve sodyum sitratın kullanılması sonucu kimyasal indirgenme yolu ile gerçekleştirildiğinde sırasıyla 2-10 nm ve 12-100 nm boyutları arasında küresel nanopartiküller meydana gelmektedirler [66]. Sitrat yönteminde sentezlenen partikül boyutu 50 nm'yi geçememekte ve oluşan yapılar çözelti içerisinde polidispers özellik gösterip küresel yapıdan uzaklaşmaktadırlar. Bu durumu aşmak için bir çekirdek çözeltisi (<15 nm) kullanılır. Böylece daha büyük boyutta partikül sentezlemek için nano çekirdek yapılar kullanılmasıyla altın bu nano çekirdekler üzerine indirgenmektedir. İndirgenme gerçekleştiğinde ise ortamda büyüyen nanopartiküller dışında ikincil popülasyon olarak kalan daha küçük boyutlu partiküler oluşur. Bu durum ise sentez sırasında altına karşı seçicilik gösteren bir

ajanın (hyroqionone (HQ)) kullanılması ile aşılabilmektedir [68].

Optik açıdan altın nanopartiküller altının boyut ve şekillerine göre de farklı renkler gösterebilirler. Su içersinde farklı boyutlarda altın nanopartikülleri optik özellikleri açısından değerlendirdiğimizde; en küçük boyutlu altın nanopartikül ışık ile çözelti arasındaki etkileşimden etkilenmeyecek kadar küçük boyutlardadır öyleki çözeltinin optik özellikleri suya benzer bir biçimde sonuçlanmaktadır. Partikül boyutu arttıkça ışık ile etkileşimleri de önemli ölçüde artar ve bu değişim partikülün rengine da yansır. Yaygın olarak ışığın çözelti ile etkileşimleri güçlü bir şekilde elektronik özelliklerini de etkilediği bilinmektedir [43].

Nanopartiküllerin istenilen boyutlarda ve kompozisyonlarda sentezi için bir çok metot bulunmaktadır. Örneğin soy metallerden oluşan nanopartiküllerin sentezi; kimyasal, elektrokimyasal, sonokimyasal ve foton indirgeme gibi yöntemler kullanılarak gerçekleştirilebilmektedir. Nanoçubukların sulu ortamda sentezinde ise kimyasal, elektrokimyasal ve fotokimyasal yöntemler kullanılarak düzenli boy-en oranlarında %90'dan daha yüksek bir verimle sentezlenebilirler [69].

Nanoçubukların kimyasal sentezi için uygulanan yöntemlerden biriside çekirdek aracılığıyla büyümesi sağlanmış partikül sentezidir. Bu yöntem metal tuzların sulu ortamda indirgenmesiye başlar ve sodyum borhidrür gibi güçlü bir indirgeyici ajan ile 3-4 nm boyutlarında genellikle küre biçiminde olan metalik çekirdek çözeltisi oluşturulur. Çekirdek reaksiyonu agragasyonu ve çökeltiyi önlemek için sodyum sitrat varlığında yapılır. Daha sonra çekirdek çözeltisini büyütmek için metal tuzları, surfaktan hekzasetiltrimetil-amonyum bromit (hexacetyltrimethyl-ammonium bromide (CTAB))'den oluşan büyüme çözeltisine bırakılır. Büyütme genellikle zayıf indirgeyici özellik gösteren askorbik asitle başlar. Çekirdeğin metal tuzlarına oranı boy/en oranını (aspect ratio) belirler. Çekirdek miktarı az kullanılmışsa daha uzun boylu çubuklar elde edilir (Şekil 2.4) [70].



Şekil 2.4. Çekirdek çözeltisi ve boy/en oranı ile ilişkisi

Altın nanopartikül sentezinde indirgeyici ajan olarak kullanılan askorbik asit sentez sırasında kullanılmakta ve indirgeme sürecinin yavaş gerçekleşmesi ile büyümeyi sağlamaktadır. İndirgenme reaksiyonunun gerçekleşmesi ve partiküllerin istenilen özelliklerde oluşması için en az üç saat gerekmektedir [69, 71]. Katyonik surfaktan olan CTAB altın naopartiküllerin üzerini kaplar ve porlu yapılar için kullanıldığında homojen porozite sağlamakla beraber yüzeyi CTAB ile kaplanmış olan partiküller sulu ortamlarda yüksek oranda stabilite göstermektedirler [71-73].

Elektrokimyasal sentezde ise CTAB ve gümüş moleküllerinin yanısıra aseton ve siklohekzan molekülleri de prosese dahil olurlar. Belirtilen son iki molekül CTAB ile oluşan misel yapıyı partikül yüzeyi üzerinden uzaklaştırırken, CTAB molekülü ve gümüş iyonları altın nanoçubuğun büyümesi için önemli rol oynamaktadırlar [69].

Diğer bir sentez yöntemi olan fotokimyasal yöntemin diğer yöntemlere göre dezavantajı uzun süreli bir sentez olmasıdır. Bu yöntemde CTAB'in, gümüş ve altın iyonlarının bulunduğu çözelti içinde sentez gerçekleşmektedir. Altın iyonlar 254 nm'de ultraviyole ışık ile indirgenmektedir (420 $\mu W/cm^2$). Bu yöntemde

sentezlenmenin gerçekleşmesi 30 saatten daha fazla vakit almaktadır. Ancak 40 saati aşan bekleme süresi partiküller üzerinde bozunmaya yol açmaktadır. Bununla beraber reaksiyon süresi güçlü bir ışınlama (8 mW/cm^2) ile 30 dakikaya düşürülebilmektedir [69]. Her bir sentez yöntemi için partikül özelliği, büyüklüğü ve homojenliği önem teşkil etmektedir ve partikül büyüklük dağılımını etkileyen parametreler burada kritik rol oynamaktadır. Homojenlik (ayrıca monodispersite, homodispersite veya izodispersite olarak da bilinir); kompozisyon, boyut ve şekil olarak aynı veya hemen hemen aynı karakterizasyonu taşıyan partikülleri ifade eder [74].

Partikül dağılımını etkileyen parametreler;

- doğal olmayan partiküllerin varlığı (partiküllerin büyümesine neden olur),
- elektrostatik enerji bariyeri (koloidal partiküller yüklü olabilir, benzer yüklü partiküllerin birbirini itmesi ile koagülasyon önlenebilir) ve
- sterik itme (surfaktan eklenmesi ile kolloidler stabilize edilebildiği için nanopartiküller açısından tercih edilen bir yöntemdir ve nanopartiküllerin optoelektronik özelliklerini etkiler) olarak belirtilir.

Nanopartiküllerin büyüklük dağılımını geliştirmek için; hızlı çekirdekleşmeyi yavaş büyüme takip etmeli, sıcaklık eğilimi, reaksiyon ortamındaki kimyasal bileşim değişimi ayarlanarak belirli bir reaksiyon ortamı oluşturulmalı ve bu homojen reaksiyon ortamı oluşturmak için reaktifler hızlı karıştırılmalı, karıştırma reaksiyon süresinden daha kısa zamanda olmalı ve reaksiyon kabında termal homojenlik sağlanmalıdır [75]. Kimyasal algılama ve görüntüleme için nano kürelerle karşılştırıldığında nonoçubuklar açısından bazı avantajlar söz konusudur. Öncelikle nanoçubuklar bir çok yaygın lazerlerin frekansı ile takip edilebilirler (örneğin, 633 nm, 785 nm, ya da 1064 nm). Ayrıca, nanoçubukların anizotropik yapıları itibariyle başlangıç ve bitiş yerlerine karşı orta noktaları farklı kimyasal aktivite gösterirler. Yani, boy-en plazmon bandları, tek tip partikül ile birbirinden ayrı olarak iki tip kimyasal tespit için kullanılabilirler. Son olarak anizotropik yapıdaki nano çubuklar orta kısımlarından uç kısımlarına doğru farklı kimyasal reaktiviteyi ifade ederler; bu nedenle, boyuna ve enine plazmon bantları birbirlerinden bağımsız olarak tek bir tip partikül üzerinde iki tip kimyasal analizden sorumludurlar [76].

2.2.2.3. Manyetik Nanopartiküller

Çok çeşitli nanopartiküller birçok endüstriyel, biyomedikal, klinikal uygulamalar için sentezlenirler ve karakterize edilirler ve manyetik nanopartiküllerde bunlardan bir tanesidir [77]. Bu konu ile ilgili sentezleme çalışmalarının birçoğu düşük toksisite ve doğal yollu biyoparçalanabilir özelliğinden dolayı demir çekirdekli manyetik nanopartiküllere odaklanmıştır [74]. Manyetik nanopartiküller demir, nikel, kobalt ve bunların türevleri olan manyetik elementlerden sentezlenirler [77, 78, 79]. Türevlerinden ise Fe_3O_4 molükülü; yüksek manyetik duyarlılığı, toksik olmaması ve kolay elde edilebilir olması bakımından tercih edilir [80]. Bunun yanında hafif asit ve alkali koşullarda stabil olması ve biyo-uyumluluk göstermesi ile de ön plana çıkar [77]. Manyetik alan koşulları altında çekim ve etkileşim özellikleri sebebiyle, manyetik nanopartiküller hücreler/biyolojik materyellerin manyetik olarak ayrımında kullanılırlar [77]. Manyetik nanopartiküller; seçici seperasyon ve manyetik olarak sorumlu olduğu nanopartikülleri veya mikropartikülleri ayırması, dış bir manyetik etkiyle istenilen yere hedeflenmesi veya lokalize olması, diyamanyetik biyolojik materyellerin manyetik modifikasyonunda kullanılması, enzim, antikor gibi biyolojik olarak aktif moleküllerin manyetik olarak etiketlenmesine olanak sağlaması gibi ayrıcalıklı özellikler sergiler [81]. Manyetik partiküllerin homojen büyüklük ve şekilde olmaları, fiziksel ve kimyasal açıdan kararlı bir yapı meydana getirir [45].

2.2.2.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Nanopartiküller için geliştirilen sentezleme, üretim ve karakterizasyon yöntemleri sayesinde nanopartiküllerin büyüklükleri, şekilleri ve bileşim modülasyonları ayarlanabilmekte böylece bu özelliklerinin incelikle kontrolü sağlanabilmektedir. Nanopartiküllerin karakterizasyonu, sentez ve daha sonraki basamakları kontrol etme ve doğrulama amacıyla önemli bir basamaktır ve bunun için bazı teknikler geliştirilmiştir [82]. Bu teknikler geçişli elektron mikroskobu (TEM), ultraviyole spektroskopisi (UV), Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM),dinamik ışık saçıcısı (DLS), x-ışını fotoemisyon spektroskopisi (XPS), X-ışını difraksiyon spektroskopisi (XRD), matriks destekli lazer desopsiyon uçuş zamanlı kütle spektroskopisi (MALDI-TOF)'dur [71, 75].

2.2.2.5. Nanopartiküllerin Biyoölçümlerde Kullanılabilirliği

Kemilüminisans, floresan işaretleyiciler ile metal atomları gibi radyoaktif olmayan işaretleyicilerin keşfi, radyoaktif metodların potansiyel radyoaktif tehlike varlığı ve radyoaktif atıkların özel olarak yok edilmesi gibi dezavantajlar ortadan kaldırılarak DNA dizi analizi ve biyolojik ölçümler gibi birçok alanda kullanılmaya başlanmıştır. İlk nanopartikül uygulamaları üzerine biyoölçümler 1970'lerde 5-50 nm çaplı kollodial altın ve elektron mikroskobu için immunositokimyasal prob kullanımı ile başlamaktadır. Yapılan araştırmalar biyolojik moleküllere bağlanabilen peptid, protein ve nükleik asit gibi yapılara ve optik, elektronik ve manyetik özelliklere sahip nanopartiküllerin geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır [83].

Nanopartiküller biyoölçümlerde farklı amaçlarda kullanılabilmektedirler. Miktar tayininde organik florofor veya nanopartiküller tercih edilmektedir. Bu amaçla en çok kuantum noktalar ve metal partiküller kullanılmaktadır. Kuantum noktaların elektronik özelliklerinden yararlanılarak DNA tayini yapılabilmektedir [83, 84, 85]. Metal nanopartiküller kolorometrik, elektrokimyasal, kütle spektroskopi ve YGRS metotlarında işaretleyici olarak kullanılabilmektedirler [83]. Solüsyondaki biyolojik ölçümlerde ise substrat olarak işlev görürler. Mikrodizilim (microarray) bazlı ölçümler ile karşılaştırıldığında ise solüsyon bazlı ölçümler daha hızlı, daha esnek, yüksek tekrarlanabilirlik ve daha az örnek ve reaktif kullanımı ile ön plana çıkmaktadır [83].

2.3. Genetiğin İlkeleri Ve Analizi

2.3.1. Genetiğin modern hikayesine kısa bir bakış

İnanılmaz teknolojik gelişmelerin olağan olduğu bir zamanda doğmuş bir nesil için, genetik proses mekanizmasının tam anlamıyla ne kadar kısa sürede kavranabileceğini görebilmek bu nesil için çok kıymetlidir. Genetiğin tarihsel sürecini şu dört evrede özetleyebilirz:

1. 1860 yılı öncesi: Bu yıllar için en dikkat çeken gelişmeler; ışık mikroskobunun keşfi, hücre teorisinin açıklanması, 1859'da Charles Darwin'in türlerin kaynağı(*The Origin of Species)* yayını, 1665 yılında Robert Hook tarafından mantarlarla ilgili 'hücre' terimini kullanması, 1833 yılında Robert Brown tarafından hücre çekirdeğinin keşfi ve Rudolf Virchow

tarafından savunulan ‘her hücre bir önceki var olan hücreden meydana gelir’ teorisidir.

2. 1860-1900 yılları arası: öne çıkan en önemli gelişme Gregor Mendel’in bezelyeler ile ilgili çalışmasında kromozomların keşfidir.
3. 1900-1944 yılları arası: modern genetik kromozomal teorinin keşfini zenginleştirmiştir.

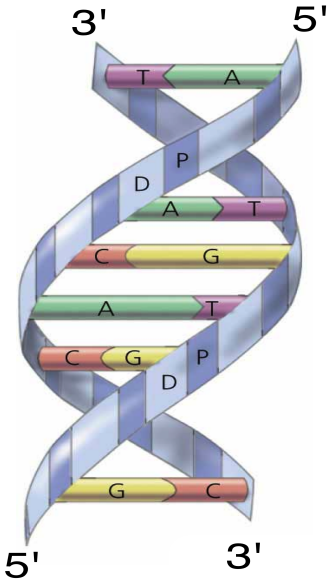
   1944 yılından bugüne kadar ise : ilk olarak O. Avery, McCartey ve MacLeod tarafından DNA’nın genetik bir materyel olduğu gösterilmiştir. Bu gelişmeleri rekombinat DNA teknolojisi, Dolly adında bir koyunun klonlanması devam ettirmiştir [86, 87].

“ Biyoteknoloji devrimi” olarak da adlandırabileceğimiiz 1990 yılı ve sonrası hızla ilerleyen biyoteknoloji artık sadece bir araştırma alanı degil sağlıktan tükettiğimiz besinlere, kullandığımız eşyalardan evcil hayvanlarımıza kadar birçok alanda gündelik hayatımıza girmiştir. Biyoteknolojinin en ses getiren meyvesi olan genetik olarak değiştirilmiş organizmalar (GDO), günümüzde dünya gündeminin en üst başlıklarından biri olmayı sürdürmektedir [88].

2.3.2. Genetiğin Moleküler Temelleri

2.3.2.1. Deoksiribo Nükleik Asit (DNA)’in Özellikleri ve İşlevi

Genler hücre çekirdekerinde kromozomların üzerine yerleşmişlerdir ve uzun zincirli kompleks bir molekül olan deoksiribo nükleik asit (DNA)’ den meydana gelirler. DNA bir nükleik asittir ve kimyasal komponentleri; pürin ve primidinden türemiş heterosiklik moleküller olan nükleotit bazları, deoksiriboz şekeri, ve fosfat gruplarıdır [89, 90, 86]. Fosfat grubu beş karbonlu deoksiriboz şekerinin 5’ karbon ucundan bağlanırken azotlu heterosiklik baz şekerin 1’ karbon ucundan bağlanır. Pürin bazlarından adenin C_6 pozisyonunda amino grubu, guanin ise C_2 pozisyonunda amino ve C_6 pozisyonunda karbonil grubu içerir. Primidin bazlarından C_5 pozisyonunda metil grubu ile C_2 ve C_4 pozisyonlarında karbonil grubu içerirken sitozin C_5 pozisyonunda hidrojen atomu ve C_4 pozisyonunda amino grubu içerir [91]. Baz, şeker ve fosfat grubundan oluşan bu temel yapıya nükleotit denilir ve nükleotitler 3’-5’ fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlanmış ve 5’-3’ yönünde olan bu komplementerler birbiribe karşıt şekilde yerleşmişlerdir (Şekil 2.5) [90, 91, 92, 93] .



Şekil 2.5. DNA çift sarmal yapısı ve baz dizilimleri [94]

DNA'nın bir iplikçiğinde bulunan bazlar, karşıt iplikteki bulunan eşi ile bir çift oluşturur (A-T ve C-G) ve daima pürin bazlarının sayısı primidin bazlarının sayısına eşittir. Bazlar arasındaki bu ilişki "Çargef kuralı" (Chargaff's rules) olarak bilinir [89, 95]. DNA'da bulunan atomların birbirine olan uzaklığı 2.8-2.95 angstrom (10^{-10} metre)'dur. Her ne kadar hidrojen bağları zayıf gibi görünsede, DNA iplikçikleri arasında çok fazla miktarda bulunan hidrojen bağları, iki iplikçiği birarada tutacak bir stabiliteye sahiptirler [96]

2.3.2.2. DNA'nın Denatürasyonu

Çift sarmallı DNA'da bulunan iki antiparalel iplikçik, bu iplikçikler arasındaki hidrojen bağlarının denatüre edici ajanlara maruz kalması sonucu birbirinden ayrılabilir [89]. DNA'nın çift sarmallı yapısının bozunarak birbirinden ayrılmasına denatürasyon denilir [95]. DNA denatürasyon ajanları; ısı, pH, iyonik güç olarak belirtilmiştir. DNA içeren çözeltinin sıcaklığının artmasıyla DNA iplikçileri birbirinden ayrılır. DNA molekülünde bulunan çift sarmallı iplikçiklerin yarı miktarının tek sarmallı hale gelmesi için geçen süre erime noktası (T_m) olarak adlandırılır. Erime sıcaklığı DNA molekülünün özel dizilimine ve uzunluğuna bağlı olarak değişkenlik gösterir; büyük uzunluğa sahip DNA molekülünün erime noktası da yüksektir [89, 95]. Ayrıca DNA'da bulunan GC baz çifti oranın yüksek olması da erime noktasında artışa sebep olur çünkü GC baz çifti birbirine üç hidrojen bağı ile

bağlanmıştır ve birbirine iki hidrojen bağı ile bağlanan AT baz çiftinden daha sağlamdır. Bununla birlikte eğer pH derecesi 11.5'tan yüksek veya 2.3'ten düşükse, ya da iyonik güç düşükse yine denatürasyon gerçekleşir [89, 95, 87]. Denatüre olmuş DNA molekülünde bulunan tek iplikçikler bazı koşullar altında yeniden çift sarmal haline gelebilirler ve bu duruma renatürasyon veya öze dönü (annealing) denir. Renatürasyonun gerçekleşmesi için gerekli parametreler: tuz kosantrasyonunun 0.25 M'dan yüksek ve erime sıcaklığının komplementerler arasında kalıcı bir ayrım olmayacak derecede olmasıdır. Bu sıcaklık genellikle erime sıcaklığının 20°C aşağısı olarak optimize edilmiştir [95].

2.3.3. Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)

Genetiği değiştirilmiş organizmalar (GDO), biyoteknolojik yöntemlerle canlıların sahip olduğu genetik materyalin (DNA) bazı mevcut özelliklerinin istenilen özellik ile değiştirilmesi veya canlılara yeni özellikler kazandırılması ile elde edilir. Böylelikle, organizmanın kendi doğasında bulunmayan bir özellik genetiği değiştirilerek o organizmaya kazandırılmış olmaktadır [1, 2]. Genetik değiştirme teknolojisi ilk 1973 yılında ortaya atılarak ilk uygulama alanı diyabet hastalarının tedavisinde kullanılan insülinin üretimi olmuştur. Bu amaçla sindirim sisteminde yaşayan *Escherichia coli*'nin bir çeşidine insülin geni aktarılarak insülin üretimi sağlanmıştır [2]. Bununla birlikte, bitkilerde genetik değiştirme teknolojisi ilk olarak 1983 yılında karşımıza çıkmaktadır. Ghent Üniversitesi, Washington Üniversitesi ve Monsanto kurumu *Agrobacterium tumefaciens*'in Ti plasmidi bitki genomunda bulunan bir DNA ya transfer edilebildiğini göstererek ilk genetiği değiştirilmiş bitkiyi elde etmişlerdir [97]. Bu gelişme bir çok olumlu ve olumsuz ilerlemenin önünü açmıştır. GDO arzulanan yararlarının yanında potansiyel zararlarının veya risklerinin de olabilceği göz önünde bulundurulmalıdır. Pozitif yaklaşım olarak GDO, yeni mikroorganizmaların eldesi, tarım ürünlerinde potansiyel verimin artırılması, gıda ürünlerinin raf ömrünün uzatılması ve besin içeriğinin geliştirilmesi ayrıca bitkilerde olumsuz koşullara karşı dayanıklılığın artırılması gibi avantajları elde etmek için uygulanmaktadır [2]. Bu alanda olumlu gelişmeler başlığı altında akla ilk gelen uygulamalar besin içeriğini zenginleştirmeye yönelik biyoteknolojik çalışmalar ile A vitamini yönünden zengin pirinç (golden rice) üretimi ve alerjik reaksiyonlara sebep oldukları belirlenen yer fıstığı, fındık, soya, buğday, inek sütü, yumurta, balık ve kabuklu deniz canlıları gibi bazı besinlerin içindeki alerjik

proteinler çıkartılarak veya yapısı değiştirilerek bu besinlerin neden olduğu reaksiyonların azaltılması çalışmalarıdır [88]. Bunların yanında besin miktarının artırılmasına örnek olarak transgenik yöntemler ile büyüme hormonu salgısı çoğaltılarak et üretiminin arttırıldığı balıklar, tüketilen bitkilere aktarılacak genler vasıtasıyla patojen mikroorganizmaların çeşitli proteinlerini sentezleyen bitkiler elde edilmesiyle bu bitkilerden aşı olarak yararlanılması, tedavi amacıyla kullanılmak üzere antihipertansif etkisi olan ovokinin içeren soya, laktoz intoleransı yaşayan kişiler için laktoz içeriği azaltılmış süt uygulaması ve son olarak dayanıklı transgenik pamuk üreticilerini tarım ilacını daha az kullanılmasına bağlı olarak herbisit ve pestisitlerin kullanımındaki azalma, olumlu gelişmeler arasında gösterilmektedir [1]. GDO'nun olumsuz etkileri ve hatta riskleri açısından düşünüldüğünde, çok tartışmalı konulardan birisi olan biyoteknolojik yöntemlerle üretilmiş besinlerin, bir ürünün alerjik proteinini kodlayan geninin bir başka ürüne transferi ile zaten alerjik olduğu bilinen bir besinin bu özelliğinde artış meydana gelmesi veya yeni alerjik proteinlerin ortaya çıkması konusu ile karşılaşılmaktadır. GDO'lar hakkında ses getiren diğer bir konu da, gen aktarımının gerçekleştirilebildiği organizmaları seçmek için işaretleyici gen olarak kullanılan dirençli genlerin aktarılmak istenen asıl genle birlikte kullanılması ve bunun sonucunda sözgelimi antibiyotiğe dirençli genlerden bu amaçla yararlanılmasıdır. Ancak bu genlerin patojen mikroorganizmalara geçmesiyle birlikte ortaya çıkacak enfeksiyonların kontrol altına alınmasının zor olacağı hatta transgenik bitki üretiminde kullanılan bu genlerin doğaya yayılması durumunda ciddi bir tehlike meydana getirebilceği hala çözüme ulaşmamış bir konudur [88]. Dünya çapında yasa haline getirilen tahıllarda, gıdalarda ve bileşenlerde genetik modifiye organizma (GDO) varlığının düzenlenmesi, GDO içeren gıdaların güvenilir ve hassas analiz yöntemlerinin geliştirilmesi ihtiyacını da beraberinde getirmiştir. Bu alanda GDO'nun varlığını tespit için, DNA ve proteine dayalı uygulamalar bulunmaktadır [82].

Bu uygulamardan öne çıkan yöntemler, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve enzim ilintili immün testi (ELISA) yöntemleridir. Protein tayinini hedefleyen ELISA, antijen antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm teknikleri kapsar. ELISA'da bir enzimle konjuge edilmiş antikorun (veya antijen), substrat ile reaksiyon vermesi sonucunda renkli bir ürün elde edilir [98]. Bu yöntemde, spesifik

bir proteine bağlanması için bir antikor, tespiti çoğaltabilmek için ikinci bir antikor (isteğe bağlı) ve ilgilenilen protein standardı ile karşılaştırma yapılarak, reaksiyonun sonucunu bir renk ürünü olarak ölçebileceğimiz, antikora bağlı bir enzim kullanılmaktadır [45]. Kompleks bir teknik olmamasıyla birlikte bu sistemde yer alan bir çok değişken (katı faz, yıkama işlemleri, kullanılan enzim ve substratın seçimi ve etkinliği, reaksiyonların sonlandırılma zamanları) kontrol edilmedilir. Katı faz olarak çoğunlukla mikrotitrasyon plakları şeklinde plastikler önerilirken diğer katı faz materyalleri ferröz boncuklar, plastik boncuklar ve nitroselüloz membrandır. ELISA sisteminde kullanılan enzimler ise; peroksidaz, alkalen fosfataz, beta-galaktozidaz gibi substratları renkli ürüne dönüştürebilme yeteneğinde olan enzimlerdir [98]. ELISA metodu ile ilgili bilgiler ele alındığında, ELISA mikrogram seviyesindeki protein miktarı ile analize olanak sağlaması bu yöntemi öne çıkarır [99].

DNA dizilimini tayin etmeyi hedefleyen yöntemlerden PZR, bir DNA parçacığını taramak ve bir veya daha çok spesifik DNA diziliminin (hedef dizilim) yerini belirlemek için biyokimyasal bir proses kullanır. Eğer ortamda hedef dizilim varsa PZR tekniği ile hedef dizilim çoğaltılır. Böylelikle, PZR, yüksek hassasiyetle ve hedef dizilim bulunan DNA molekülünün miktarını belirlemeyi mümkün kılar [100]. DNA tayinini hedefleyen çalışmalarda, GDO'lu moleküllerin belirlenmesinde hedef DNA olarak kabul edilen promotor ve terminatör genleri belirleyici gen olarak kullanılmaktadır. Başlangıçta, karnabahar mozaik virüsüne ait 35S promotoru ve Agrobacterium'a ait NOS terminatöründen GDO'lu ürünlerin tespiti için yararlanılmıştır. Genel taramada bu genetik elementler hedef dizilim olarak işlev görürler. PZR sonunda bu çoğaltma ürünlerinin bulunmaması transgenik dizilimlerin ürün içinde olmadığını yani GDO'suz bir ürün olduğunu göstermektedir. Diğer bir yandan genetik materyallere rastlanması durumunda GDO'lu ürünün varlığını ya da ürünün karnabahar mozaik virüsü veya Agrobacterium tarafından kontamine olduğunu göstermektedir [8]. PZR reaksiyonunun temeli çift zincirli DNA molekülüne ısıl işlem uygulamasının ardından iki zincir arasındaki hidrojen bağlarının kopması prensibine dayanmaktadır. Reaksiyonun mekanizmasında her PZR istenilen sayıda tekrarlanabilen döngülerden oluşur ve bir PZR döngüsü için üç temel basamak gerekmektedir. Birinci basamak, çift sarmallı DNA iplikçiklerinin yüksek sıcaklık uyglamasının ardından birbirlerinden ayrıldıkları denatürasyon,

ikinci basamak, çoğaltılacak hedef DNA bölgesinin iki ucuna spesifik 20-30 baz uzunluğunda iki nükleotidin uygun sıcaklıkta hedef DNA ile hibridizasyonu, üçüncü basamak ise yeni çift zincirli DNA'lar şeklinde uzamasıdır. Her bir basamak için farklı sıcaklıklar gerekmektedir [8]. Örneğin denatürasyon sıcaklığı için 94 °C gereklidir ve bu sıcaklık DNA iplikçikleri arasındaki hidrojen bağlarını kırmak için yeterlidir. Birbirinden ayrılan DNA iplikçiklerinin tamamlayıcı iplikçikle eşleşebilmeleri için gerekli sıcaklık 55°C' dir. Polimerizasyon basamağı için gerekli olan sıcaklık ise 72°C olup polimeraz enziminin yüksek sıcaklıkta aktivite gösterebilmesi özelliğinden yararlanılarak polimerizasyon basamağı bu sıcaklıkta tamamlanmış olur. Standart bir PZR reaksiyonunda belirtilen bu üç basamak ortalama 30-35 defa tekrar edilerek polimerizasyon ürünü her üç adımlı döngüden sonra bir önceki döngüye göre iki kat artar. PZR'nin öne çıkan en önemli özelliği ise düşük miktarda DNA ile çalışmayı mümkün kılmasıdır [8, 101].

PZR yönteminde anahtar noktalar şunlardır;

- Primerler: Hedef molekül diziliminin tamamlayıcıları olan küçük DNA dizilimleridir.
- Isıya dayanıklı DNA-polimeraz enzimi: (tipik olarak taq polimeraz enzimi) hedef dizilim ile primerlerin etkileşimine bağlı olarak hedef dizilimin yeni kopyalarını sentezleyen enzimdir.
- Isıl döngüleyici: PZR reaksiyon hücrelerinin içeriğini taşımak için programlanabilen ısıl döngülerdir [100].

PZR ile elde edilen polimerizasyon ürünlerinin analizi için jel-elektroforez yönteminden yararlanılarak çoğaltılan ürünün varlığı ve boyutu belirlenir [102-104].

2.3.3.1. GDO Analiz Yöntemleri

Yeni bir tür sayılabilecek olan GDO'lu gıdaların analizinin yapılması, GDO hakkında düzenlenen yasal sınırlamalara uygunluğunu belirlemek bakımından gerekli görülmektedir. Geliştirilen analitik metodlar; gıdalardaki GDO içeriğini spesifik ve doğru tanımlamayı mümkün kılmalı, insan sağlığı üzerinde olumsuz potansiyel etkilerini belirlemede kapsamlı çalışmalar içermelidir. Hedef analizi ve profilleme metodları bu kapsamda öne çıkan yöntemlerdir [105]. GDO analizi için profilleme metodu olarak kabul edilen yöntem foodomiktir ve GDO

araştırmalarında anahtar rol oynar. Foodomik GDO'nun izlenebilirliği ve karakterizasyonu açısından gerekli olan bileşen profile hakkındaki bilgiyi genomik/transkriptomik/proteomik ve/veya metabolomik analizi ile sağlar [105].

Hedef analizinde genetik modifikasyona spesifik iki makromolekül GDO'lu ürünü açığa çıkarmada kullanılır; protein ve DNA. Protein bulmayı hedefleyen yöntemde yukarıda bahsedilen ELISA immun analiz tekniğinin dışında yan-akımlı şeritler (lateral-flow strips) tekniği kullanılır. Bu yöntemin öne çıkan dezavantajı çoklu analiz zorluğu ve spesifik antikorların üretilmesi için pahalı bir yöntem olmasıdır [105]. Ayrıca tek boyutlu SDS jel elektroforez, iki boyutlu SDS jel elektroforez ve Western Blot analizi bu protein temelli yapılan analizler arasında yerini alır [5].

DNA tayinine yönelik analiz yöntemlerinden en çok kullanılanı jel elektroforez ile birleştirilmiş PZR tekniğidir. Bu yöntemde kullanılan etidyum bromid (ethidium bromide) sağlık açısından zararlı bir maddedir ve kullanılan yöntem zahmetlidir. Daha basit ve hızlı bir yöntem arayışı ile DNA biosensör ile yapılan GDO analiz tekniklerinin gelişimini hızlandırmıştır. Bu tekniklerden bazları; DNA-biyosensörüne dayalı-kuars kristal mikroterazi yöntemi (QCM) [106], yüzey plazmon rezonans biyosensörü (SPR) [107], elektokimyasal genosensörü [108] ve DNA biyosensörüne dayalı nanopartiküller [109] ve elektrokimyasal lüminesans (ECL)'dır [4]. Geleneksel PZR yöntemini kullanarak elde edilemeyen degradasyona uğramış DNA miktarını elde edebilmek için gerçek zamanlı PZR (RT-PCR) yönteminden yararlanılmıştır. Bu yöntem GDO miktarını belirleme ve etiket düzenleme uygulamaları için önerilmiştir [110]. GDO analizi için alternatif yöntemler de ortaya konulmuştur. Bunlardan DNA parmak izi yöntemi, GDO' lu ürünün analizini ve karakterizasyonunu DNA parmaz izlerini kullanarak alternatif bir yolla yapmayı mümkün kılmıştır. Parçacık boyutu ve parmak izi profili matriks yaklaşımı diye tanımlanan PZR hedef dizilim moleküllerinin var/yok profilleriyle benzer biçimde derlenebilir. Tekli parçacıklar kopyalanıp referans materyel olarak kullanılabilmesinin yanında GDO orijinli olup olmadığını doğrulamak için sıralanıp dizilim oluşturabilirler [3].

Alternatif yöntemlerden bir diğeri ise mikro dizilimlerdir (microarrays). Yüksek yoğunluklu mikro dizilimler binlerce farklı probdan meydana gelen dizilimleri temsil eder. Prob yüklü mikro dizilimler hedef DNA dizilimlerinin üzerinden örneğin DNA

parçacığıyla örtüşen kısmının olup olmadığı sorusuna cevap vermek için kullanılabilirler. Ayrıca istenilen DNA dizilimin benzer kısımları karakterizasyon temelli PZR ve DNA dizimleri için başarılı bir şekilde referans olarak kullanılabilirler [3]. DNA'ya dayalı GDO analizi için geliştirilen yöntemler arasında; ligaz zincir reaksiyonu (LCR), nükleik asit dizilimine dayanan çoğaltma yöntemi (NASBA), çoğaltılmış fragment uzunluklu polimorfizm (AFLP), rastgele çoğaltılmış polimorfik DNA (RAPD) ve prob hibridizasyonu yer alır [5]. Bu yöntemlerden farklı olarak enzimatik aktiviteye bağlı yapılan GDO analiz yöntemlerinde, proteinin denatürasyona uğramış olması ihtimalinden dolayı işlem görmüş gıdalarda uygulanmasında sınırlandırma yapılmıştır. Bu nedenle işlem görmüş gıdalar için önerilmeyen bir yöntemdir [5].

Bu çalışmada DNA temelli sandiviç immuno-analiz yöntemi geliştirilmeye çalışılmıştır. Hedef GDO'lu ürününün hassas tayini olmak üzere, bu amaç doğrultusunda nanopartiküllerin manyetik ve temas noktası (hot-spot) oluşturabilme özelliklerinden yararlanılarak YGRS'de hassas ölçümler elde edilmeye çalışılmıştır. Öncelikle kullanılacak olan nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılmıştır. Altın manyetik nanokürelerden manyetik seperasyonu gerçekleştirebilmek için, altın nano çubuklardan ise YGRS etiketi olarak faydalanılmıştır. Bir sonraki basamak olan sandiviç yapının oluşturulabilmesi için; partiküllerin modifikasyon aşamasından hibridizasyon aşamasına kadar optimizasyonlar yapılarak en iyi ayrım ve yüksek sinyaller sağlayan yapı elde edilmeye çalışılmıştır.

Prob immobilize edilmiş manyetik nanoküre ve altın nano çubuklar farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilim ile hibridize edilerek oluşturulan sandiviç yapının YGRS ölçümleri alınmış ve kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Raman saçılımına etkisinin incelenmesi paralel amplifikasyon çalışmalarına temel oluşturduğu için prob uzunlukları ile ilgili de optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu yapılan çalışmalar doğrultusunda proba eklenen her bir adenin bazı için spacer kavramı kullanılmış ve 1 spacer, 5 spacer ve 10 spacer problar için farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilim varlığında sandiviç yapı oluşturularak kalibrasyon eğrileri elde edilmeye çalışılmıştır. Hangi spacer için daha uygun ve tekrarlanabilir sonuçlar elde edilebileceği belirlenmiştir. Yöntemin seçiciliğini

belirlemek için pozitif ve negatif kontroller ile hedeften farklı dizilim kullanılmıştır. Daha sonra Bt-176 mısır geninin 35 S kısmı PZR tekniği ile çoğaltılarak elde edilen PZR ürünleri YGRS'den elde edilen sonuçlarla karşılaştırılmıştır.

Son olarak paralel amplifikasyon ile ilgili yapılacak olan kısımda amaçlanan sinyal ve hassasiyet artışının sağlanabilmesi için, sinyal güçlendirmede birinci basamağı oluşturan tamamlayıcı dizilim, prob immobilize edilmiş altın nanoçubuğa bağlanarak elde edilmiş olan sandiviç yapı ile etkileştirilmiştir. İkinci bir sinyal artışı için yine prob immobilize edilmiş altın nano çubuk yapıya gönderilerek iki aşamada da YGRS ölçümleri alınmıştır.

3. Materyal ve Metot

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar ve Biyokimyasallar

Hidrojen tetraklorat (HAuCl4), hekzadesiltrimetil amonyum bromit (CTAB), L-askorbik asit (AA), 11-merkaptoandekanoik asit (11-MUA), %98 etanolamin, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorit (EDC), demir (III) klorit ($FeCl_3$), 2-(N-morfolino)etansülfonik asit monohidrat (MES), sodium borhidrit ($NaBH_4$), $FeSO_4.7H_2O$, perklorik asit ($HClO_4$) ve mutlak etanol Merck (Darmstadt, Almanya), 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve L-alanin Acros'tan (Morris Plains, NJ, ABD), N-Hidroksisülfosüksinimid sodium tuzu (NHS) Pierce Biotechnology (Bonn, Almanya) firmasından, Tris (hidroksimetil(aminometan) ve etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) disodium tuzu Amresco (Solon, OH, ABD), NaCl, Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 J.T. Baker (Deventer, Hollanda), magnezyum klorid hekzahidrat tuzu (MgCl, Acros, New Jersey, A.B.D.), Tween® 20 Merck (Darmstadt, Almanya), etidyum bromid Appli*Chem* (*Darmstadt*, Almanya), sığır serum albümini (BSA), deoksinükleotitler (dNTP) Thermo Fisher Scientific (Vilnius, Litvanya) firmasından temin edilmiştir.

3.1.2 Oligonükleotit Dizilimleri

Tüm oligonükleotitler Alpha DNA (Quebec, Kanada) firmasından satın alınmış ve dizilimler Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan oligonükleotid dizilimleri

Oligonükleotid	Dizilim
Prob 1 (1 spacer)	5´-NH_2-AT CGG CAG AGG CAT-3´
Prob 2 (1 spacer)	5´-CGA TGG CCT TTC CA-NH_2 -3´
Prob 1 (5 spacer)	5´-NH_2-AAA AAT CGG CAG AGG CAT-3´

Prob 2 (5 spacer)	5´-CGA TGG CCT TTC CAA AAA-NH_2 -3´
Prob1 (10 spacer)	5´-NH_2-AAA AAA AAA ATC GGC AGA GGC AT-3´
Prob 2 (10 spacer)	5´-CGA TGG CCT TTC CAA AAA AAA AA-NH_2 -3´
Hedef	5´-GGA AAG GCC ATC GTT GAA GAT GCC TCT GCC GA-3´
Çoğaltıcı	5´-GGAAAGGCCATCGAAAAAGCTACCGGAAAGG-3´
Eşleşmeyen	5´-CCC CAA ATT TGG TCA AAG GGC CTT TTA ACC CC-3’
Primer	5’-PO_4-CTT CAA CGA TGG CCT TTC CGG TGC TTA GTC-3´
Sağ Primer	5´-TTG CTT TGA AGA CGT GGT TG-3´
Sol Primer	5´-GAT TCC ATT GCC CAG CTA TC-3´
Çoğaltılan bölge	5´-TCG GAT TCC ATT GCC CAG CTA TCT GTC ACT TTA TTG TGA AGA TAG TGG AAA AGG AAG GTG GCT CCT ACA AAT GCC ATC ATT GCG ATA AAG GAA AGG CCA TCG TTG AAG ATG CCT CTG CCG ACA GTG GTC CCA AAG ATG GAC CCC CAC CCA CGA GGA GCA TCG TGG AAA AAG AAG ACG TTC CAA CCA CGT CTT CAA AGC AA-3´

3.1.3. Tampon Çözeltiler

EDTA tamponu (500 mM, pH 8) EDTA ile hazırlanmış ve pH ayarlaması için HCl kullanılmıştır.

TAE tamponu (20X) tris bazı, glasiyal asetik asit ve EDTA tamponu (500 mM, pH 8) kullanılarak hazırlanmıştır. Agaroz çözeltisi ve elektroforez yürütme tampon hazırlamak için deiyonize su yardımıyla 1X’e dilüe edilmiştir. Agaroz jel (1.5%) agaroz, etidyum bromid ve 1X TAE tamponu ile hazırlanmıştır.

PBS tamponu (20 mM, pH 7.4) Na_2HPO_4, KH_2PO_4, NaCl kullanarak ve HCl ya da NaOH ile pH ayarlaması yapılarak hazırlanmıştır. Yıkama ve hibridizasyon

işlemleri için kullanılan PBS tamponuna 750 mM NaCl ilave edilmiştir.

PBST çözeltisi için 20 mM PBS tamponu (pH 7.4) hazırlanmış ve üzerine %1 (v/v) oranında Tween 20 ilave edilmiştir.

MES tamponu (50 mM, pH 6.5) MES kullanılarak hazırlanmış ve pH ayarlaması NaOH ile yapılmıştır. EDC/NHS çözeltisi (200 mM EDC ve 50 mM NHS) ve alanin çözeltisi (4 mg/mL) MES tamponunda hazırlanmıştır. Tüm çözeltilerin hazırlanmasında milli-Q kalite su (18 MΩcm) kullanılmıştır.

3.1.4 Ölçüm sistemleri

Çalışmada kullanılması amacıyla sentezlenen altın ve altın olmayan nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları fotodiyot analiz dedektörüne sahip Agilent 8453 UV-Visible spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, A.B.D.) ile kaydedilmiştir. DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc., Laramie, WY, A.B.D.) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel (numune tutma) haznesi ve CCD dedektör ile yapılmıştır. Kullanılan parametreler ise 20X objektif ve yaklaşık 30 μm lazer spot alanı, 100 mW lazer gücü ve 20 sn veri toplama süresi olarak ayarlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

3.2.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Demir nanopartiküllerin sentezlenmesi:

Tez kapsamında manyetik demir nanopartikül sentezi, Fe^{+3} ve Fe^{+2} karışımı kullanılarak oda koşullarında, basit bir reaksiyon düzeneği ile gerçekleştirilmiştir. Sentez işlemine 1.28 M $FeCl_3$ ve 0.64 M $FeSO_4 7H_2O$ toplam 2 ml'de 2 dakika boyunca karıştırılarak başlanmıştır. Demir tuzları çözündürülene kadar çözelti kuvvetlice karıştırılmıştır. Daha sonra, 1 M NaOH çözeltisi 40 dakika boyunca karışım içine damla damla ilave edilmiştir. NaOH eklenmesiyle oluşan demir tuzlarının ileri derecede yükseltgenmesini önlemek için, reaksiyon inert bir atmosferde (azot gazı altında) gerçekleştirilmiştir. Elde edilen demir tuzları 4000 rpm de 5 dakika boyunca santrifüjlenmiştir. Bu işlem üç defa yapıldıktan sonra

demir tuzları üzerine 2 M $HClO_4$ çözeltisi eklenmiş ve 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra 10000 rpm de 20 dakika santrifüj işlemi üç defa tekrar edilerek oluşan açık kahverengi renkli demir nanopartiküllerin üzerindeki fazla miktardaki asit uzaklaştırılmıştır. Oluşan demir hidroksit tuzlarının kontrollü bir şekilde yükseltgenmesiyle kendiliğinden manyetik özellik gösteren demir nanopartiküller elde edilmiştir[111].

Altın kaplı Fe_3O_4 nanopartiküllerin sentezlenmesi:

Au kabuk kaplama işlemi altın kabukları olan demir nanopartiküllerin saklanması için CTAB varlığında gerçekleştirilmiştir. 10 mg Fe_3O_4 nanopartiküller 5 mL su içerisinde süspanse edilmiş ve üzerlerine 1 M NaOH içinde hazırlanan 0.27 M EDTA ilave edilmiştir. Oluşan çözelti 5 dk süreyle sonikatör içinde karıştırılmıştır. Parçacıklar daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Daha sonra, süpernatant atılmış ve nanopartiküller deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Ortaya çıkan çökelti 7 mL 0.1 M CTAB, 3 mL, 0.01 M ve 300 µL $HAuCl_4$ 1 M NaOH ile karıştırılmıştır. Çözelti daha sonra kuvvetlice karıştırılmış, 150 mg hidroksilamin karışımı içine ilave edilmiş ve 3 dakika daha kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Böylece koyu altın kırmızı renkli nanopartiküller elde edilmiş ve partiküller kullanmadan önce 24 saat bekletilmiştir [112].

3.2.1.2 Manyetik Olmayan Nanopartikül Sentezi

Altın çubuk nanopartiküllerin sentezlenmesi:

Altın nanopartiküller çekirdek yönlendirmeli büyüme yöntemi kullanılarak sentezlenmiştir. Çekirdek çözeltisi için, 7.5 mL 0.1 M' lık CTAB çözeltisi, 250 µL of 0.01 M'lık $HAuCl_4$ çözeltisine eklenmiştir. Sonrasında 600 µL 0.01 M'lık buz banyosunda hazırlanmış $NaBH_4$ çözeltisi ilave edilmiş ve 30 dk 30°C su banyosunda tutularak çekirdek çözeltisinin oluşması sağlanmıştır. Altın nanopartikülleri üretmek için 4.75 mL 0.1 M'lik CTAB çözeltisi, 500 µL 0.01 M' lık $HAuCl_4$ çözeltisi ve 60 µL 0.01 M' lık $AgNO_3$ çözeltisi sırasıyla karıştırılmıştır. Çözelti renginin koyu turuncu olduğu gözlenmiş ve sonrasında 100 µL 0.1 M'lık askorbik asit (AA) çözeltisi ilave edilerek büyüme çözeltisi elde edilmiştir. AA ilave edildikten sonra renksiz bir çözelti elde edilmiştir. 10 µL çekirdek çözeltisi büyüme

çözeltisine eklenmiş, sonrasında çözelti birkaç saniye karıştırılmış ve 30°C su banyosunda 1 saat bekletilerek çubuk formunda altın nanopartiküller elde edilmiştir [113].

3.2.2 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen demir nanopartiküllerinin karakterizasyonunu için Geçişli Elektron Mikroskobu (TEM) ve ulrtaviyole spektroskopisinde (UV-Visible) ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir. Optik absorpsiyon spektroskopi ölçümleri 1 cm ışık yoluna sahip kuvars küvetler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu aşamada tek ışık yollu spekrofotometre (Spectronics UV-Vis, Genesis, Madison, WI) kullanılmış ve 300-900 nm dalga boyu aralığında spektrum alınmıştır. TEM için 10 µL örnek Formvar-Karbon kaplamalı bakır ızgara üzerine aktarılmış ve 10 dakika kuruması beklendikten sonra ölçüm alınmıştır. TEM ölçümleri, 120 kV'de Tecnai G2 F30 (FEI Company, Oregon ABD) cihazı kullanılarak yapılmıştır.

3.2.3 Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

3.2.3.1 Manyetik Partiküllerin Yüzey Modifikasyonu

Hedef DNA dizilimini analiz ortamından yüksek oranda izole edebilmek için nanopartiküllerin yüzeylerinde prob DNA dizilimlerinin tutuklanmasına yönelik fonksiyonel grupların oluşturulması gerekmektedir. Bu amaçla manyetik nanopartiküllerin yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tabaka (SAM) oluşturulmuştur. Bu aşamada nanopartikül yüzeyi 11-merkaptoandekanoik asit (11-MUA) ile modifiye edilmiştir. Çalışmada altın kaplı manyetik nanopartiküller kullanılmış ve öncelikle etanol çözeltisi içine aktarılan partiküllerin yüzeylerindeki CTAB'ın uzaklaştırılması için bir mıknatıs yardımıyla partiküller bir araya getirilip sıvı kısım uzaklaştırılarakbu yıkama işlemi 3 kez tekrarlanmıştır. Ardından son hacimdeki derişimi 150 mM olacak şekilde 11-MUA tartılıp etanol içinde hazırlanan manyetik nanopartiküller ile karıştırılmış ve SAM oluşması için oda sıcaklığında karıştırıcı içerisinde 18 saat süreyle bekletilmiş ve bu süre içerisinde tiol gruplarından manyetik nanopartiküller üzerine kimyasal olarak fonksiyonel grupların (karboksil grupları) bağlanması sağlanmıştır. Aşırı 11-MUA, santrifüj ile 13500 rpm ve 10 dakikada nanopartiküllerin biraraya getirilmesi sonrasında sıvı kısmın uzaklaştırılmasıyla atılmıştır. Partikül etanol içinde tekrar dağıtılarak

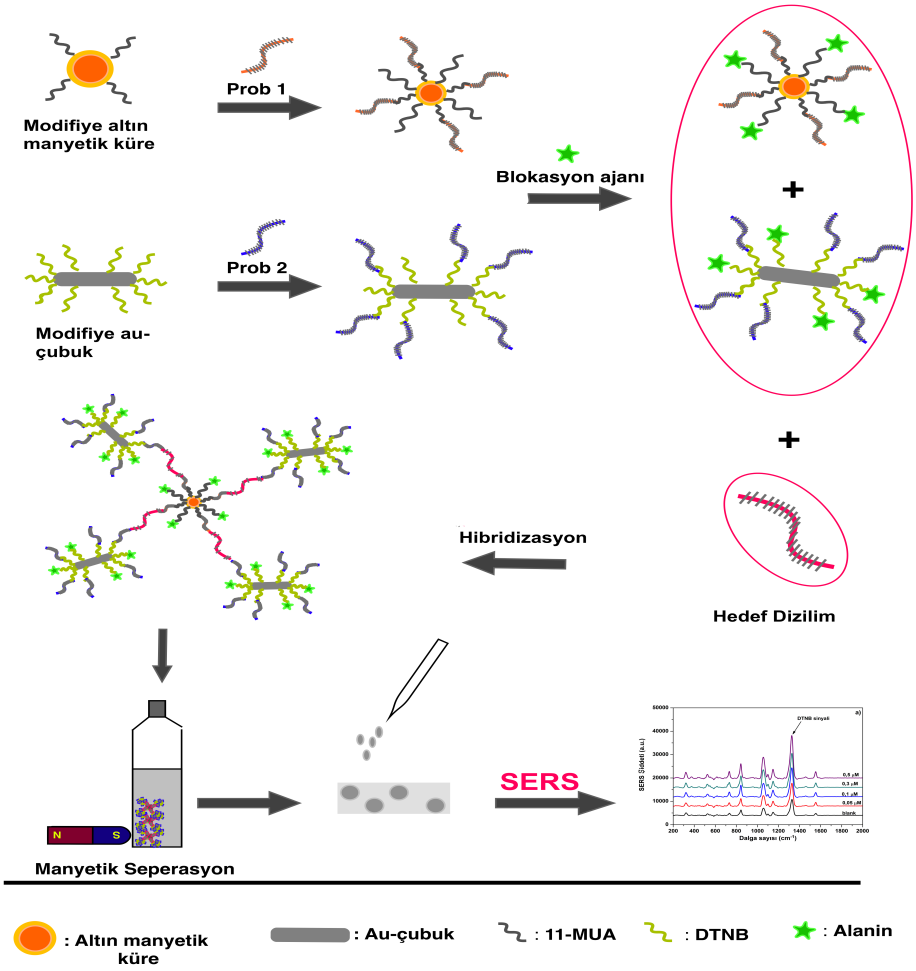
yıkama işlemine geçilmiştir. Nanopartiküller yine santrifüj ile toplanmış ve 0.05 M 2-(*N*-morfolin) etansülfonik asit (MES, pH 6.50) tampon ile yıkanmıştır. Partiküller kullanılmadan hemen önce üzerlerindeki karboksil gruplarının aktifleştirilmesi için MES tamponu içerisinde hazırlanan 200 mM EDC-50 mM NHS ile 40 dakika etkileştirilmiştir.

3.2.3.2 Manyetik olmayan altın çubuk nanopartiküllerin yüzey modifikasyonu

Manyetik partiküllerin yüzey modifikasyonunda olduğu gibi, altın çubuk partiküllerinde yüzeyinde öncelikle SAM oluşturulmuştur. Bu nedenle YGRS işareti olarak bilinen DTNB kullanılmıştır. SAM oluşturmak için 50 mM (5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoik asit) (DTNB) kullanılarak yüzey modifikasyonu yapılmıştır. Yine etanol ve MES tamponu kullanılarak yapılan yıkamaların ardından bu partiküller üzerindeki karboksil gruplarının aktifleştirilmesi için MES tamponu içerisinde 200 mM EDC-50 mM NHS ile muamele edilmiştir.

3.2.4 Nanopartikül Yüzeyine Prob İmmobilizasyonu

Çalışma kapsamında sentezlenen nanopartiküller, analiz ortamında seçici bir şekilde hedef DNA diziliminin izolasyonunda kullanılmıştır. Bu amaçla nanopartikül yüzeyinde hedef DNA dizilimi ile etkileşebilecek probların olması gerekmektedir. Probların nanopartiküller üzerine bağlanmasını ve bunların da hedef DNA dizilimi ile oluşturdukları hibridize sandviç yapı, Şekil 3.1'de şematize edilmiştir. Manyetik ve manyetik olmayan partiküller üzerine prob immobilizasyonun Şöföroğlu [82] tarafından belirlenen 3 µM konsantrasyonundaki prob miktarı baz alınmıştır. Manyetik partiküller için prob1 altın çubuk partiküller için ise prob2 kullanılmıştır. EDC-NHS aktivasyonu yapılmış olan partiküllerin santrifüj ile sıvı kısmı uzaklaştırıldıktan sonra MES tamponunda hazırlanmış prob çözeltisi ortama ilave edilerek 40 dakika karıştırıcı varlığında prob immobilizasyonu geçekleştirilmiştir.



Şekil 3.1. Altın manyetik küre ve Au çubuk nanopartiküller ile hibridize sandviç yapının oluşumu.

3.2.5 Nanopartiküller Arası Seçici Olmayan Etkileşmelerin Önlenmesi

3.2.5.1 Seçici Olmayan Etkileşmelerin Blokasyon Ajanları ile Önlenmesi

Sandviç yapının oluşumunda kullanılan altın kaplı manyetik küre partiküller ile altın çubuk partiküller arasında seçici olmayan etkileşimlerin/bağlanmaların gerçekleşmemesi için yüzeylerinde açıkta kalan grupların bloke edilmesi gerekmektedir. Yüzeylerin blokasyonu için farklı blokasyon ajanları ile farklı denemeler yapılmıştır. Blokasyon ajanı olarak BSA, etanolamin, merkaptoetanol ve alanin kullanılmıştır. Bu denemelere ait ayrıntılı bilgiler aşağıda verilmiştir.

1. Manyetik nanopartiküller, 150 mM 11-MUA ile, altın-çubuk nanopartiküllere ise 50 mM DTNB ile SAM yapılıp bir gece saf etanolde bekletilmiştir.

Yıkama yapıldıktan sonra partiküllere, EDC/NHS aktivasyonu uygulanmıştır. 10 spacer prob ile 40 dakika MES tamponunda etkileşim sağlandıktan sonra yıkamalar yapılmış ve blokasyon aşamasına geçilmiştir. Spesifik olmayan bağlanmalar için BSA blokasyon ajanının yapıda açık kalan aktif uçları yeteri kadar kapatıp kapatmadığına bakabilmek için farklı konsantrasyonlarda (1, 2, 3, 4 mg/mL) BSA kullanılmıştır. Partikül-partikül etkileşimini düşürebilmek için farklı konsantrasyonlarda BSA ile blokasyonu yapılmış altın çubuk ve manyetik küre nanopartiküller, 1 μM konsantrasyonunda hedef dizilim ile 60°C'de 30 dakika inkübasyonda bırakılmıştır. Hibridizasyon sonucunda hibridize olmayan yapıları uzaklaştırmak ve spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile 6 yıkama yapılmıştır. Bahsedilen yapıya bir tanesine hedef dizilim gönderilmeden, diğerine de BSA blokasyon ajanı gönderilmeden 2 farklı blank hazırlanmıştır. Oluşturulan sandiviç yapı için ise DTNB sinyali takip edilerek YGRS ölçümleri alınmıştır. Bu denemede her basamaktan sonra elde edilen yıkama sularının, UV spektrofotometresinde ölçümü alınarak bağlanmayan prob, ortamda kalan hedef molekül ve altın partiküllerin pikleri takip edilmiştir.

Yıkama basamakları:

a. prob bağladıktan sonra alınan yıkama suları
b. BSA ile blokasyon yapıldıktan sonra alınan yıkama suları
c. modifiye altın çubuk ile 1 μM konsantrasyonunda hedef dizilim etkileştikten sonra alınan yıkama suyu
d. sandiviç yapı oluşturulduktan sonra alınan yıkama suları

2. SAM yapılan manyetik küre ve altın çubuklar, sırasıyla prob 1 ve prob 2 ile etkileştirildikten sonra blokasyon ajanı olarak etanol amin (%0.5, %1, %2), alanin (2, 4, 6 mg/ml), merkaptoetanol (50, 100, 150 mM) veya BSA (1, 2, 3 mg/mL) ile bloke edilmiştir. Bu blokasyon ajanlarının iki partikül üzerindeki davranışlarını ölçmek için yapıya hedef dizilim bağlanmadan iki partikül birbirleriyle etkileştirilmiş ve daha sonra manyetik ayırım ile iki partikül birbirinden ayrılmıştır. Yıkama işlemi yine PBS tamponu ile gerçekleştirilmiştir.

3. Spesifik olmayan bağlanmalar partikül-partikül etkileşimleri açısından da değerlendirilmiştir. Bunun için manyetik partiküllere ve altın çubuklara hiçbir modifikasyon yapılmadan iki partikül çıplak olarak birbiriyle etkileştirilmiştir. Daha öncede anlatıldığı gibi PBS tamponu ile yıkama yapılmış ve manyetik ayırım uygulanmıştır. UV spektroskopisinde altın çubuğa ait pikler aranmıştır.
4. Partikül-partikül arası spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçebilmek için partiküller üzerinde farklı kimyasallar ile SAM oluşumu denenmiştir. Bu amaçla, manyetik partikül ve altın çubuk sırasıyla 11-MUA ve DTNB ile bir gece boyunca karıştırıcı üzerinde muamele edilmiş, ertesi gün ise bu partiküllerin her biri üzerine PEG (Triethlene glycol mono-11-mercaptoundecyl ether) eklenmiş ve 1 gece daha bekletilmiştir. İnkübasyon sonrası partiküller 2 kez etanol ile yıkanmış ve birebir oranında karıştırılmış ve 30 dk bekletilmiştir. Süre sonunda manyetik ayrım yapılmış ve manyetik partiküller üzerinde DTNB sinyali olup olmadığına bakılmıştır.

5. Denemelere diğer blokasyon ajanları ile devam edilmiştir. Öncelikle altın çubuk partiküller, 50 mM DTNB ile 1 gece karıştırıcıda bekletildikten sonra 5'e bölünmüş, biri DTNB ile kalacak şekilde diğerlerinin üzerine 20'şer mM 3-merkaptopropiyonik asit, 11-merkaptoundekanoikasit, dekantiol ve merkaptoetanol eklenerek SAM yapılmıştır. Yine bu işlemin tamamlanabilmesi için nanopartiküller karıştırıcıda 1 gece bekletilmiştir. Blokasyon ajanlarının DTNB sinyali üzerindeki etkisini belirlemek için YGRS sinyalleri kontrol edilmiştir. Daha sonra bu partiküller, hedef dizilim ile 60°C'de 30 dakika etkileştirilerek bağlanma olup olmadığı kontrol edilmiştir.

   Altın çubuklar için yapılmış olan spesifik olmayan bağlanma kontrolü, manyetik partiküller için de denenmiştir. Bunun için altın manyetik partiküller 50 mM 11-MUA ile bir gece karıştırıcıda bekletildikten sonra dörde bölünmüş, biri MUA'lı kalacak şekilde diğerlerinin üstüne 20 mM dekantiol, 5 mM PEG ve 20 mM MPA eklenerek 1 gece daha bekletilmiş ve SAM oluşumu sağlanmıştır. Daha sonra hedef dizilim ile etkileştirilmiş ve yıkama sularından gelen hedef molekül miktarına bağlı olarak SAM'in partikül yüzeylerini kapatmadaki etkinliğine bakılmıştır.

6. 50 mM DTNB ile kaplanmış altın-çubuk ve 50 mM 11-MUA ile kaplanmış altın manyetik partiküller, EDC/NHS ile aktive edilmiş, ortama problar eklenmeden tekrar blokasyon ajanları ile açık uçları kapatılmıştır. Sonrasında partiküller birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Blokasyon ajanı olarak %2 ve %3'lük etanol amin ile 4 ve 6 mg/ml alanin kullanılmıştır. Blank olarak bloke edilmemiş fakat EDC-NHS ile aktive edilmiş partiküller kullanılmıştır. Yıkamalar sonunda yıkama sularında UV ve YGRS ölçümleri yapılmıştır.

   Yapılan ölçümler sonucunda 4 mg/mL alanin ile blokasyon yapılmasına karar verilmiş ve deneme tekrar edilmiştir. Bunun için çubuk ve küre partiküller yine sırasıyla 50 mM DTNB ve 50 mM 11-MUA ile kaplanmış, EDC-NHS çözeltisi ile aktive edildikten sonra 4 mg/mL alanin ile bloke edilmiştir. Üzerlerinde blokasyon ajanı olmadan karşılaştırılan partiküller de blank olarak hazırlanmıştır. Modifiye edilmiş partiküller birbirleriyle karşılaştırmış daha önce olduğu gibi manyetik ayırım ile 6 kez yıkanmıştır. Blokasyonun etkinliği, YGRS'den alınan ölçümler ile kontrol edilmiştir.

   Yukarıda anlatılan denemelerin sonrasında alaninin blokasyon ajanı olarak kullanılması durumunda spesifik olmayan bağlanmaları engelleyerek kalibrasyon eğrisi çıkartılıp çıkartılamayacağı araştırılmıştır. Bu aşamada, yüzey modifikasyonları ve yüzey aktivasyonları yapılmış partiküllerin üzerine 10 spacer problar bağlanmış, yıkamalardan sonra açıkta kalan bölgeler 4 mg/mL alanin ile bloke edilmiştir. Ortamda fazla kalan alaninin uzaklaştırılması için tekrar yıkamalar yapılmıştır. Hedef dizilim ekleme aşamasına gelindiğinde pH 6.5'deki MES tamponundan pH 7.4'te kullanılan PBS tamponuna geçilerek yıkama yapılmıştır. Modifiye edilmiş altın-çubuk ile 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 μM konsantrasyonlarında hedef dizilim 60°C su banyosunda 30 dakika etkileştirildikten sonra yine modifiye altın manyetik partiküllerle karşılaştırılıp hibrit yapının oluşturulması sağlanmıştır. Hibridize olmayan yapıları uzaklaştırmak ve spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile 6 yıkamanın ardından TLC kağıt üzerine 1 μL damla damlatılarak YGRS' de sinyaller takip edilmiştir.

7. Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için yapılan denemelerin bir kısmı da analiz ortamında bulunan partiküllerin ve moleküllerin konsantrasyonlarının indirgenmesini içermektedir.

   Öncelikle altın manyetik partiküllerde 150 mM 11-MUA kullanılırken bu miktar 20 mM 11-MUA'ya düşürülmüştür. DTNB'nin konsantrasyonu değiştirilmemiş yine 50 mM konsantrasyonunda devam edilmiştir. 1 gece SAM yapılan partiküller yıkamaların ardından EDC-NHS ile aktive edildikten sonra konfirmasyonu oluşan partiküllerde seyreltilme yapılmıştır. Altın manyetik partiküller 1:5 oranında seyreltilmiştir. Altın-çubuk'larda ise seyreltme uygulanmamıştır. Her iki partiküle de 1 spacer prob eklendikten sonra yıkamaları yapılmış ve blokasyon ajanı olarak 4 mg/mL alanin ile muamele edilmiştir. Yıkamaları yapıldıktan sonra önce altın-çubuklar 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 μM konsantrasyonlarında hedef dizilim ile 60°C su banyosunda 30 dakika etkileştirilmiş daha sonra altın manyetik partiküllerle yine 60°C su banyosunda karıştırıcı üzerinde 30 dakika karşılaştırılmıştır. 6 PBS yıkamasının ardından TLC kağıt üzerine 1 μL örnek damlatılarak YGRS' de ölçüm alınmıştır.

   Altın manyetik partiküllerde yapılan seyreltmelerden sonra altın-çubuk partiküller üzerinde de seyreltme yapılarak sistem davranışı görülmek istenmiştir. Bunun için altın-çubuk partiküllerin yüzey modifikasyonu için 50 mM DTNB konsantrasyonu kullanılarak sonrasında EDC-NHS aktivasyonu yapılmıştır. Altın manyetik partiküller ise 50 mM yerine 20 mM konsantrasyonunda 11-MUA ile muamele edilip 1:5 oranında seyreltilmiştir. Deneme, yukarıda anlatılan prosedür ile gerçekleştirilmiştir. Bu denemenin ardından 1 spacer prob için denemeler tekrarlanmıştır.

8. Diğer bir deneme yukarıda anlatılan tüm çalışmaları aşama aşama içerecek şekilde kurulmuştur, farklı olabilecek alternatifler denenmiştir. Partiküller yine 11-MUA ve DTNB ile etkileştirilmişir. Ancak bu sefer her iki kimyasalından konsantrasyonu 20 mM'a indirilmiştir. Partüküllere bağlanmayan moleküllerin ortamdan uzaklaşması için etanol ve ardından 50 mM, pH 6.5'teki MES tamponu ile yıkama yapılmıştır. Altın manyetik

partiküllere EDC-NHS aktivasyon aşamasından sonra 1:5 oranında seyreltme uygulanmıştır. Denemelerin aşama aşama gösterilebilmesi için ilk önce SAM yapılmış nanopartiküller birbiri ile etkileştirilip ardından yıkamaları yapılmıştır. Yıkamalar, 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile gerçekleştirilmiştir. Yıkamaların ardından TLC kağıt üzerine 1 µL damlatılarak YGRS sinyallerine bakılmıştır.

Bir sonraki basamak olan yüzeylere bağlanmış karboksil gruplarının EDC-NHS aktivasyonudur. Aktivasyondan sonra altın manyetik partiküller, 1:5 oranında seyreltilmiştir. İki partikül aktivasyon sonrası PBS tamponuna alınmış, santrifüj ile çöktürüldükten sonra 30 dakika karıştırıcı varlığında birbiriyle karşılaştırılmıştır. Manyetik seperasyon ile PBS yıkamalarının ardından TLC kağıt üzerine 1µL damlatılmıştır ve YGRS ölçümleri alınmıştır.

Aktivasyon aşamasından sonra aktif uçlara prob bağlama basamağına geçilmiş ve EDC-NHS ile aktivasyonu sağlanmış karboksil gruplarına 3 µM konsantrasyonunda 5 spacer prob bağlanmıştır. Prob etkileşimi için 40 dakika karıştırıcıda bekletildikten sonra iki partikülün karşılaşma ortamı için prob bağlı partiküller PBS tamponuna alınmıştır ve iki partikül birbiriyle karşılaştırılarak 30 dakika karıştırıcıda bekletilmiştir. Manyetik seperasyon tekniği ile PBS yıkamalarının ardından TLC kağıt üzerine 1µL damlatılmıştır ve YGRS ölçümleri alınmıştır.

Son basamak sandviç yapının oluşturulmasıdır. Yukarıda anlatıldığı şekilde partikül yüzeylerinde SAM oluşturulmuş, EDC-NHS aktivasyonu yapılmış üzerlerine ilgili 5 spacer problar bağlanmıştır. Altın manyetik partiküller 1:5 oranında seyreltilmiştir. Açıkta kalan aktif uçlar, 4 mg/mL alanin ile kapatılmış, bu işlem 40 dakika karıştırıcı varlığında gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki bağlanmayan alanin molekülünü uzaklaştırmak amacıyla 1 kere MES ile ve 2 kere de 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Üzerlerine prob bağlanan partiküller, 0.05, 0.1, 0.5 ve 1 µM konsantrasyonunda hedef dizilim ile bir araya getirilmiş ve 60°C'de 30 dakika karıştırıcı varlığında inkübasyona bırakılarak hibrit yapının oluşumu için beklenmiştir. Hibridize olmayan yapıları uzaklaştırmak ve spesifik

olmayan bağlanmaları azaltmak için 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile yıkamaların ardından TLC kağıt üzerine 1 µL damlatılarak YGRS sinyallerine bakılmıştır.

3.2.5.2 Seçici Olmayan Etkileşmelerin Yıkama Prosedürleri ile Önlenmesi

Partiküller arası spesifik olmayan etkileşimleri gidermek için yapılması gereken işlemlerden biri de farklı yıkama prosedürlerinin uygulanmasıdır. Bunun için partiküller, farklı aşamalarda farklı yıkama prosedürleri uygulanarak bir araya getirilmiştir. İlkinde yüzeyleri aktive edilip prob bağlanan partiküller sanki ortamda hedef dizilim varmış gibi bir araya getirilmiş manyetik olan ve olmayan partiküller yüzeylerinde SAM oluşturulduktan sonra birbirleriyle etkileştirilmiş ve etanolle, pH 4'e ayarlı PBS ile, %1 ve %2'lik Tween 20 içeren PBS (PBST) ile manyetik ayırım yapılarak yıkanmıştır. Partiküllerin kendi spesifik spektrumlarından 520 ve 720 nm dalga boyu takip edilerek UV'de ölçüm alınmıştır.

3.2.6 Nanopartiküller Arası Optimum Mesafenin Belirlenmesi

Yapılan optimizasyonların ardından manyetik nano küre ve altın çubuklar üzerine ommobilize edilen probların partiküller arası mesafeye ve dolayısıyla partiküllerin de birbirinden uzak olması durumunda elde edilecek sandviç yapının yöntemin etkinliğine katkısı olup olmayacağı araştırılmıştır. Bu amaçla prob 1 ve prob 2 (Çizelge 3.1), partiküllere bağlandıkları $–NH_2$ uçlarındaki Adenin bazları 1, 5 ve 10 adet olacak şekilde ayrı ayrı sentezletilmiştir ve sırasıyla 1 spacer, 5 spacer ve 10 spacer prob olarak adlandırılmıştır. 1 spacer, 5 spacer ve 10 spacer prob kullanılarak hedef dizilim varlığında sandiviç yapı oluşturulmuş ve YGRS ölçümleri ile alınan sinyallerden kalibrasyon eğrileri çıkarılmıştır. Hangi probun kullanılması durumunda daha uygun sonuçlar elde edilebileceği görülmek istenmiştir.

Bu amaçla, altın manyetik nanopartiküllerin üzerinde serbest karboksil grubları oluşturmak için 11 merkaptoundekanoik asit (11-MUA), altın-çubuk nanopartiküllere ise aynı zamanda işaretçi olarak kullanılan 5,5′-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) ile SAM yapılıp bir gece saf etanolde bekletilmiştir. Partüküllere bağlanmayan moleküllerin ortamdan uzaklaşması için yine etanol ile yıkama yapılmıştır. Partiküller, yüzeylerine bağlanmış karboksil gruplarının

aktivasyonu için, 50 mM, pH 6.5'teki MES tamponunda hazırlanan EDC)/NHS (0.2 M/0.05 M) ile 40 dakika karıştırıcı üzerinde etkileşime bırakılmıştır. Daha sonra altın manyetik partiküllere 3 μM prob1 dizilimi, altın çubuk partiküllere ise 3 μM prob2 dizilimi 50 Mm, pH 6.5'taki MES tamponunda 40 dakika immobilize edilmiştir. Denemelerde 1, 5 ve 10 spacer problar kullanılmıştır.

Açıkta kalan aktif uçların varlığı düşüncesiyle blokasyon ajanı olarak 4 mg/mL alanin kullanılmış, 40 dakika süresince karıştırıcı üzerinde etkileştirilmiştir. Ortamdaki bağlanmayan alanini uzaklaştırmak amacıyla 1 kere MES tamponu ve 2 kere de 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile yıkama yapılmıştır. Üzerlerine prob bağlanan partiküller, farklı konsantrasyonlarda hedef dizilim ile bir araya getirilmiş ve 60°C'de 30 dakika karıştırıcı üzerinde inkübasyona bırakılarak hibrit yapının oluşumu için beklenmiştir. Hibridize olmayan yapıları uzaklaştırmak ve spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile 6 yıkamanın ardından TLC kağıt üzerine 1 μL damlatılarak YGRS sinyallerine bakılmıştır.

3.2.7 Paralel Amplifikasyon

Yukarıda anlatılan çalışmalar doğrultusunda; manyetik altın nanoküre ve altın çubuk nanopartiküller sırasıyla 20 mM MUA ve 20 mM DTNB ile karşılaştırılmış ve yüzeylerinde SAM oluşturulmuştur. Yüzeyde oluşan karboksil gruplarının aktivasyonu, MES tamponu içerisinde hazırlanmış 200 mM EDC-50 mM NHS ile yapılmıştır. Her iki partikülün yüzeyinden fazla EDC-NHS uzaklaştırmak santrifüf ile sıvı kısım uzaklaştırılmıştır (13500 rpm 6 dk). Daha sonra partiküller üzerine sırasıyla 3' er μM prob 1 ve prob 2 immobilize edilmiş, bağlanmayan problar yine MES tamponu ile 13500 rpm'de 6 dk santrifüj edilerek 2-3 kez yıkanmıştır. Blokasyon ajanı olarak 4 mg/mL alanin kullanılarak açık yüzeyler kapatılmış, bu işlem 40 dakika karıştırıcı varlığında gerçekleştirilmiştir. Alanin fazlası 1 kere MES 2 kere 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile yıkanarak aynı santrifüj normunda uzaklaştırılmıştır. Farklı konsantrasyonlarda hedef dizilim (0, 0.05, 0.1 ve 0.3 μM) önce DTNB işaretli altın çubuk nanopartiküllerle karşılaştırılmış ve ardından manyetik nanopartiküllerle karşılaştırılarak 60°C'de 30 dakika beklendikten sonra hibiridizasyon gerçekleştirilmiştir. Süre sonunda bağlanmayan veya zayıf bağlanan hedef dizilimler, 3-4 kez PBS ile yıkanmıştır. Yıkama manyetik ayrım ile

gerçekleştirilmiştir. Ortamdaki hedef dizilimin tespit edilebilmesi için sandviç yapılar oluşturulduktan sonra TLC üzerinde olmak üzere yüzeyde DTNB sinyali takip edilerek ölçümler alınmış ve kalibrayon eğrisi çıkartılmıştır. Bir taraftan sandviç yapı oluşturulurken diğer taraftan sandviç yapıdan alınacak sinyali artıracak diğer yapı hazırlanmıştır. Daha sonra altın çubuk üzerinde bağlı olan prob 2'nin komplementeri olan oligonükleotit ile hibridize olmuş yapı, oluşturulan sandiviç yapıya gönderilmiştir ve 60°C'de 30 dakika beklenerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Komplementer oligonükleotit aynı zamanda diğer ucundan da sandviç yapıda bulunan prob 2'nin komplementeridir. Kullanılan oligonükleotitin her iki ucu prob 2'nin komplementeri olacak şekilde dizayn edilmiştir. Paralel amplifikasyonun birinci basamağı olan yapı oluşturulduktan sonra ortamda aşırı olan komlementer dizilimleri uzaklaştırmak için manyetik ayırım ile 2 kere PBS yıkaması yapılmıştır. Son olarak ikinci paralel amplifikasyon için prob 2 ile immobilize edilmiş altın çubuk paralel amplifikasyonun birinci basamağinda oluşturulan yapıya gönderilerek 60°C'de 30 dakika inkübe edilmiş ve yapı büyütülmüştür. İnkübasyon sonucunda 2-3 PBS yıkamasının ardından örnekler, 1' er µL TLC kağıt üzerine damlatılmış DTNB sinyalleri takip edilmiştir. Sinyal artışı ile birlikte hassasiyet artışı olup olmadığı inecelenmiştir.

3.2.8. Pozitif ve Negatif Kontroller

Yötemin hedef dizilime seçiçiliğini kontrol etmek amacıyla hedef dizilimden farklı bir dizilim (noncomplemantary) ile sandviç yapı oluşturulmaya çalışılmıştır. Bu amaçla yukarıda açıklanan prosedür tekrar edilmiş ve YGRS sinyalleri alınmıştır. Hedef dizilimden elde edilen YGRS şiddeti, 100 kabul edilmiş ve blank ile hedef dizilimden farklı dizilimin relatif şiddeti verilmiştir.

Geliştirilen metodun doğruluğunu ortaya koymak amacıyla Bt-176 mısır geninin 35 S bölgesinin 200 bazlık bölgesi PZR ile çoğaltılılarak elde edilen PZR ürünü gerçek örnek denemesi için kullanılmıştır. PZR ürünü elde etmek için 50 µL 1X PZR kit kullanılmıştır. PZR karışımı: 1X PZR kiti ($MgCl_2$ (2 mM), dNTP (0.2 mM), Taq DNA polimeraz (0.025 U/µL)), Bt-176 mısır DNA modeli (2 µL) ileri ve geri primerler (0.5 µM) ile hazırlanmıştır. Amplifikasyonun başlangıç denatürasyon basamağı 95°C'dir. Ardından 62°C'de 1 dk uzama basamağı ve 72°C'de 10 dk son büyüme basamağı ile PZR tamamlanmıştır.

Agaroz çözeltisi ve elektroforez yürütme tampon hazırlamak için deiyonize su yardımıyla 1X'e seyreltilmiştir. Agaroz jel (1.5%) agaroz, etidyum bromid ve 1X TAE tamponu ile hazırlanmıştır.

%1.5 agaroz jel hazırlamak için 0.5 g agaroz 50 mL 1X TAE tamponu içerisinde çözülmüştür. Jelin sıcaklığı 60°C'ye gelince distile su ile hazırlanan 5 mg/mL'lik etidyum bromür çözeltisinden 5 L eklenmiştir. Çok karıştırıldıktan sonra jel kabına dökülmüştür.

Elde edilen PCR ürünü gerekli seyreltmeler yapılarak 0.5 ve 0.2 µM olarak yukarıda açıklanan prosedürde olduğu gibi hedef dizilimi ekleme aşamasında yapıya dahil edilmiş ve YGRS ölçümleri alınmıştır. PCR koşulları Çizelge 3.2'de verilmiştir.

Çizelge 3.2. PZR koşulları

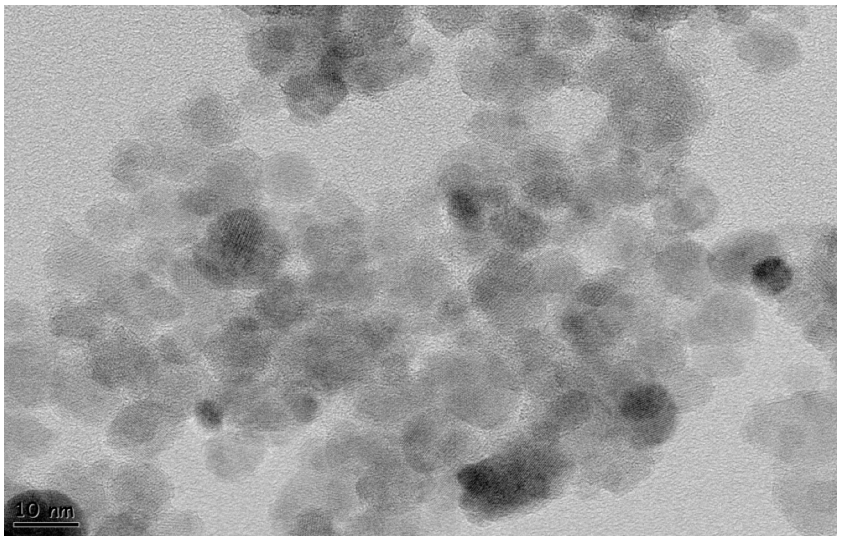
	Sıcaklık	Zaman
İlk Denatürasyon	95 ºC	4 dk
Denatürasyon	95 ºC	1 dk
Primer Bağlanması	62 ºC	1 dk
Primer Uzaması	72 ºC	1 dk
Son Primer Uzaması	72 ºC	10 dk
Soğutma	4 ºC	∞
Döngü Sayısı	50	

4. BULGULAR

4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

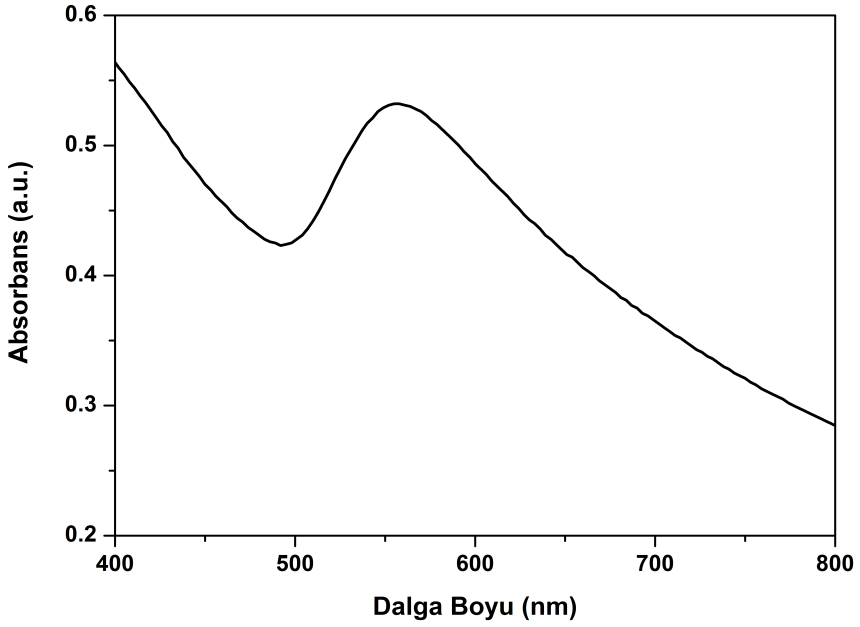
4.1.1 Altın Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Altın nanopartikülün metal optik özelliklerini ve Fe_3O_4 manyetik özelliklerini sergileyen bir çekirdek-kabuk yapılandırılması hedeflenmiş olup Au-Fe_3O_4 hibrid partikül oluşturmak için iki aşamalı bir süreç izlenmiştir. Öncelikle hazırlanan Fe_3O_4 nanopartiküller homojen EDTA çözeltisi içinde dağıtılmıştır. İkinci olarak, yüzey aktif madde çözeltisi 0.1 M CTAB ve %30'luk altın klorür tuzu karışımının varlığında, hidroksilamin çözeltisi içinde Au^{+3}, Au^0 indirgenmiş ve altın reaktif olarak EDTA tutuklanmış Fe_3O_4 partiküller yüzeyinde kimyasal olarak biriktirilmiştir. Stabilize etmek ve daha düzgün ve homojen bir altın tabaka elde etmek için, altın prekürsör iyonları doğrudan hidroksilamin kullanılarak indirgenmiştir. Altın kaplama işlemi daha iyi partikül dağılımı elde etme ve topaklaşma probleminin önüne geçmek için CTAB ve EDTA varlığında gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.1'de küresel şekilli altın demir nanopartiküllerin yüksek çözünürlüklü TEM (HRTEM) görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsünde de görüldüğü üzere büyük miktarda eş boyutlu nano yapılar üretilebilmiştir. TEM görüntüsü üzerinden yapılan ölçümler sonucunda küresel şekilli altın kaplı demir nanopartiküllerin 9±2 nm arasında bir çapa sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.1. Altın manyetik nanopartiküllerin HRTEM görüntüsü.

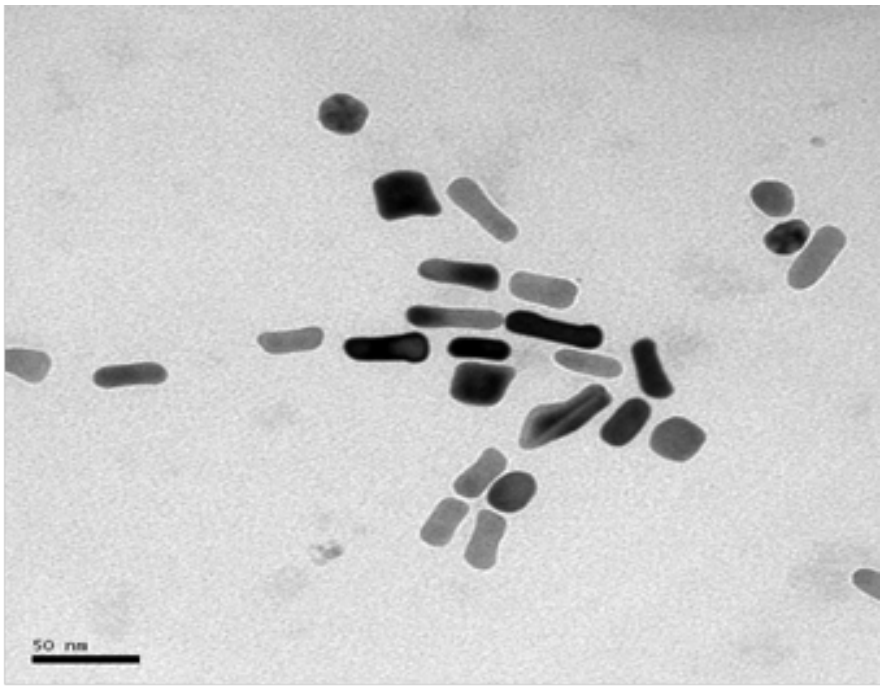
Şekil 4.2’de sentezlenmiş küre biçimli altın kaplı demir nanopartiküllerin spektrumları görülmektedir. Yüzey plazmonun karakteristikleri nanopartiküllerin şekil, boyut ve agregatlaşma özellikleriyle ilişkilendirilmiştir. Şekil 4.2’de görüldüğü üzere altın kaplı demir nanopartiküller 546 nm'de plazmon bandına sahiptir.



Şekil 4.2. Altın manyetik nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

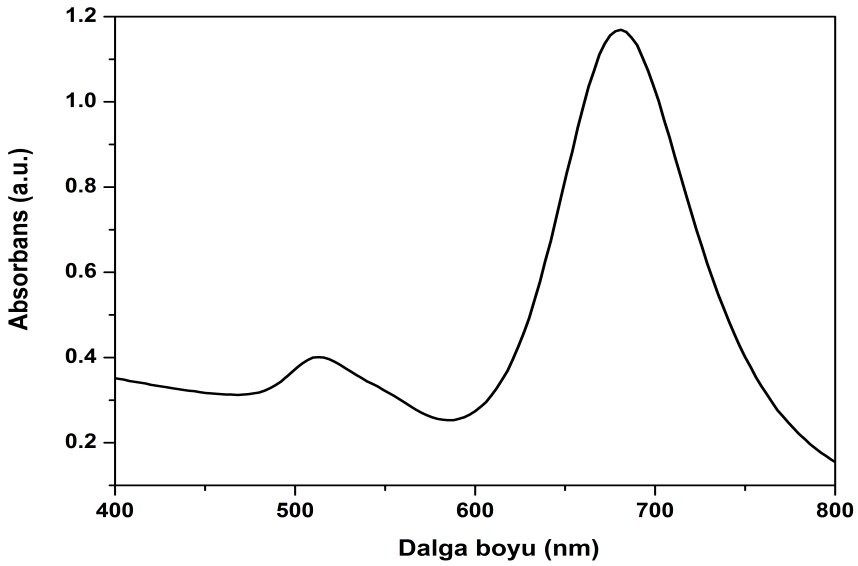
4.1.2 Manyetik Olmayan Çubuk Şekilli Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Altın kaplı çubuk şekilli nanopartiküller, TEM’ de incelenmiştir. Şekil 4.3’de bu çubuk formlu altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü verilmiştir. TEM görüntüsü üzerinden yapılan ölçümler sonucunda çubuk formunda altın nanopartiküllerin ortalama 15x45 nm boyutlarına sahip olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.3. Çubuk formunda altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Partiküllerin optik özellikleri ve şekilleri hakkında fikir veren absorpsiyon spektrumları Şekil 4.4'de verilmiştir. Şekilde görülen ilk plazmon bandı çubuk formunda altın nanopartiküle ait 510 nm deki çapraz (enine) plazmon bandıdır. Spektrumda 675 nm deki plazmon bandı ise çubuk formunda altın nanopartikül için boylamasına plazmon bandı olarak tanımlanan banttır.



Şekil 4.4. Çubuk formunda altın nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları

4.2. YGRS ile Hedef Dizilim Tayini

4.2.1. Hedef Dizilim Tayini için Kullanılan Parametreler

Bu çalışmada sandiviç yapının oluşturulması için gerekli olan nanopartikül yüzeylerine prob immobilizasyonu ve konsantrasyonları, hedef dizilim konsantrasyonları, yıkama basamakları, işaretçi molekülün ve nanopartikül miktarının konsantrasyonu basamaklarının optimize edilmesinde aşağıdaki parametreler takip edilmiştir ve detaylar aşağıda verilmiştir;

Manyetik ve manyetik olmayan partiküllerin üzerlerine prob immobilize edilip hedef dizilim varlığında sandviç yapının eldesinden önce kullanılacak probların ve hedef dizilimlerin miktarları seçilmiştir.

-**Manyetik ve Manyetik Olmayan Altın çubuk Nanopartiküllerin optimizasyonu**: Nano partiküllere bağlanacak prob 1 ve prob 2'nin mikatarını belirlemek için etanol içinde partiküllere SAM yapılmış ardından EDC-NHS ile karboksil uçlarının aktivasyonu sağlanarak prob etkileşimi gerçekleştirilmiştir. Optimum prob konsantrasyonu 3 μM olarak bulunmuştur [82].

-**Yıkama aşaması optimizasyonu**: Prob 2'nin altın çubuk partiküller üzerine tutuklanmasında yıkama işlemlerinin süreci nasıl etkilediği incelenmiştir. Bu amaçla DTNB ile yüzeyinde SAM oluşturulan altın çubuk partiküllere MES tamponu içerisinde hazırlanan EDC-NHS ile yüzey aktivasyonu işlemi uygulandıktan sonra yıkamanın etkisine bakılmıştır. Elde edilen sonuçlara bakıldığı zaman, yüzey aktivasyonu sonrası yıkama yapmadan immobilizasyon işlemine geçilmesinin bağlanma verimini olumlu yönde etkilediği sonucuna varılmıştır [82].

-**Tuz konsantrasuonu optimizasyonu**: Literatürde yer alan çalışmalarda ve grubumuz tarafından daha önce de gerçekleştirilen çalışmalarda 750 mM NaCl içeren PBS tamponlarındaki hibridizasyon oranının daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmalarda uygulanan koşullar da değerlendirilerek, 750 mM NaCl içeren PBS tamponunda elde edilen verimin de maksimum elde edilen değer oldukça yakın olması nedeniyle hibridizasyonun 750 mM tuz içeren PBS içerisinde gerçekleştirilmesine karar verilmiştir [82].

-**Hedef DNA molekülünün optimizasyonu**: Ortamda hedef DNA molekülünün bulunması durumunda gerçekleşecek hibridizasyon koşullarının optimizasyonu için farklı sıcaklıklar incelenerek ortamda hem prob 1 hem de prob 2 olduğunda sandviç yapının sıcaklıktan nasıl etkilendiği incelenmiştir. Artan sıcaklıklarda gerçekleştirilen hibridizasyonlardan elde edilen bant şiddetlerinde artış gözlenmesi yanında düşük sıcaklıklardaki sonuçlara göre daha tutarlı sonuçlar da elde edilmiştir. Bu yüzden hibridizasyon sıcaklığı 60ºC olarak seçilmiştir [82].

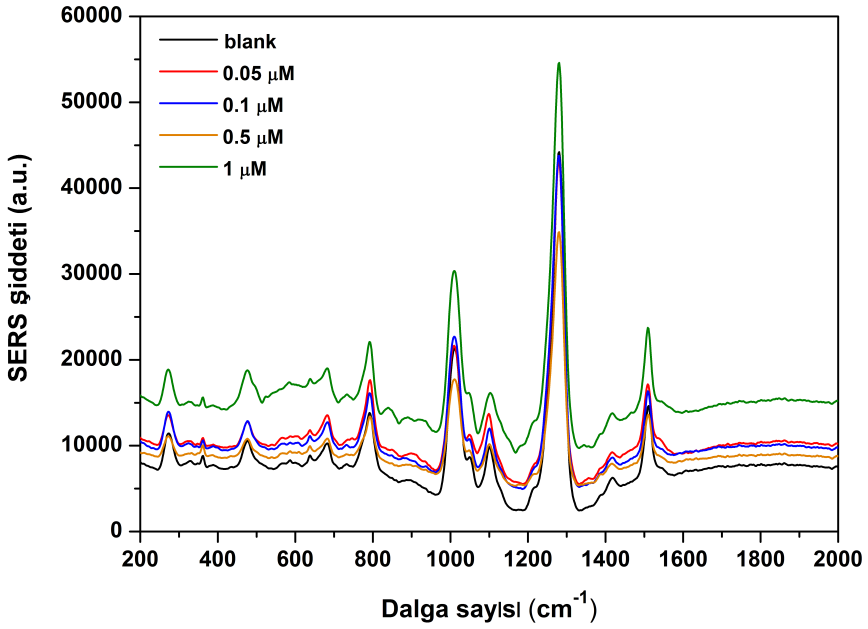
-DTNB Konsantrasyonunun Optimizasyonu: Kullanılacak DTNB konsantrasyonunun optimizasyonu için altın nanoçubuk yüzeylerinde SAM oluşturulurken, 25-100 mM arasında değişen DTNB kullanılmış ve bunun bant şiddetleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Raman spektroskopisinde alınan ölçümler sonucunda 50 mM DTNB konsantrasyonun en yüksek bant şiddeti verdiği için SAM konsantrasyonu olarak bu değer tercih edilmiştir [82].

4.2.2. Nanopartiküller Arası Mesafenin Optimizasyonu

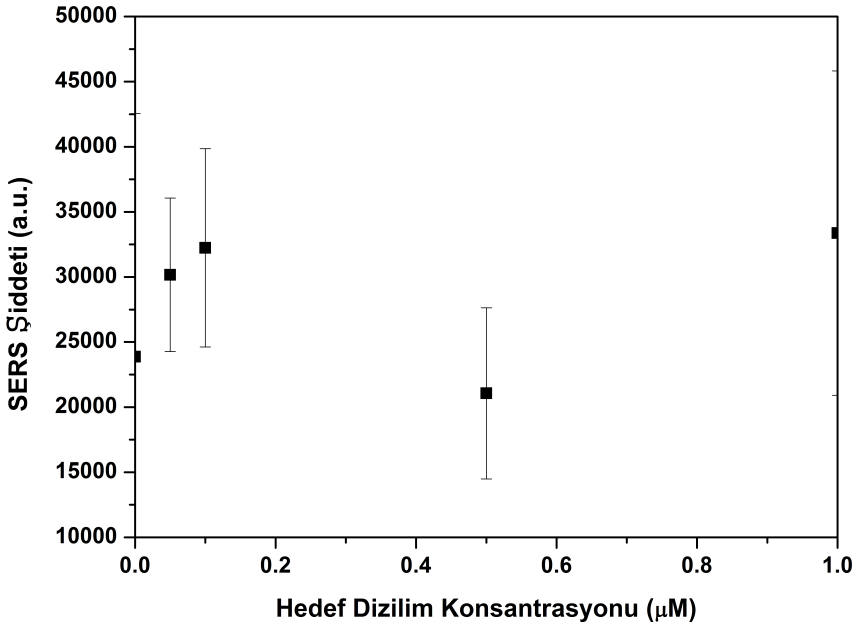
Oluşturulacak olan sandviç yapıda nanopartiküller arası mesafenin yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılımına etkisinin incelenmesi hedeflenmiştir. Bu bölümde yapılmış olan çalışmalar paralel amplifikasyon çalışmalarına alt yapı oluşturmaktadır. Çünkü bir paralel amplifikasyon için kullanılacak olan probun uzunluğu bu kısımda belirlenecektir. Nanopartiküllere bağlanan probların partikülden uzaklığı dolayısıyla manyetik partikül ile altın çubuk partikülün birbirlerine farklı mesafelerde olması durumunda yöntemin etkinliği ölçülmüştür. Mesafeler, probların asıl dizilimleri başlamadan önce partiküllere bağlandıkları uçlarında 1 (0.34 nm), 5 (1.7 nm) veya 10 (3.4 nm) adet adenin bazı eklenerek sentezletilmesiyle elde edilmiştir. 1 spacer, 5 spacer ve 10 spacer problar için hedef dizilim varlığında sandiviç yapı oluşturularak kalibrasyon eğrisi ve hangi spacer için daha uygun sonuçlar elde edilebileceği görülmek istenmiştir. Problar aracılığı ile partiküller arası mesafenin değişmesi ve hedef-prob etkileşme ve YGRS güçlendirme düzeyinin farklılaşması ve bu sayede analiz performansının optimize edilmesi öngörülmüştür.

Yüzey modifikasyonu ve aktivasyonu tamamlanmış partiküllere, farklı uzunluklardaki problar immobilize edildikten sonra sandviç yapılar elde edilmiştir.

Hibridize olmayan yapılar ortamdan uzaklaştırıldıktan sonra TLC kağıt üzerine 1 µL damlatılarak YGRS sinyallerine bakılmıştır (Şekil 4.5). Alınan değerler ile kalibrasyon eğrisi çizilmeye çalışılmıştır (Şekil 4.6). Şekil 4.6'da görüldüğü üzere artan hedef dizilim konsantrasyonuna bağlı olarak 0-0.1 µM derişim aralığında artma görülmüş sonrasında ise YGRS şiddeti plato değerine ulaşmıştır. Burada iki problemle karşılaşılmıştır. Bu problemlerden birincisi ölçümlerin yüksek standart sapma değerlerine sahip olması dolayısıyla ölçüm tekrarlanabilirliğinin düşük olduğudur. İkinci problem ise blank sinyalinin yüksek olmasıdır. Bu durum partiküller arası seçici olmayan etkileşme düzeyinin yüksek olduğunu göstermektedir.



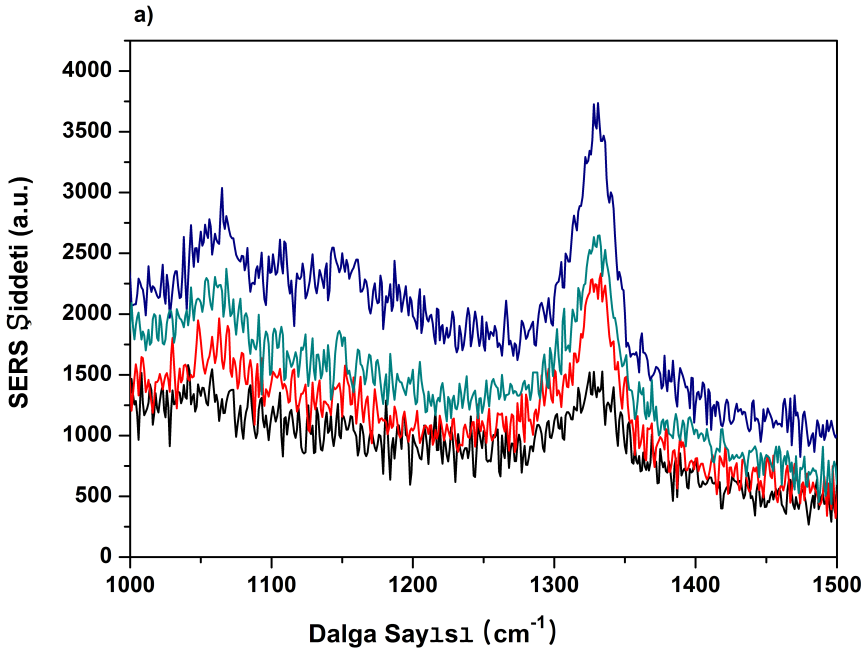
Şekil 4.5. 10 spacer prob kullanılarak elde edilen YGRS sinyalleri (offset 1000 a.u.)

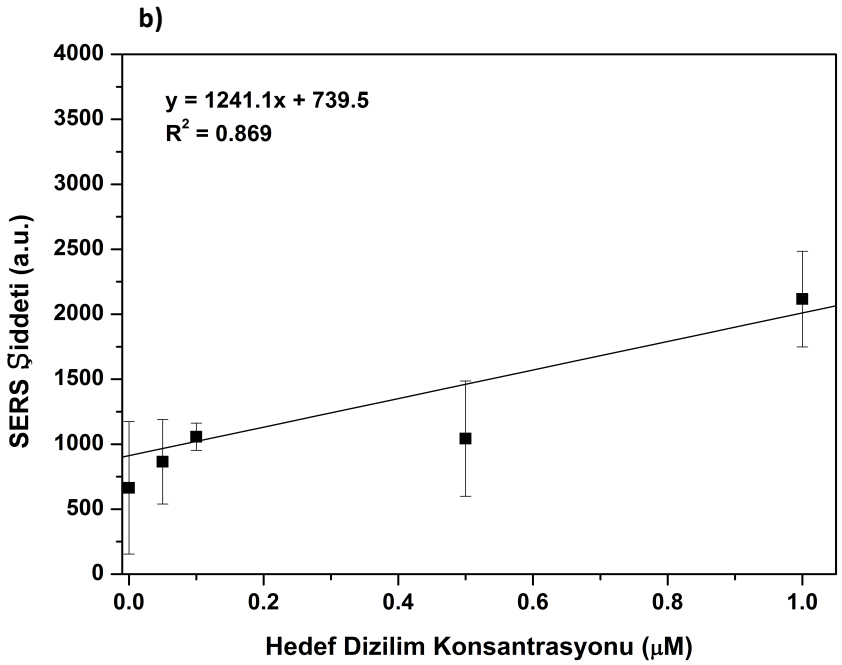


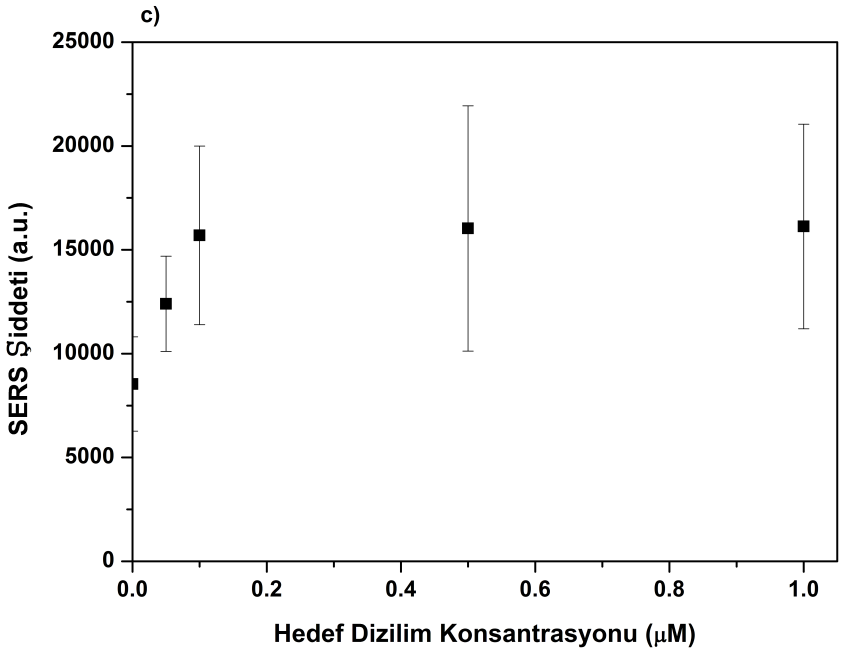
Şekil 4.6. 10 spacer prob kullanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği

Çalışmanın devamında bu problemlerin çözümüne yönelik yeni yaklaşımların geliştirilmesi için çalışılmıştır. İlk olarak spesifik olmayan bağlanmaların partikül yoğunluğundan kaynaklandığı düşünülmüş ve bu nedenle partikül miktarında seyreltme yapılmasına karar verilmiştir. DTNB varlığında altın çubuklardan hangi konsantrasyona kadar sinyal alınabildiğine bakılarak 1:2 oranında seyreltilme yapılmıştır. Aynı şekilde manyetik partiküllerde de 1:2 oranında seyreltme yapılmıştır. Seyreltme, SAM yapılıp partikül üzerinde istenilen 11-MUA konsantrasyonuna bağlı konfigürasyon oluşturulup SAM aşmasından sonra gerçekleştirilmiştir. Böylece konsantrasyonu optimize edilmiş partiküllerin yine konsantrasyonu optimize edilmiş olan SAM moleküllerinin parametreleri değiştirilmeden ve partiküllerin daha yoğun SAM molekülleri konsantrasyonu ile karşılaşması önlenerek yalnızca konfigürasyonu oluşmuş partikül üzerinde seyrelme sağlanmıştır. Yarı yarıya seyreltilmiş altın çubuklar ve altın manyetik partiküller ile belirtilen farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilim varlığında karşılaştırılarak sandviç yapı oluşturulmuştur. Hibridizasyon sonrası YGRS ölçümleri yapılmış ve sonuçlar Şekil 4.7'de verilmiştir. Bu deneme 1, 5 ve 10 spacer taşıyan problar ile ayrı ayrı gerçekleştirilmiştir. 1 spacer prob kullanılarak

yapılan çalışmada deney esnasında partiküllerde agregasyon gözlenmiştir. Bu olumsuzluk YGRS sinyallerine de yansımış ve bu nedenle YGRS şiddeti hesaplaması yapılamamıştır. 5 spacer ve 10 spacer prob kullanarak yapılan çalışmalarda ise hedef dizilim konsantrasyonundaki artışa göre YGRS sinyallerinde orantılı bir artış gözlenmiş olmasına karşın aynı problemlerin devam ettiği saptanmıştır. Bu problemi çözmek için spesifik olmayan bağlanmaları azaltmaya yönelik çalışmalar yapılmıştır. Bununla birlikte 5 spacer prob için belirli bir trend yakalanmıştır.







Şekil 4.7. Farklı uzunluklardaki problar ile yapılan denemeler (a: 1 spacer prob, b: 5 spacer prob, c: 10 spacer prob)

4.2.3. Nanopartiküller Arası Spesifik Olmayan Etkileşmeler

Hedef dizilim tayini için sandviç yapı oluşturacak altın kaplı manyetik küre partiküller ile altın çubuk partiküller arasında seçici olmayan etkileşimlerin-bağlanmaların gerçekleşmemesi için yüzeylerinde açıkta kalan grupların bloke edilmesi gerekmektedir. Seçici olmayan etkileşim basamakları aşağıdaki gibidir:

a-partikül-partükül etkileşimi

b-partikül-prob etkileşimi

c-partikül-hedef yapı etkileşimi

d-prob-prob etkileşimi

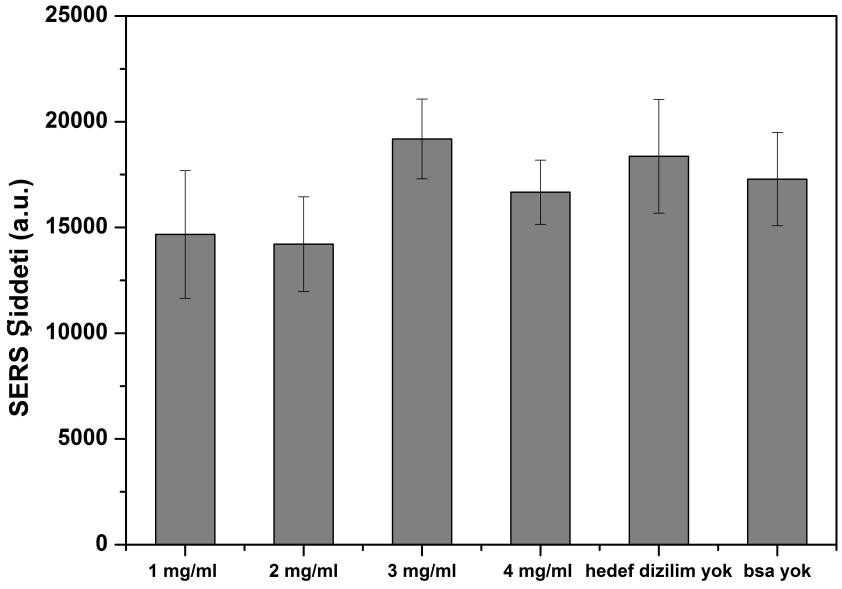
e-aktive edilmiş karboksil uçları arası etkileşim

Bu ihtimallerin her birinin test edilmesi için ayrı bir analiz prosedürü geliştirilmiş ve uygulanmıştır.

4.3.2.1. Yüzey blokasyonu

1. BSA blokasyon ajanının farklı konsantrasyonları ile bloke edilen partiküller etkileştirilerek, partikül-partikül etkileşimlerinin gerçekleştirebileceği değişimler incelenmiştir. Bunun için yüzey modifikasyonları ve aktivasyonları yapılan altın manyetik nanoküreler ile altın nanoçubukların yüzeyine 10 spacer prob immobilize edildikten sonra blokasyon aşamasına geçilmiştir. 1-2-3 ve 4 mg/mL olacak şekilde 4 farklı BSA konsantrasyonu kullanılmıştır. Düşünülen partikül-prob, prob-prob ve aktive edilmiş karboksil uçları arasındaki etkileşimleri azaltabilmek için hedef dizilim, önce BSA blokasyonu yapılmış prob 2 bağlı nanoçubuklar ile etkileştirilip (60°C'de 30 dk), daha sonra ortama yine BSA blokasyonu yapılmış prob 1 bağlı altın manyetik partiküller eklenmiş ve inkübasyona devam edilmiştir. Süre sonunda PBS tamponu (20 mM, pH 7.4) ile 6 kez yıkama yapılmıştır. Denemenin güvenilirliği için 2 farklı blank hazırlanmıştır. Birinde hedef dizilim kullanılmazken diğerinde de blokasyon ajanı kullanılmamıştır. Oluştuğu düşünülen hibrid ve hibrid olmayan yapılarda DTNB sinyali takip edilerek

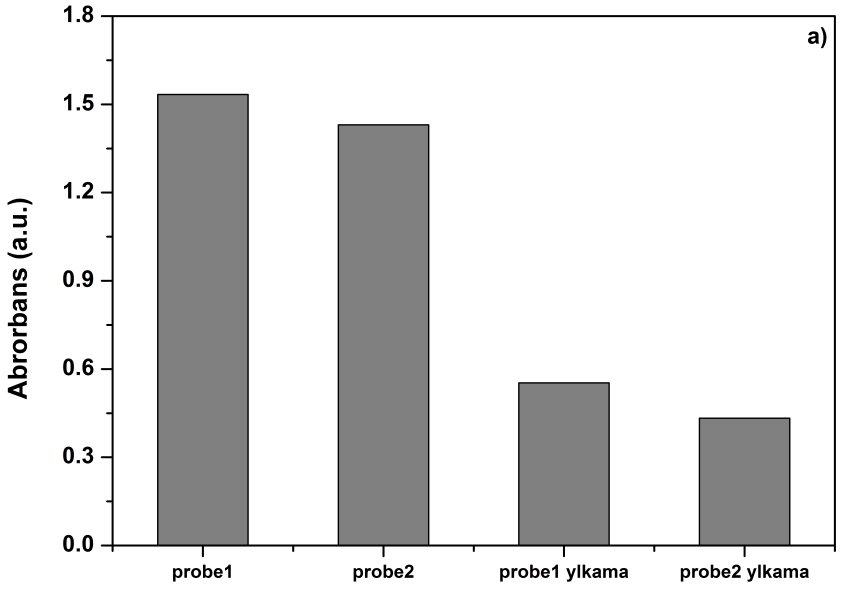
YGRS ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.8). Şekil 4.8'de görülen YGRS ölçüm sonuçları incelendiğinde BSA'nın blokasyon ajanı olarak beklenilen etkinliğini gösteremediği saptanmıştır. Ortamda hedef molekül veya blokasyon ajanı olmaması durumunda bile alınan sinyallerin diğerlerinden farklı olmadığı görülmüştür.

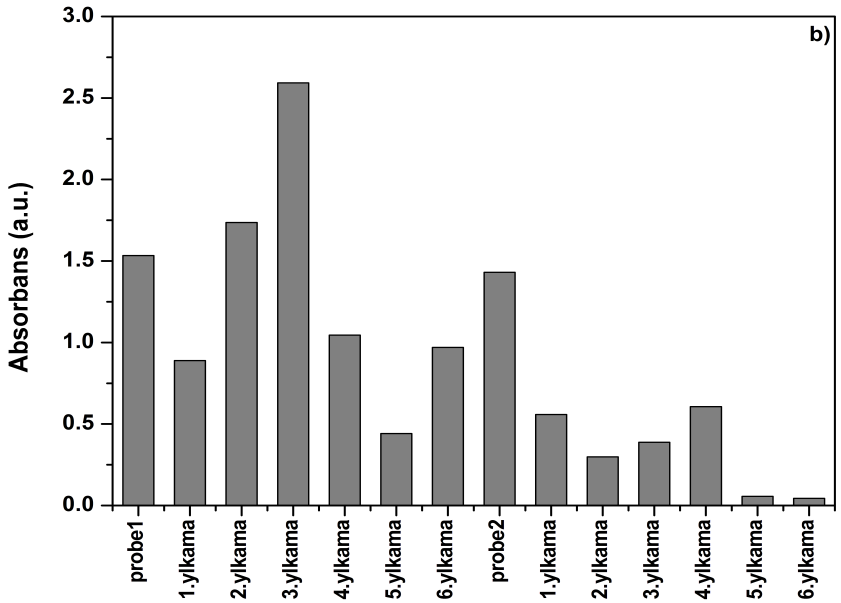


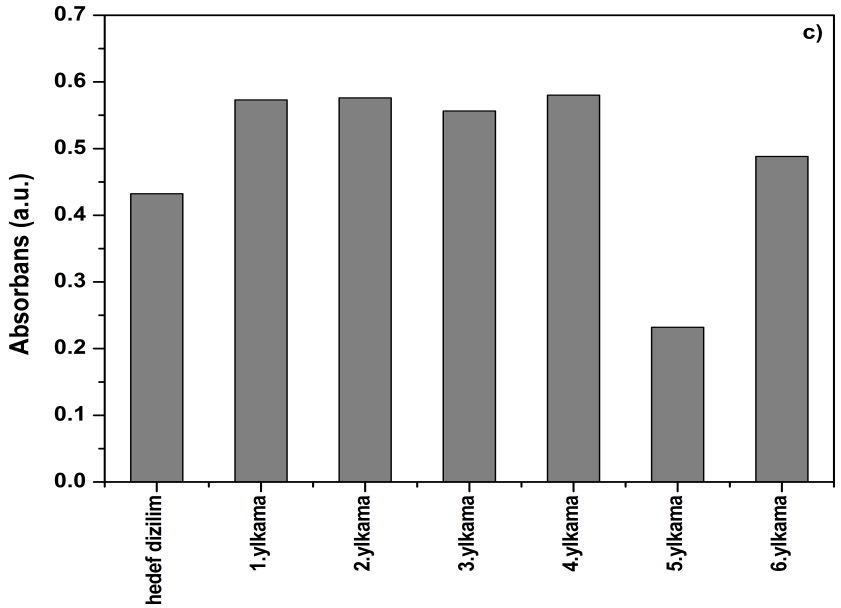
Şekil 4.8. Farklı konsantrasyonlarda uygulanan BSA'nın spesifik olmayan bağlanmaya etkisi

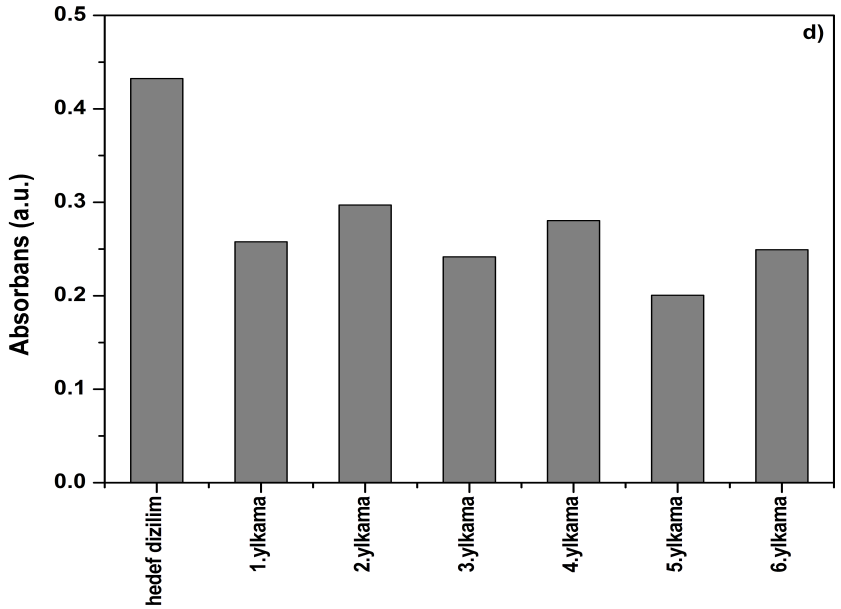
Bu denemede prob bağlandıktan sonra, BSA ile blokasyondan sonra, altın çubuk hedef dizilim ile etkileştirildikten sonra ve sandiviç yapı oluşturulduktan sonra yapılan yıkama suları ayrı ayrı alınmış ve UV spektrofotometresinde ölçümü alınmıştır (Şekil 4.9). Yıkama sularının UV ölçümleri incelendiğinde ise probun %60 civarında bağlandığı görülmüştür (Şekil 4.9a). BSA blokasyonu gerçekleştirildikten sonra alınan yıkama sularında ise; altın manyetik nanopartiküllere bağlı olan prob 1, 260 nm dalga boyunda takip edilmiştir. Yıkama sularında gözlenmesi beklenmeyen probun 1. yıkamadan sonra bile daha yüksek absorbans vermiş olması, BSA'nın yapıyı bozarak probu uzaklaştırdığını

göstermiştir. Bunun yanında yıkama suyuna geçen altın manyetik partiküller sebebiyle de absorbans verdiği söylenebilir. Aynı prosedür altın çubuklara bağlı prob2 için de tekrarlanmış ve sonuçların benzer olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.9b). Partiküllerin hedef molekül ile karşılaştırılmasından sonra elde edilen yıkama sularında yine 260 nm de hedef dizilim takip edilmeye çalışılmıştır. Ancak Şekil 4.9c ve 4.9d'de görüldüğü gibi belirlenen konsantrasyonda hedef dizilimin verdiği absorbans değeri yıkama sularından alınan absorbans değerinden düşüktür. Bunun sebebinin, yıkama sularında bağlanmayan hedef dizilim ile birlikte partikül yüzeyinden uzaklaşan probların biraraya gelmesinin neden olduğu düşünülmüştür. Tüm bu sonuçlar doğrultusunda blokasyon ajanı olarak BSA'nın kullanımından vazgeçilmiştir.




b)
Absorbans (a.u.)
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
probe1
1.ylkama
2.ylkama
3.ylkama
4.ylkama
5.ylkama
6.ylkama
probe2
1.ylkama
2.ylkama
3.ylkama
4.ylkama
5.ylkama
6.ylkama

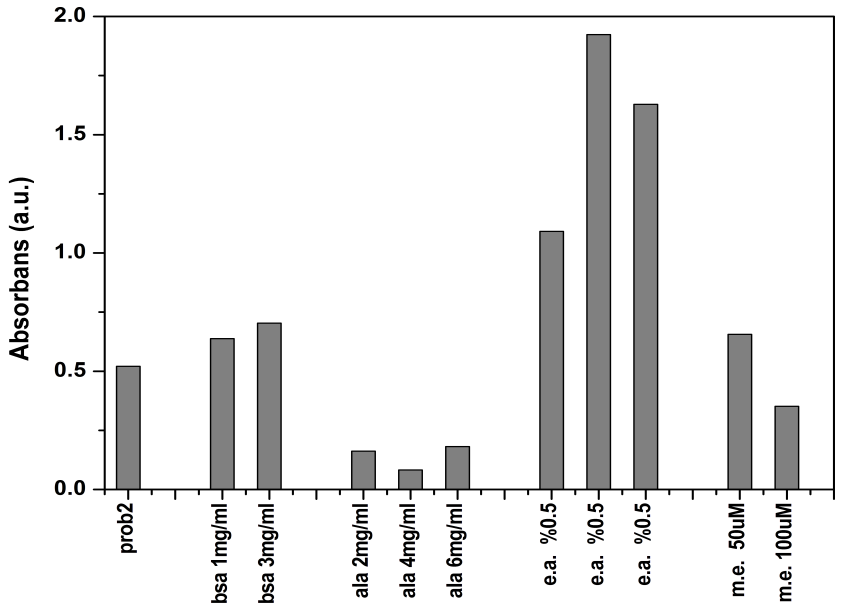

c)
Absorbans (a.u.)
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
hedef diziliim
1.ylkama
2.ylkama
3.ylkama
4.ylkama
5.ylkama
6.ylkama



Şekil 4.9. Yıkama sularının UV ölçümleri, a. prob bağladıktan sonra alınan yıkama suları, b. BSA ile blokasyon yapıldıktan sonra alınan yıkama suları, c. modifiye altın çubuk ile 1 μM konsantrasyonunda hedef dizilim etkileştikten sonra alınan yıkama suyu, d. hibridizasyon sonrası alınan yıkama suları

Spesifik olmayan etkileşimlerin sorun oluşturması ve blokasyon ajanı olarak BSA'nın etkin olmaması faklı blokasyon ajanları için denemelerin yapılmasını gerektirmiştir. SAM yapılan altın manyetik küre ve altın çubuklar, sırasıyla prob 1 ve prob 2 ile etkileştirildikten sonra blokasyon ajanı olarak etanol amin (e.a.), alanin (ala), merkaptoetanol (m.e.) ve BSA ile bloke edilmiştir. BSA sonuçları da tekrar edilmek istenmiştir. Bu blokasyon ajanlarının iki partikül üzerindeki davranışlarını ölçmek için yapıya hedef dizilim bağlanmadan iki partikül birbirleriyle etkileştirilmiş ve daha sonra manyetik ayırım ile iki partikül birbirinden ayrılmıştır. PBS tamponu ile yıkanan örneklerin UV spektroskopisinde sinyal verip vermediğine bakılmıştır. Ortamda hedef molekül olmadığı için çalışılan iki partikülün birbirine bağlanmaması gerekmektedir. Dolayısıyla bağlanma yoksa yıkama ile au-çubuk partiküller uzaklaştırılacak ve prob 2'ye ait sinyal de alınamayacaktır. Bu mantıkla yola çıkılarak spesifik olmayan bağlanmalar, altın

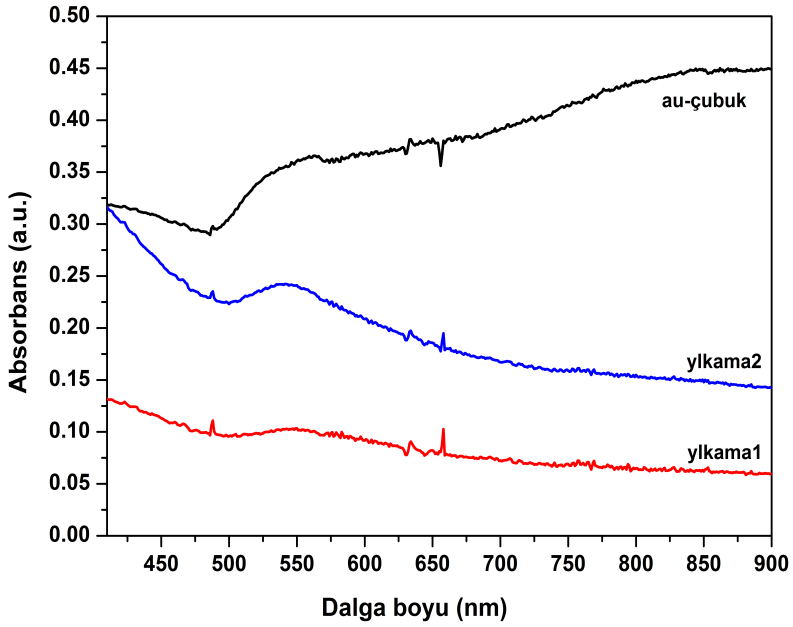
çubuk üzerine bağlı prob 2 ile UV'de 260 nm dalga boyundan takip edilmiştir (Şekil 4.10). Alanin dışındaki diğer blokasyon ajanları kullanılarak oluşturulan yapılardan elde edilen yıkama sularında absorbans değerlerinin aynı konsantrasyondaki prob 2 absorbans değerinden yüksek çıktığı görülmüştür. Bu sonuçlar doğrultusunda alanin dışında kullanılan blokasyon ajanlarının yapıda istenmeyen etkiler oluşturduğunu ve spesifik olmayan etkileşimleri önlemede etkili olmadığını söyleyebiliriz. Alanin ise blokasyondan sonra spesifik olmayan etkileşimleri azaltmış fakat tam olarak engelleyememiştir.



Şekil 4.10. Farklı blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisi

Spesifik olmayan bağlanmalar partikül partikül etkileşimleri açısından da değerlendirilmiştir. Manyetik partiküller, 546 nm dalga boyunda; altın çubuklar ise, yaklaşık 510 nm ve 675 nm'de kendilerine özgü iki pik vermektedir. Dolayısıyla iki partikül etkileştirildikten sonra bu piklerdeki değişimler dikkate alınarak birbirlerine bağlanıp bağlanmadıkları incelenmiştir. Bunun için altın manyetik partiküllere ve altın çubuklara hiçbir modifikasyon yapılmadan iki partikül çıplak olarak birbiriyle

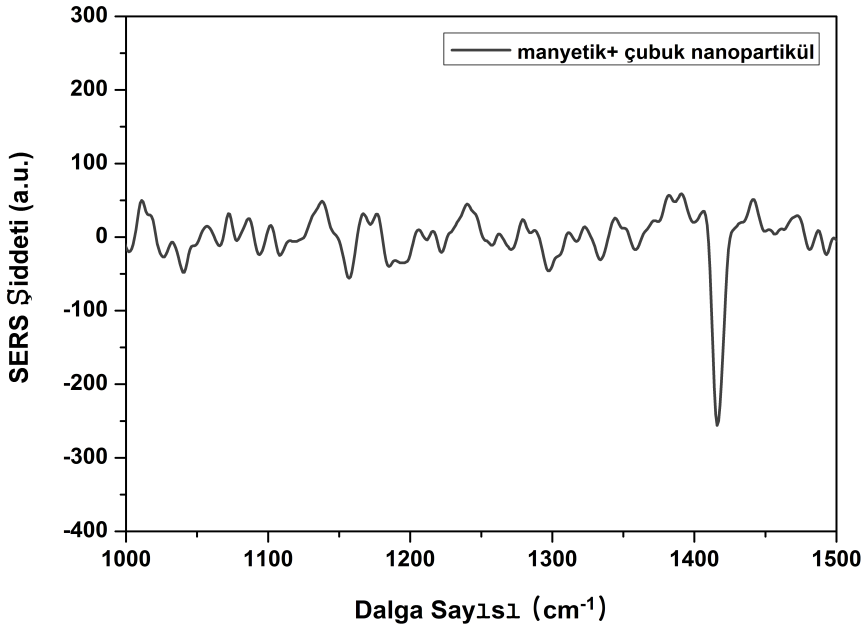
etkileştirilmiştir. İki partikülün birbiriyle etkileşmemesi beklendiği için yıkamalarla altın çubuk partikülün uzaklaşması düşünülerek yıkama sularında altın çubuğa ait pikler aranmıştır (Şekil 4.11). Şekil 4.11 incelendiğinde altın çubuk partikülün kendi başına verdiği pik elde edilememiştir. Bu durum iki partikülün birbiriyle etkileştiğini ve yıkamalar sonrası ayrılmadığını göstermiştir.



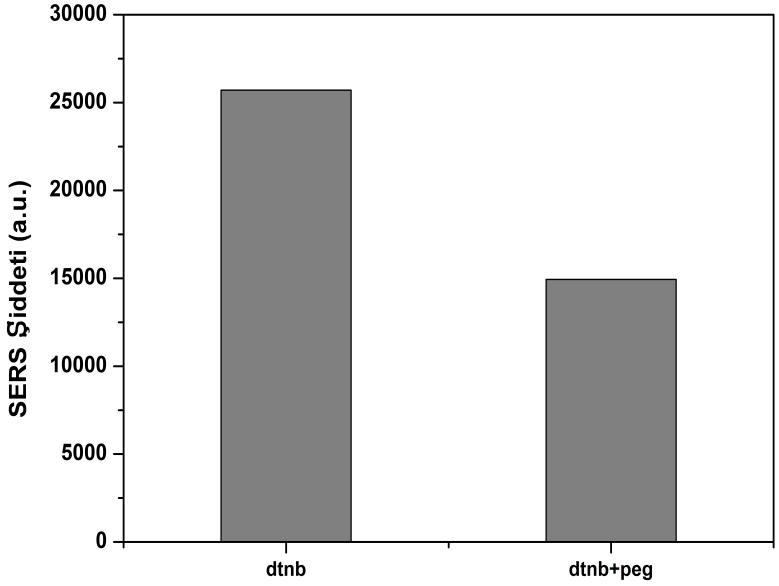
Şekil 4.11. Altın çubuk ve yıkama sularına ait UV spektrumlar

Partikül-partikül arası spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçebilmek için partiküller üzerinde farklı kimyasallar ile SAM oluşumu denenmiştir. Bu amaçla, 11-MUA ve DTNB ile sırasıyla altın manyetik partikül ve altın çubuk üzerinde SAM oluşturulduktan sonra üzerlerinde PEG eklenmiş ve 1 kez daha SAM oluşumu için beklenmiştir. Manyetik ayrım ile partiküllerin birbirinden ayrıldığı düşünüldüğü için manyetik partiküller üzerinde DTNB sinyali olup olmadığına bakılmıştır. Böylece PEG'in partikül-partikül arası spesifik olmayan bağlanmaya etkisi incelenmiştir. Şekil 4.12 incelendiğinde DTNB'ye ait 1250-1350 cm^{-1} dalga sayısındaki sinyalin çok düşük olduğu görülmüştür. Böylece PEG'in spesifik olmayan bağlanmaları önlediği düşünülmekle birlikte başka bir denemede ise PEG'in, DTNB sinyalini

baskılayıp baskılamadığı incelenmiştir. DTNB kaplı altın çubuk üzerine PEG ilave edilmiş yine 1 gece inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonrası yıkama yapılmış ve altın çubuk üzerinde DTNB sinyali takip edilmiştir. PEG uygulamasından sonra, DTNB sinyalinin önemli oranda düştüğü Şekil 4.13'de görülmüştür. Bu durumda analizlerden elde edeceğimiz YGRS şiddeti düşük olacağı için PEG blokasyon ajanının önerilen analiz yöntemi için uygun olmadığına karar verilmiştir.



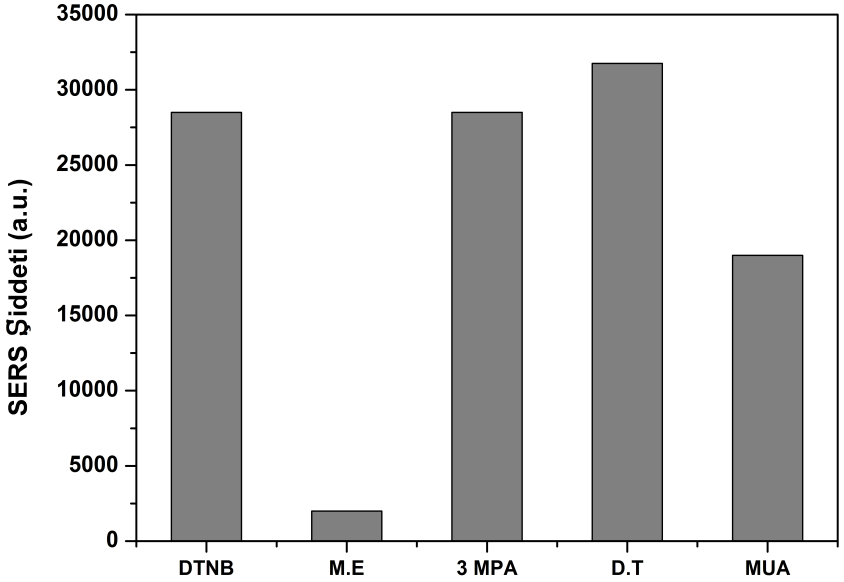
Şekil 4.12. PEG'in partiküller arası spesifik olmayan bağlanmaya etkisi



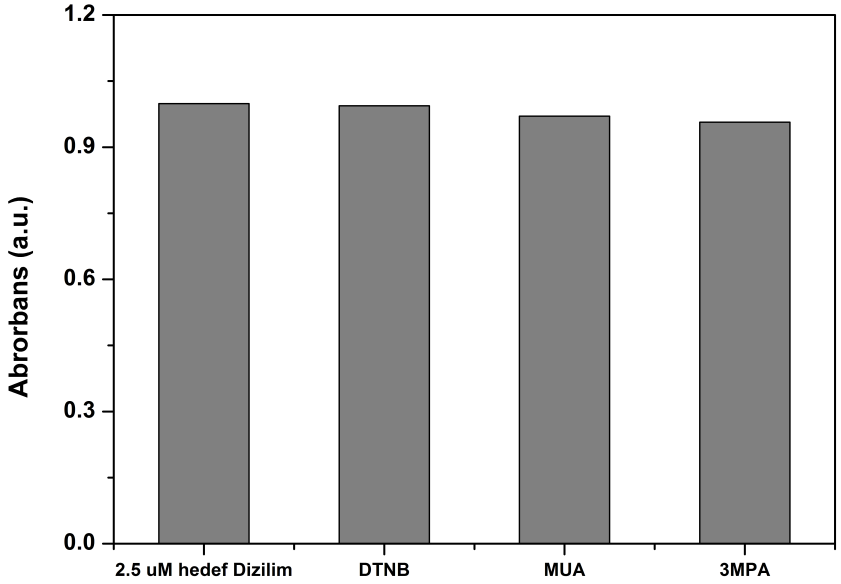
Şekil 4.13. PEG'in DTNB sinyali üzerine etkisi

Denemelere diğer blokasyon ajanları ile devam edilmiştir. 50 mM DTNB ile yüzey modifikasyonu yapılan çubuk partiküller, eşit miktarlarda ayrılmış, bir tanesi sadece DTNB kalacak şekilde diğerleri sırasıyla 3-merkaptopropiyonik asit, 11-merkaptoundekanoikasit, dekantiol ve merkaptoetanol ile 1 gece daha bekletilmiştir. Bu blokasyon ajanlarının DTNB sinyali üzerindeki etkileri Şekil 4.14'de verilmiştir. Şekil 4.14'de DTNB ile farklı blokasyon ajanlarına ait YGRS sinyalleri görülmektedir. Buradan merkaptoetanolün, DTNB sinyalini çok fazla düşürdüğü, 3MPA ve MUA'nın ise DTNB sinyaline çok yakın sinyal verdiği gözlenmiştir. UV'den alınan sonuçlara göre yalnızca DTNB kullanılması ile partikül yüzeyinin kapatılabildiği anlaşılmıştır. Hedef dizilim ile de etkileştirilen bu partiküllerin yüzeylerinde açıklık kalıp kalmadığı kontrol edilmiştir. Partikül yüzeyinde açıklık kalmışsa hedef dizilimin kalan açıklığa bağlanması söz konusu olacaktır. Partikül-hedef dizilim arası spesifik olmayan bağlanmaların kontrolü, UV

spektrofotometresinde 260 nm dalga boyu ile takip edilmiştir (Şekil 4.15).

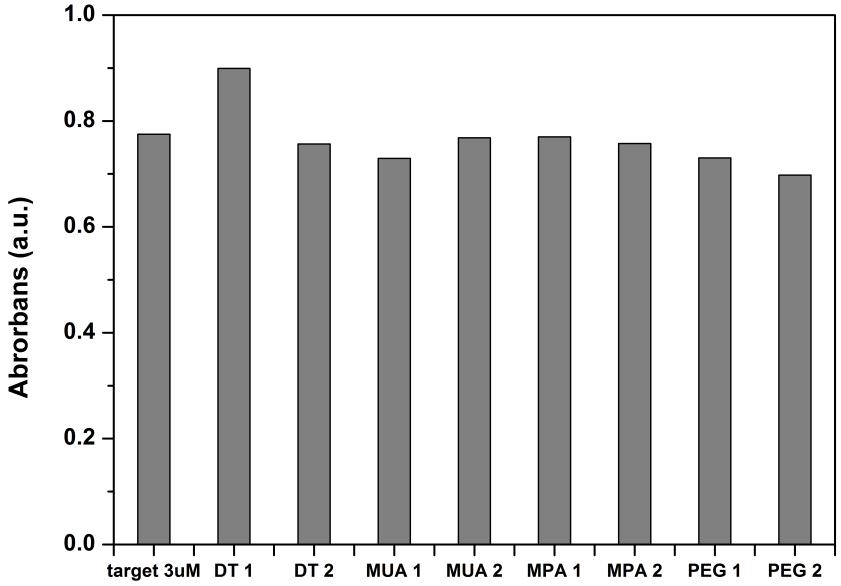


Şekil 4.14. Farklı blokasyon ajanlarının altın çubuklardan alınan YGRS sinyallerinin üzerine etkisi



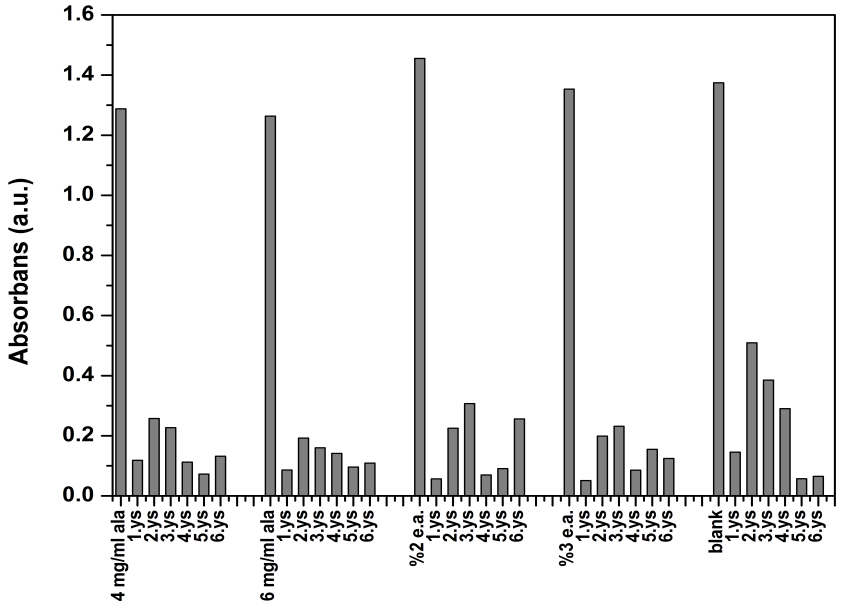
Şekil 4.15. Farklı blokasyon ajanlarının altın çubuklardan alınan UV sinyallerinin üzerine etkisi

Altın çubuklar için yapılmış olan partikül-hedef dizilim spesifik olmayan bağlanma kontrolü, altın manyetik partiküller için de denenmiştir. Bunun için 11-MUA ile yüzey modifikasyonu yapılmış altın manyetik partiküller, biri MUA'lı kalacak şekilde dörde bölünmüş ve diğerlerinin üstüne 20 mM dekantiol, 5 mM PEG ve 20 mM MPA eklenerek 1 gece daha SAM oluşumu için bekletilmiştir. Daha sonra hedef dizilim ile etkileştirilmiş ve yıkama sularından gelen hedef molekül miktarına bağlı olarak SAM'in etkinliğine bakılmıştır (ikişer paralel olacak şekilde). Şekil 4.16'dan da anlaşılacağı üzere yıkama suları ile birlikte hedef molekül, partikül yüzeyinden geri alınabilmiştir. Dolayısıyla yüzey tam olarak kapatılabildiği için partikül ile hedef molekül arasında spesifik olmayan etkileşim olmadığı görülmüştür. Yüzeyi kapatan blokasyon ajanları incelendiğinde dekantiolun eklenen hedef dizilimin verdiği pikten daha yüksek pik verdiği görülmektedir. Bu durum dekantiolun yapıda istenmeyen etkiler oluşturması ya da yapıyı bozmasıyla açıklanabilir. Diğer yandan PEG ajanının DTNB sinyalini baskılaması ve kullanılan blokasyon ajanlarının 11-MUA ile yakın sonuçlar vermesi nedeniyle sistemin fazladan blokasyon ajanına ihtiyaç duymadığı gösterilmiştir. Bu iki denemenin sonucunda altın çubuklar, DTNB ile; altın manyetik partiküler ise 11-MUA ile SAM yapılarak denemelere devam edilmiştir.



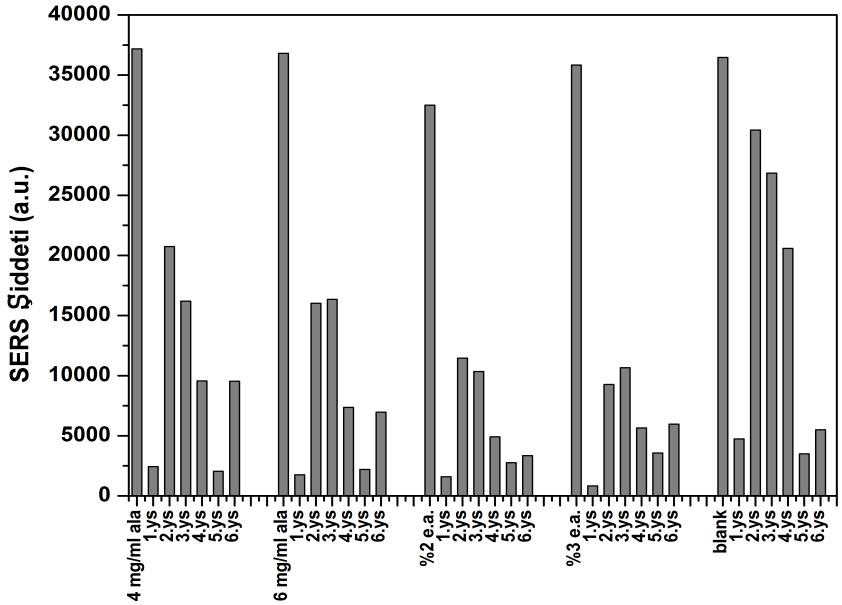
Şekil 4.16. Farklı blokasyon ajanlarının partikül-hedef molekül etkileşimi üzerine etkisi

Yüzey aktivasyonu yapılmış partiküllerin spesifik olmayan etkileşimini incelemek için yüzeylerinde SAM oluşturulmuş ve EDC-NHS aktivasyonu yapılmış partiküller, ortamda problar olmaksızın tekrar blokasyon ajanları ile muamele edilmiş, açık uçların kapatıldığı düşünülerek birbirleri ile karşılaştırılmıştır. %2 ve %3'lük etanol amin ile 4 ve 6 mg/ml alanin blokasyon ajanı olarak kullanılmıştır. Bloke edilmemiş fakat EDC-NHS aktivasyonu yapılmış au-çubuk ve altın manyetik nanopartiküller de blank olarak kullanılmıştır. Her bir yıkama suyunun UV ve YGRS'de ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.17 ve 4.18).



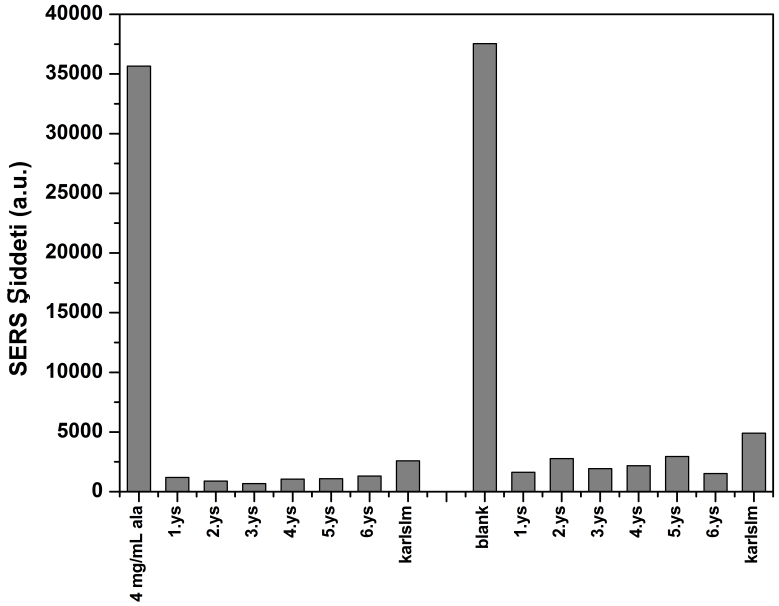
Şekil 4.17. Blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin UV sinyalleri ile incelenmesi

UV'den alınan sonuçlara göre en iyi geri kazanım 4 mg/mL alanin datalarında görülmektedir. Spesifik olmayan bağlanmaları önlemek için 4 mg/ml alanin kullanılarak devam edilmiştir. YGRS'de yıkama sularındaki yüksek sinyallerin sebebi yıkama sularına gelen altın manyetik partiküllerin au-çubuklarla birlikte daha güçlü sinyaller vermesinden dolayı olduğu düşünülmüştür. Yıkama esnasında yıkama sularına geçebilecek olan manyetik partiküller üzerinde kalan altın-çubuk partiküllerden dolayı olması gereken sinyallerden daha yüksek sinyaller vermiştir.



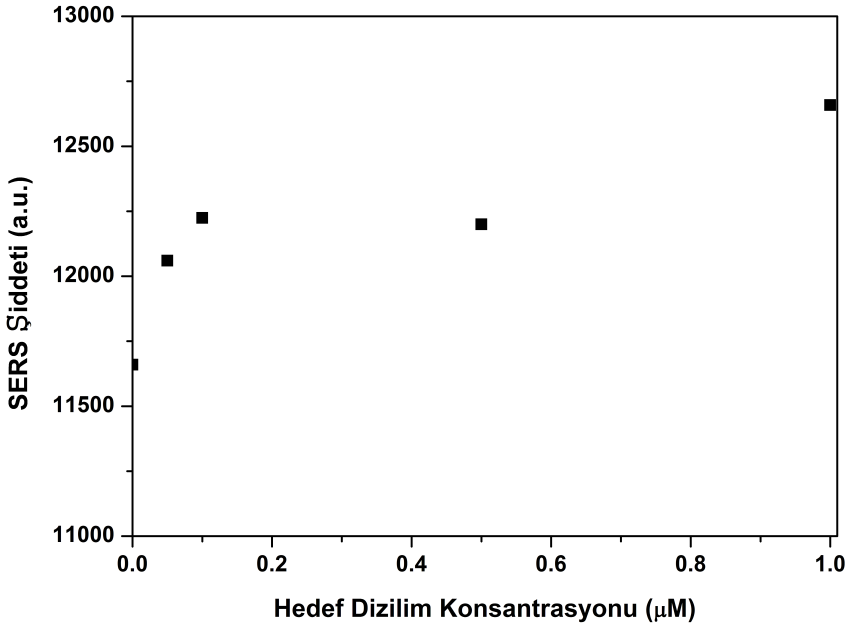
Şekil 4.18. Blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin UV sinyalleri ile incelenmesi

4 mg/mL alanin ile blokasyon yapılmasına karar verildikten sonra bir önceki denemenin tekrarı yapılmıştır. Bunun için yüzey modifikasyonu ve aktivasyonu yapılmış her iki partikül de tekrar alanin ile bloke edilmiş ve biraraya getirilmiştir. Blokasyonun etkinliği, YGRS'den alınan ölçümler ile kontrol edilmiştir. İki partikül birbiriyle etkileştirilmiş ve yıkamaları yapılmıştır. Her bir yıkamadan sonra yıkama sularının ve tüm yıkamalar yapıldıktan sonra geriye kalan yapının (karışım) YGRS'de sinyallerine bakılmıştır. YGRS'de alınan sonuçlara göre yıkama sularına gelen altın-çubukların miktarının blankde daha fazla olduğu saptanmıştır. Bununla birlikte karışımlarda grafikten de görüldüğü gibi blokasyonu yapılmamış olan partiküllerin sinyalleri diğerine göre daha yüksektir. Dolayısıyla blank için altın manyetik partiküllerin üzerinde kalan çubuk miktarı alanin blokasyonu yapılmış partiküllere göre daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum alaninin blokasyon ajanını olarak kullanılmasıyla spesifik olmayan bağlanmaları azaltılabildiğini ifade etmektedir (Şekil 4.19).



Şekil 4.19. Alanin blokasyon ajanının spesifik olmayan bağlanmalara etkisi

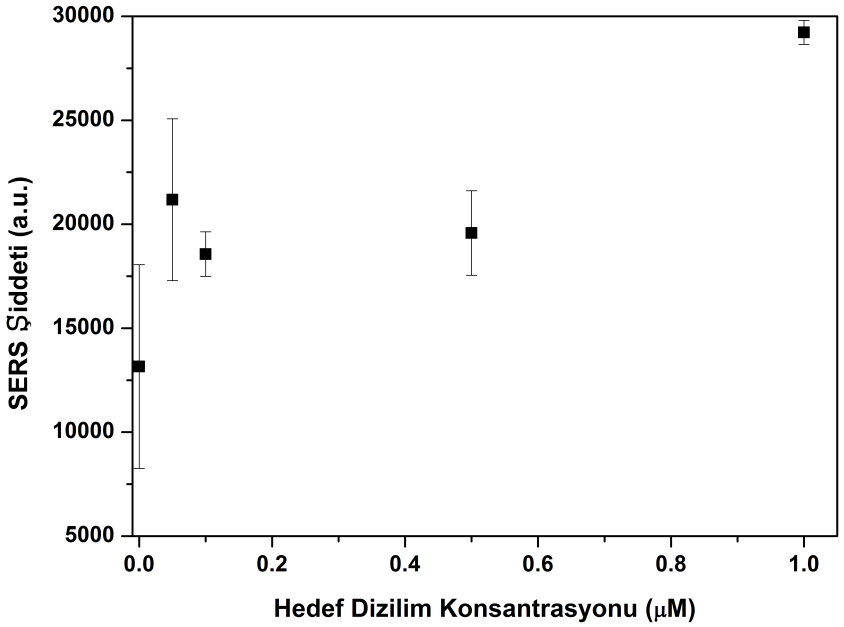
Yukarıda anlatılan denemelerden alaninin blokasyon ajanı olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla alanin kullanılarak spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilip kalibrasyon eğrisi çıkartılıp çıkartılamayacağı araştırılmıştır. Partiküllerin yüzey modifikasyonları, aktivasyonları, prob immobilizasyon ve blokasyon aşamaları bir önceki denemede anlatıldığı gibidir. Sonrasında ise hibrid yapının oluşumu söz konusudur. Modifikasyonu yapılmış nanopartiküller hedef dizilim ile etkileştirilerek hibrid yapının oluşumu sağlanmıştır. Hibridize olmayan yapılar ve spesifik olmayan bağlanmaları azaltmak için yıkama yapıldıktan sonra YGRS'de ölçüm alınmıştır (Şekil 4.20). Şekil 4.20'den de görüldüğü gibi blankden alınan sinyallerin yüksek olması, alaninin spesifik olmayan bağlanmaların azaltılmasında etkili olduğu fakat tam olarak önleyemediği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.20. 10 spacer prob için elde edilen kalibrasyon eğrisi

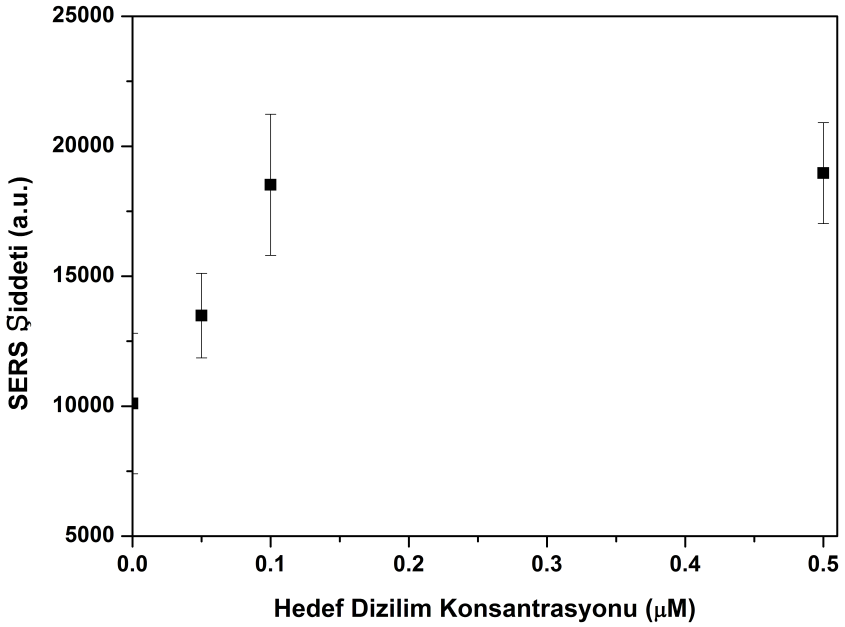
Yapılan çalışmalarda blokasyon ajanları kullanılarak ya da farklı SAM ajanları denenerek spesifik olmayan bağlanmalar bir kısım azaltılabilmişse de yeterli ve istenilen düzeyde sonuçlar alınamamıştır. Blank sinyali hedef dizilim varlığında alınan sinyallerden yüksek çıkabilmektedir. Bu durum ortamdaki yoğunluğun fazla olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Bunun için partikül yoğunluğu ve SAM miktarlarında seyreltme yapılmaya karar verilmiştir. Aşama aşama partiküllerde SAM oluşumu için kullanılan 11-MUA ve DTNB konsantrasyonları azaltılmıştır.

İlk denemede sadece altın manyetik partiküllerde 11-MUA konsantrasyonu 150 mM'dan 20 mM'a düşürülmüş, SAM oluşumu ve EDC-NHS aktivasyonu sağlandıktan sonra bu partiküller, 1:5 oranında seyreltilmiştir. Altın çubuk partiküllerde ise herhangi bir değişiklik yapılmayarak 50 mM konsantrasyonunda kullanılmıştır. Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilim varlığında hibrid yapı oluşturulmuş ve YGRS'de, DTNB'ye ait sinyal takip edilmiştir (Şekil 4.21). Alınan sonuçlara göre blank datasının sinyalleri düşürülebilmiştir. Henüz istenildiği gibi bir kalibrasyon gözlenmese de artan konsantrasyonlara göre sinyallerde de artış görülmüştür.



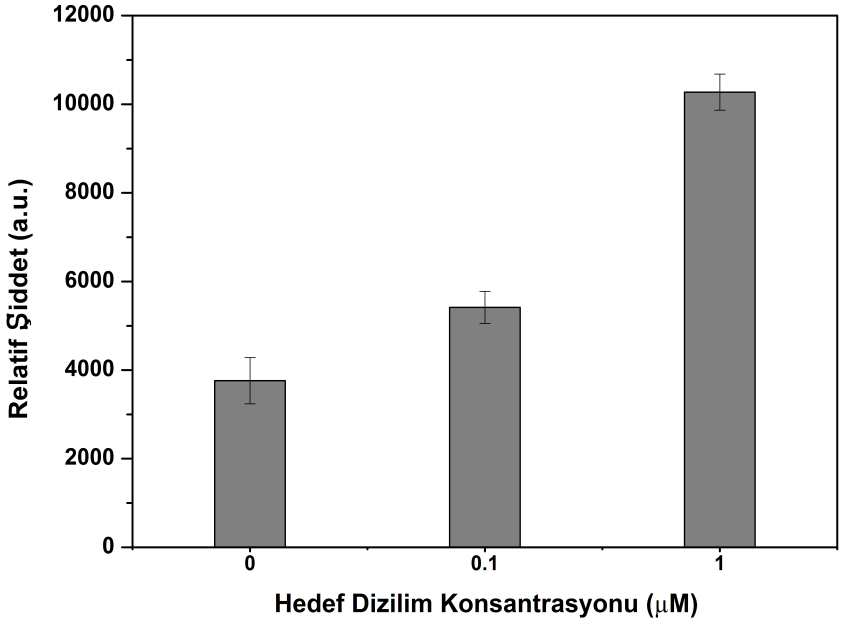
Şekil 4.21. 1 spacer prob ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

İkinci denemede ise altın manyetik küre partiküllerde olduğu gibi altın-çubuk partiküller üzerinde de seyreltme yapılarak oluşturulan yapıdaki değişim izlenmiştir. Altın çubuk partiküller üzerinde 20 mM DTNB ile SAM oluşturulup, EDC-NHS aktivasyonundan sonra 1:2 oranında seyreltmeye gidilmiştir. Sinyaller çubuk partiküller üzerine bağlı DTNB'den alındığı için bu partiküllerde seyreltme oranı düşük tutulmuştur. YGRS'de alınan sonuçlar, Şekil 4.22'de verilmiştir. Alınan sonuçlara göre blank sinyallerinin düşürülebilmesi tekrarlanan bir sonuç olup seyreltme oranları ile daha iyi bir kalibrasyon eğrisi elde edilebileceği saptanmıştır.

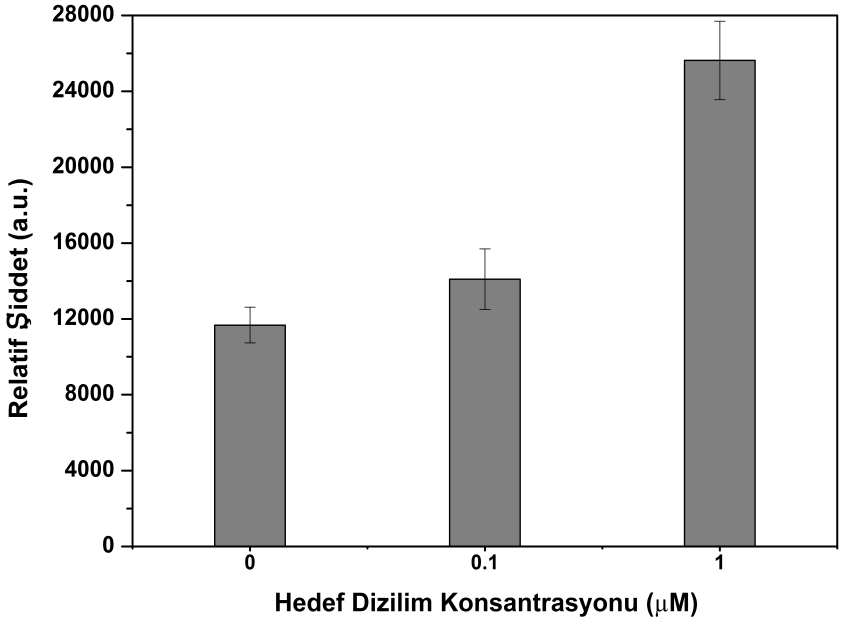


Şekil 4.22. 1 spacer prob ile elde edilen kalibrasyon eğrisi

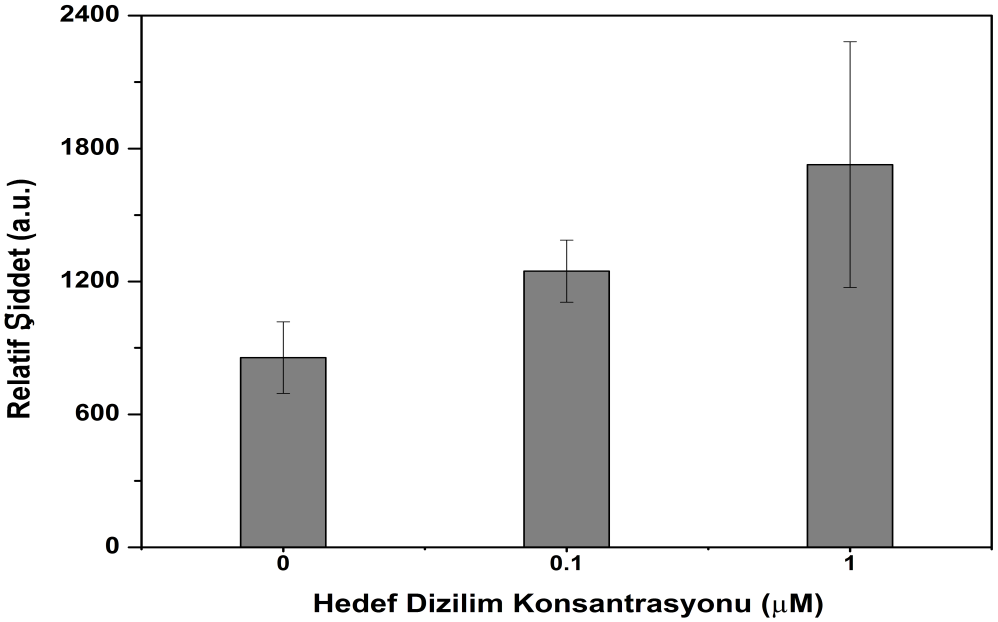
Bu aşamaya kadar elde edilen bilgiler toplanmış ve her üç prob için kontrol denemesi yapılmıştır. Gerçekleştirilen deneysel parametreler; partiküllerin yüzeyleri sadece 11-MUA ve DTNB ile SAM yapıldıktan sonra, açıkta kalan yerler bloke edilmiştir. Aynı koşullar altında yalnızca prob uzunlukları farklılık gösteren modifikasyonu ve blokasyonu yapılmış partiküller birbiriyle karşılaştırıldıktan sonra manyetik seperasyonla ortamda fazla bulunan altın çubuklar uzaklaştırılmıştır. Hedef molekül ile hibridizasyon sağlanarak Şekil 4.23, 4.24, 4.25'de verilen bar grafikleri üretilmiştir. Burada prob uzunlukları için limit koşullar diye adlandırabileceğimiz (partiküllerin karşılaşmasının ardından manyetik seperasyon ile çubuk nanopartiküllerin fazlasının ortamdan uzaklaştırılması, kalan yapılar üzerinden hibridizasyon sağlanması ve yıkamalar ile spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması ile spesifik olan bağlanmaların hangi prob uzunluğu ile daha iyi elde edilebilirliği) koşullar test edilmiştir.



Şekil 4.23. 1 spacer prob ile elde edilen bar grafiği



Şekil 4.24. 5 spacer prob ile elde edilen bar grafiği



Şekil 4.25. 10 spacer prob ile elde edilen bar grafiği

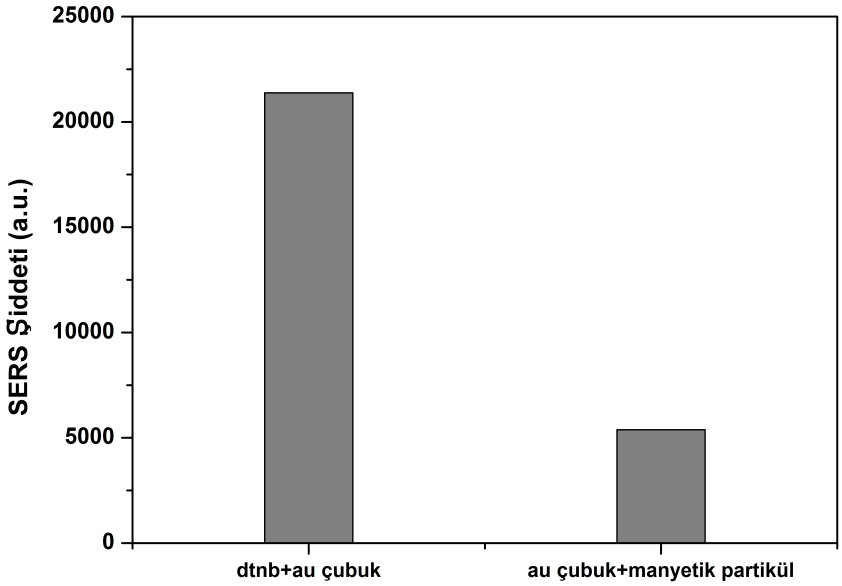
Bar grafikleri (Şekil 4.23, 4.24, 4.25) incelendiğinde her üç prob için de artan hedef dizilim konsantrasyonuna bağlı olarak artan YGRS intensite değerleri saptanmıştır. Üç farklı spacer kullanılması sonucu elde edilen bar grafikleri karşılaştırıldığında ise en yüksek intensite değerlerinin 5 spacer prob ile elde edildiği ve grafiklerdeki eğim dikkate alındığında 5 spacer içeren prob kullanılması ile yüksek ölçüm hassasiyeti değerine ulaşıldığı saptanmıştır. On spacer kullanılarak üretilen bar grafiğinde ise en düşük intensite ve eğim değerleri elde edilmiştir. Yapılan diğer denemelerle birlikte tüm bu sonuçlar bir arada değerlendirildiğinde 10 spacer bulundurun probun partiküller yüzeyinde katlanmalar nedeniyle hedef ile yeterince etkileşemediği ve bu nedenle hedef dizilim varlığında (düşük hibridizasyon nedeniyle) YGRS sinyallerinin düşük olduğu sonucuna varılmıştır. En iyi etkileşim, 5 spacer bulunduran problarda elde edilmiştir. 1 spacer prob ile elde edilen bar grafiğinin intensite değerleri 5 spacer probdan elde edilen sonuca biraz daha yakın olmasına karşın eğimi dolayısıyla hassasiyeti neredeyse yarıya yarıya düşüktür. Limit koşullar altında 5 spacer probun en iyi sonuç verdiği gözlemlenmiştir. Bu kontrol denemesinde hangi prob uzunluğunun daha iyi konfirmasyon vereceği ve ortamda güçlü spesifik bağlanmalar kurabilceği araştırılmıştır. Bununla birlikte prob uzunluklarının spesifik olmayan bağlanmaları önlemedeki etkisi de incelenmişrtir.

Yine 5 spacer prob için meydana gelen nanopartiküller arası mesafenin hibridizasyonu gerçekeştirmedeki etkinliği ortaya konulmuştur. Daha sonraki yapılan çalışmalarda klasik anlatılan prosedüre devam edilerek yüksek oranlarda YGRS sinyalleri hedeflenmiştir.

Problarla yapılan bu deneme ve bundan önce yapılan diğer denemeler de göz önünde bulundurulduğunda 5 spacer prob ile daha tekrarlanabilir sonuçlar alındığı söylenebilir. Yapılan bu değerlendirmelerin ardından 5 spacer prob partiküller arası optimum uzaklık seçilmiştir. Fakat bu probların kullanılmasıyla üretilen datalarda partiküllerin blank sinyallerinin beklenilenden yüksek değerlere sahip olması probların seçici olmayan etkileşmelere de yatkın olduğunu göstermektedir. Seçilen prob uzunluğu için denemelere devam edilerek belirlenen optimum partiküller arası mesafenin doğruluğu gösterilmeye çalışılmıştır.

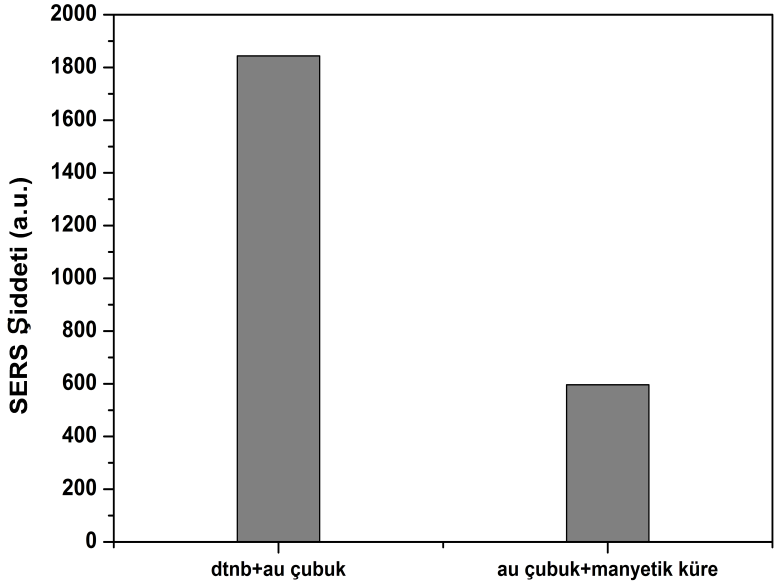
DNA anliz yönteminin geliştirilmesi kapsamında prob uzunluğu optimizasyonu ile spesifik olmayan etkileşimlerin ortadan kaldırılması veya mümkün olduğu kadar azaltılabilmesi için yukarıda da anlatıldığı gibi blokasyon ajanları ve seyreltilmiş konsantrasyonlar gibi alternatif seçenekler üzerinde durulmuştur. Bu kapsamda yapılan çalışmaların sonuncusu olarak yukarıdaki basamakları da içinde alacak şekilde aşama aşama deneyler tekrarlanmış, bazı parametrelerde değişiklik yapılmıştır. Bunlardan en belirgin olanı DTNB konsantrasyonunun 50 mM'dan 20 mM'a indirilmesidir. Bir diğeri, manyetik partiküller seyreltilirken, altın çubuklar seyreltilmemesidir. Her bir aşamanın net bir şekilde ifade edilebilmesi için denemeleri basamakları aşama aşama gösterilmiştir. İlk önce SAM yapılmış au-çubuk ve altın manyetik küre nanopartiküller birbiri ile etkileştirilip ardından yıkamaları yapılmıştır. Burada hedeflenen, düşürülen konsantrasyon oranlarının spesifik olmayam partikül etkileşimlerini azaltması olarak belirlenmiştir. Yıkamalar ise 20 mM, pH 7.4'teki PBS tamponu ile yapılmıştır. Çünkü hibridizasyon denemelerinde partiküllerin birbirleriyle karşılaşma ortamı PBS tamponudur. Yıkamaların ardından TLC kağıt üzerine 1 µL damlatılarak YGRS sinyallerine bakılmıştır (Şekil 4.26). Şekilde görüldüğü gibi iki partikülün birbiriyle etkileşiminin ardından altın manyetik partiküller üzerinde kalmış olan altın çubuk partiküllerden alınan sinyaller etkileşimden önce alınan sinyallerden oldukça düşüktür. Bu durum

ilk aşama olan partiküllerin etkileşimlerini minimize etmede olumlu sonuç alındığını göstermiştir.



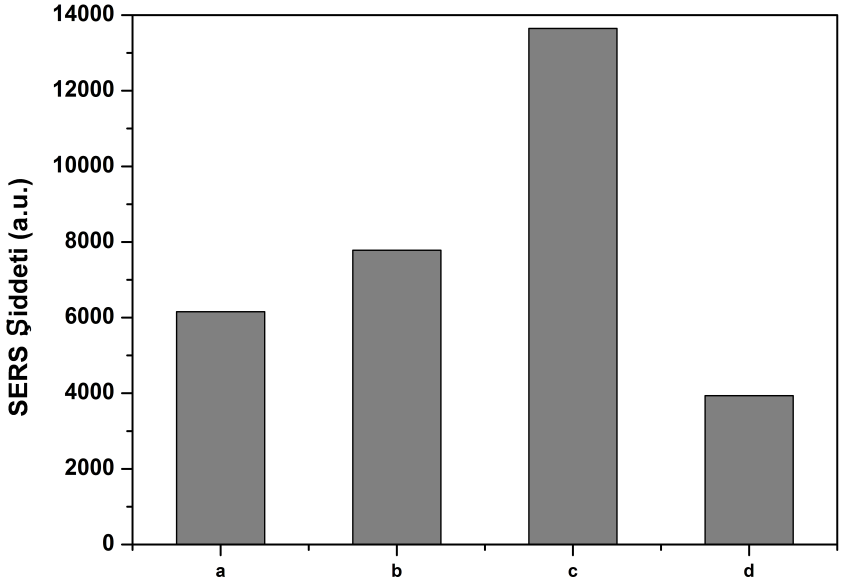
Şekil 4.26. Altın manyetik ve altın çubuk nanopartiküllerin birbiri ile etkileşimi ve yıkama sonrası YGRS şiddeti

Bir sonraki basamak olan yüzeylere bağlanmış karboksil gruplarının aktivasyonudur. Aktivasyon sonrası partiküller, PBS tamponuna alınıp santrifüj ile çöktürüldükten sonra 30 dakika karıştırıcı varlığında birbiriyle karşılaştırılmış, manyetik seperasyon ile PBS yıkamalarının ardından TLC kağıt üzerine YGRS ölçümleri alınmıştır. Alınan YGRS ölçümlerine göre aktif uçların açıkta kalması sonucu spesifik olmayan partikül etkileşimleri gözlenmektedir (Şekil 4.27). Bu nedenle aktif uçların yeterli oranda kapatılması gerekmektedir. Kullanılan prob konsantrasyonu bu aşama için önemlidir. Daha önce yapılan optimizasyon çalışmaları ile 3 μM prob konsantrasyonu aktif uçları kapatmada yeterli görülmüştür ve deneyin daha sonraki aşamalarına belirlenen konsantrasyonda devam edilmiştir.



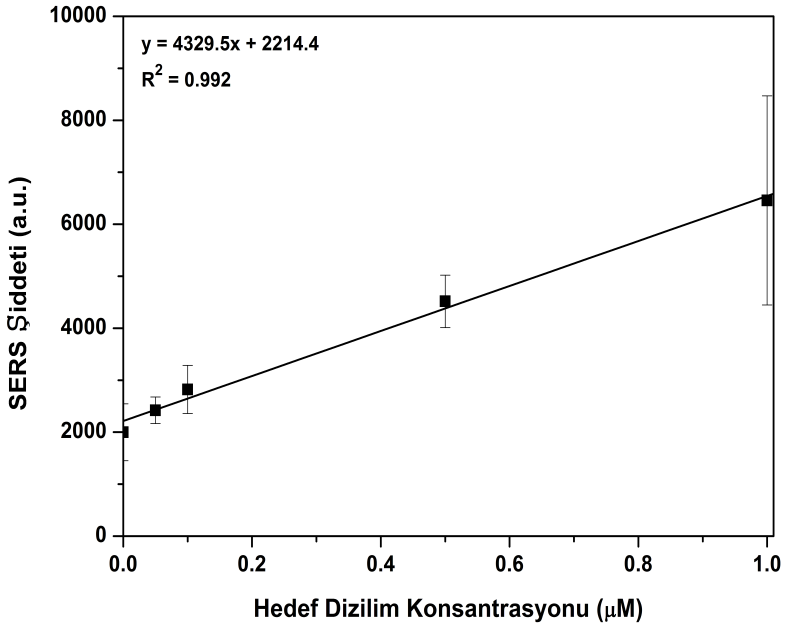
Şekil 4.27. Altın çubuk partikülün DTNB sinyali ve iki partikülün karşılaşması sonrası alınan sinyal

Aktivasyon aşamasının sonuçları görüldükten sonra aktif uçlara prob bağlama basamağına devam edilmiş ve EDC-NHS ile aktivasyonu sağlanmış karboksil gruplarına 3 μM konsantrasyonunda 5 spacer prob bağlanmıştır. Üzerlerinde prob bağlanmış partiküller PBS tamponuna alınmıştır ve iki partikül tekrar birbiriyle karşılaştırılmıştır (Şekil 4.28). Alınan sonuçlara göre spesifik olmayan bağlanma oranı düşürülmüştür. Partiküllerin bağlanmasıyla birlikte partiküller birbirinden prob miktarı kadar uzaklaşmış olup spesifik olmayan partikül-partikül etkşileşimlerinin azaldığı gözlemlenmiştir.



Şekil 4.28. Altın çubuğun modifikasyon aşamaları ve partiküllerin birbiriyle etkileşiminden sonra altın partiküllerin üzerinde kalan DTNB sinyali (a: dtnb bağlıau-çubuk, b: dtnb bağlı au-çubuk+edc/nhs, c: dtnb bağlı au-çubuk+edc/nhs+prob, d: (prob1 immobilize edilmiş manyetik nanopartikül)+(prob2 immobilize edilmiş au-çubuk))

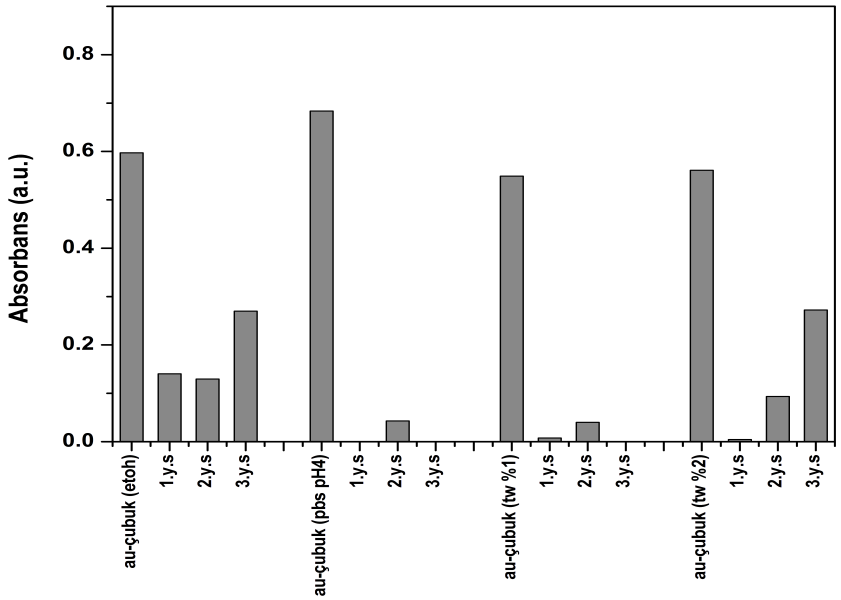
Yapılan denemeler sonucunda karar verilen seyreltme oranları en son aşama olan hedef dizilim ile hibridizasyon aşaması için de gerçekleştirilmiş ve sandiviç yapı oluşturulmuştur. Prob bağlama aşaması dahil aynı şekilde hazırlanan partiküllerin açıkta kalan bölgeleri alanin ile kapatılmıştır. Daha sonra iki partikül hedef dizilim olmayan ve farklı konsantrasyonlarda hedef dizilim olan ortamlarda karşılaştırılmış ve sandviç yapı elde edilmiştir. Hazırlanan örneklerde 1'er µL TLC kağıt üzerine damlatılmış ve DTNB sinyalleri takip edilmiştir. Alınan değerler ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 4.29).



Şekil 4.29. Hedef dizilim varlığında elde edilen kalibrasyon eğrisi

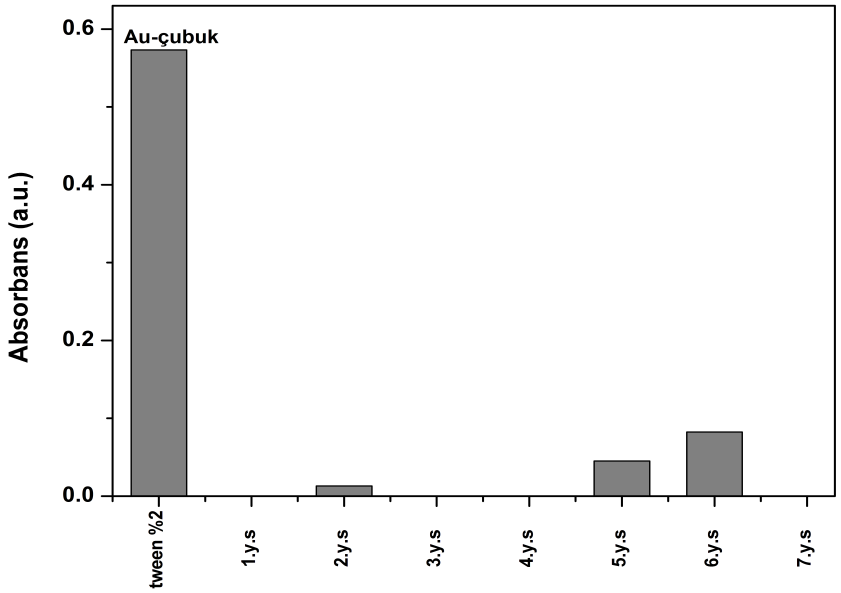
4.2.3.2 Yıkama Prosedürleri

Partiküller arasında gerçekleşen spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi amacıyla yapılması gereken bir diğer işlem, farklı yıkama prosedürlerinin uygulanmasıdır. Bunun için çubuk ve küre partiküller üzerlerine sırasıyla DTNB ve 11-MUA ile SAM oluşturulduktan sonra birbirleriyle etkileştirilmiş sonra etanol, PBS (pH 4), %1 ve %2'lik Tween 20 gibi farklı yıkama çözeltileri ile manyetik ayırım yapılarak yıkanmıştır. PBS tamponunun pH değeri 4'e düşürülerek iyonik etkileşmelerin önüne geçilebileceği düşünülmüştür. Partiküllerin kendi spesifik spektrumlarından 520 ve 720 nm dalga boyu takip edilerek UV'de ölçüm alınmıştır (Şekil4.30).



Şekil 4.30. Farklı yıkama çözeltilerinin spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisi

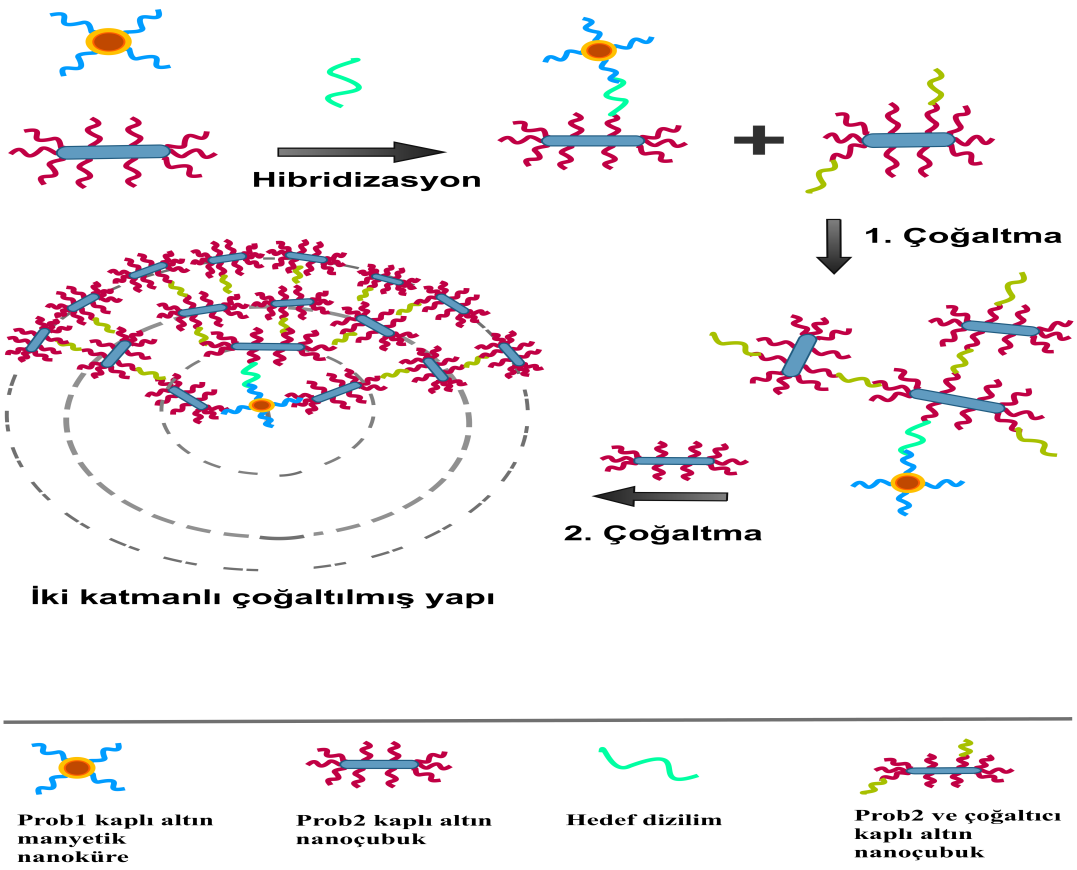
Alınan sonuçlara göre pH 4'e ayarlı PBS ile yapılan yıkamada yapının bozulduğu görülmüştür. Bunun yanında %2'lik Tween 20 ile yıkamada spesifik olmayan etkileşimler düşük oranda da olsa önlenebilmiştir. Etanolde sonuçlar iyi olmasına rağmen denemenin ilerleyen aşamalarında etanol kullanımının agregasyona neden olduğu belilenerek kullanımından vazgeçilmiş ve %2 Tween 20 ile ile yapılan yıkamların iyi sonuç vereceği düşünülerek yıkama aşamaları incelenmiştir. Buna göre UV'de yine partikülün kendi spesifik spektrumu içinde belirli bir dalga boyu takip edilerek bakılan yıkama suları için Şekil 4.31'deki sonuçlar elde edilmiştir. Yıkama sularından alınan sinyaller toplandığında altın-çubuğun ancak %25'nin geri kazanıldığı görülmüştür. Ancak yapılan bu çalışmalarla iki partikül birbirinden yeterli ve istenilen düzeyde uzaklaştırılamamıştır. Bu nedenle bu kısma kadar yapılan denemelerde kullanılan PSB (pH 7.4) tamponu ile devam edilmeye karar verilmiştir.



Şekil 4.31. %2'lik Tween 20 ile elde edilen yıkama sularının UV spektrumları

4.3 DNA Analiz Yönteminin Geliştirilmesi

YGRS bazlı DNA tayini yönelik farklı bir yöntem geliştirilmiş ve paralel amplifikasyon olarak adlandırılmıştır. Bu yöntemde manyetik partiküller ile YGRS işaretli manyetik olmayan çubuk şekilli nanopartiküller kullanılmıştır. Şekil 4.32'de şematize edilen paralel amplifikasyonda her iki partikülün yüzeyine prob immobilize edildikten sonra hedef DNA varlığında hibridizasyon gerçekleştirilmektedir. Bu yapının üzerine maksimum düzeyde "hot spot"lar oluşacak şekilde aşamalı olarak yine prob bağlı çubuk formda nanopartiküller eklenmekte, yıkama işlemiyle bağlanmayan YGRS işaretli partiküller ortamdan ayrıldıktan sonra YGRS intensitesi belirlenmektedir. Bu şekilde oluşturulan katmanlar sayesinde, ortamda az miktarda DNA olmasına karşın DNA'nın tespit edilebilmesini sağlamaktadır.

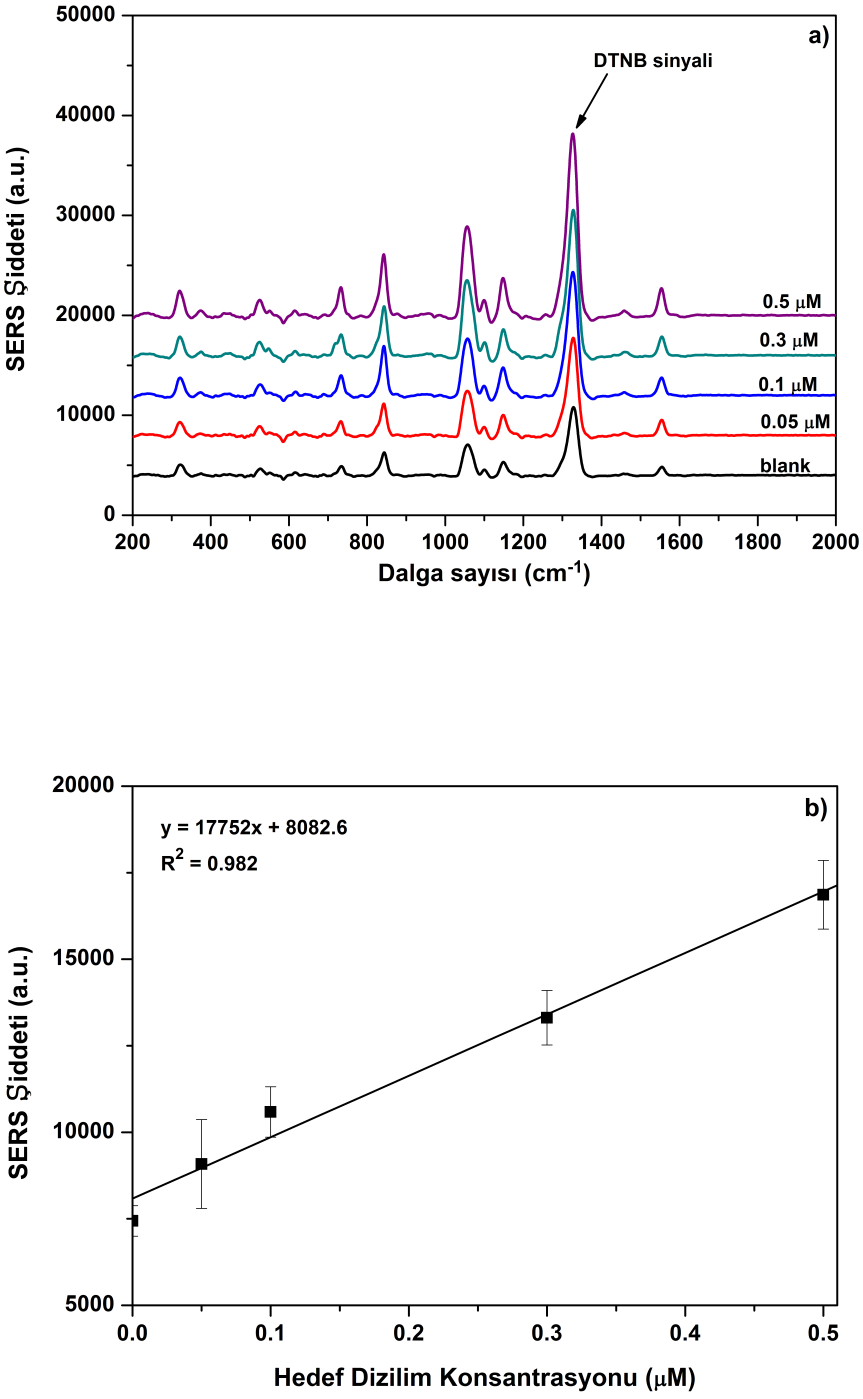


Şekil 4.32. Paralel amplifikasyon stratejisi

4.3.1 Paralel Amplifikasyon Stratejisi

Raman saçılımını güçlendirmek ve hassasiyeti arttırmakamacıyla prob bağlı YGRS işaretler kullanılarak birim hedef molekül varlığında maksimum intensite elde edilmeye çalışılmıştır. Bu aşamada maksimum düzeyde “hot spot”lar oluşacak şekilde aşamalı olarak nanopartiküller problar kullanılarak bir araya getirilmiş, yıkama işlemiyle bağlanmayan YGRS işaretler ortamdan ayrıldıktan sonra YGRS intensitesi belirlenmiştir.

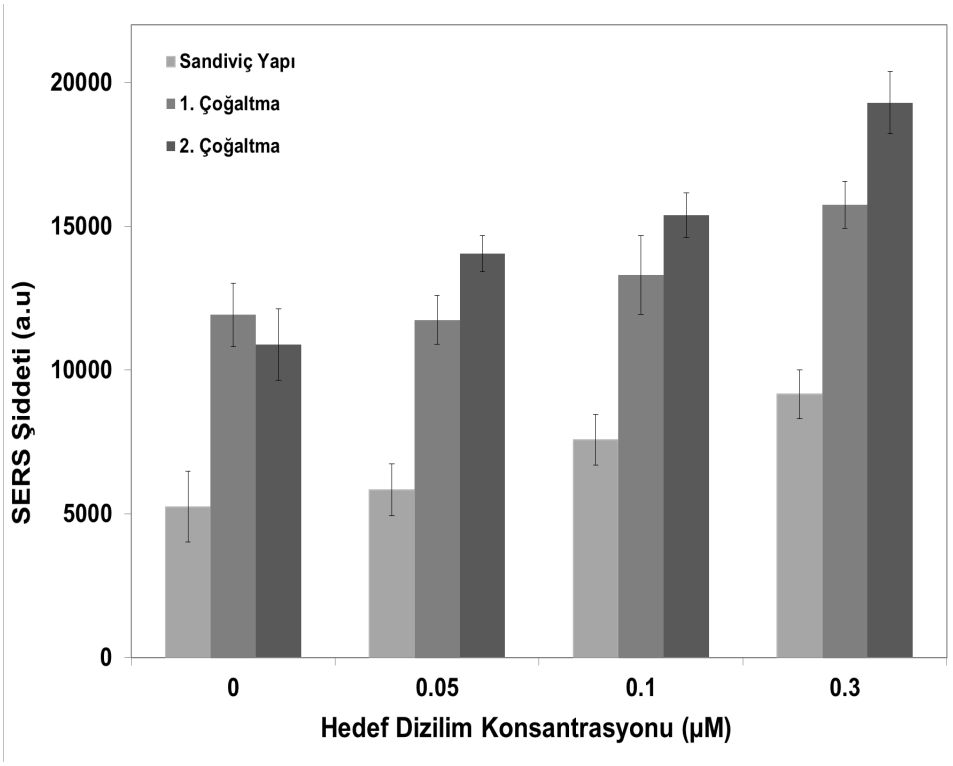
Yapılan tüm optimizasyon çalışmalarının ardından paralel amplifikasyon denemesinde 50-300 nM arasındaki değişen hedef dizilim konsantrasyonlarında çalışılmıştır. Ortamdaki hedef dizilimin tespit edilebilmesi amacıyla yukarıda anlatılan prosedür ile sandviç yapılar oluşturulduktan sonra TLC kağıt üzerinde olmak üzere yüzeyde ölçümler alınmış ve kalibrayon eğrisi çıkartılmıştır (Şekil 4.33).



Şekil 4.33. Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlerden elde edilen YGRS spektrumları (offset 4000 intensite), b. Sandviç yapıdan elde edilen kalibrasyon eğrisi

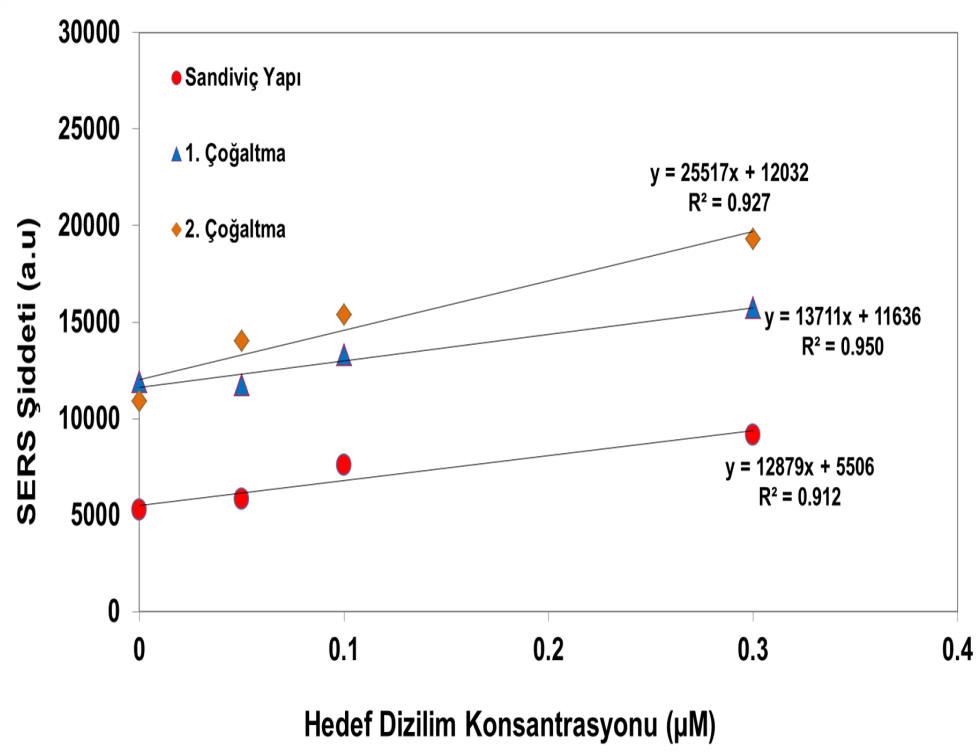
Sonuçlara bakıldığı zaman sistemin çalıştığı belirlenmiş ancak hassasiyet arttırılmak istenmiştir. Bu yüzden sistemin hassasiyetinin artırılması amacıyla paralel amplifikasyon, yani diğer bir deyişle işaretçi nanopartiküllerle yapının büyütülerek daha şiddetli bantlar elde edilmesi amaçlanmıştır. Bu strateji doğrultusunda yapılan denemede öncelikle hedef dizilim sandviç yapı oluşturularak yakalanmış ve ardından bu yapı üzerine işaretçi partiküller gönderilmiştir. İşaretçi partiküllerin yapıya bağlanıp büyütmesi işaretçi nanopartiküller üzerinden gerçekleştirilmeye çalışılmıştır. Bu yüzden yapının büyütülmesi basamağında ortama işaretçi partiküllerin üzerine immobilize edilmiş olan prob 2 dizilimlerini tamamlayıcı dizilimlere sahip DNA molekülü eklenmiştir. Ardından PBS tamponu ile yıkamalar yapılarak YGRS ölçümleri alınmıştır. Sinyallerde ciddi oranda artış gerçekleştiği gözlenmiştir. Bu aşamadan sonra amplifikasyon koşulları üzerinde çalışılarak sistemin hassasiyeti artırılmaya çalışılmıştır. Bunun için altın çubuk ve altın manyetik nanoprtiküllere 20'şer mM SAM yapıldıktan sonra EDC-NHS ile aktivasyon aşaması yapılarak üç farklı uzunluğa sahip problardan 5 spacer olan ile daha iyi sonuçlar alınması nedeniyle denemeler bu prob kullanılarak yapılmıştır. Alanin ile blokasyon sağlanarak farklı konsantrasyonlardaki hedef dizlim ile hibridizasyonu sağlamak için sandiviç yapı oluşturulmuştur.

Bu tip amplifikasyonda, sandviç yapının eldesinden sonra sinyal kuvvetini artırmak için ikinci ve üçüncü bir yapının ortama eklenmesi söz konusudur. İki aşamalı amplifikasyonun birinci basamağında tamamlayıcı dizilim olan DNA parçacığı mevcut olup, yapının sandviç yapıya bağlanması için, yapı her iki ucu prob 2 komplementeri olan dizilimi içermektedir. Amplifikasyonun ikinci basamağında ise oluşturulan bu yapının üzerine yine prob 2 bağlı YGRS işaretli altın çubuklar gönderilerek YGRS'de sinyal artışları takip edilmiştir (Şekil 4.34).



Şekil 4.34. Amplifikasyon basamakları gerçekleştirildikten sonra alınan YGRS şiddetleri

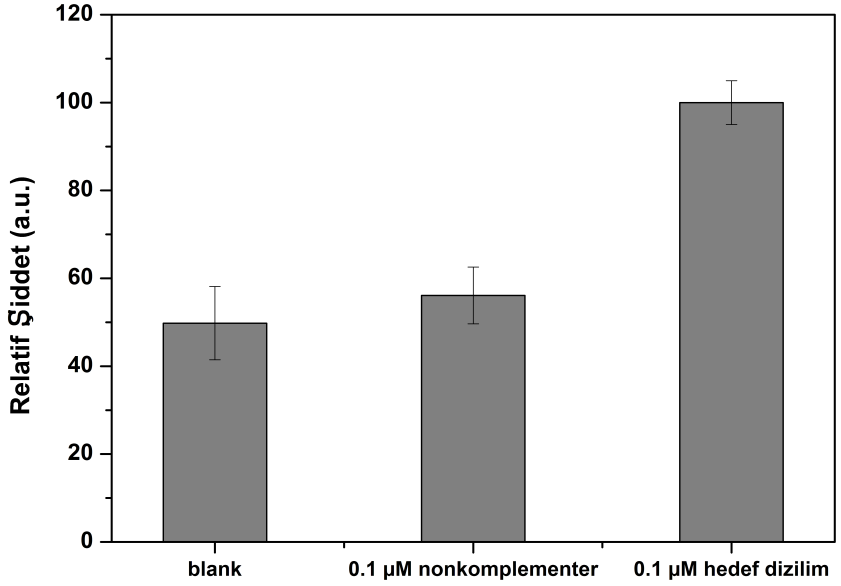
Alınan sonuçlara göre her bir amplifikasyon sonrası sinyallerin arttığı gözlenmiştir. Ayrıca alınan sonuçlar, kendi içlerinde kalibrasyon eğrisi çizmeye olanak sağlamıştır (Şekil 4.35). Bu durum YGRS'den alınan sinyalleri arttırmak için düşünülen tasarımın ve paralel amplifikasyonun etkinliğini göstermiştir.



Şekil 4.35. Sandiviç yapı ve paralel amplifikasyon sonrası elde edilen kalibrasyon grafikleri

4.3.2. Geliştirilen Yöntem için Pozitif ve Negatif Kontroller

Yöntemin hedef dizilime seçiçiliğini kontrol etmek amacıyla hedef dizilimden farklı bir dizilim (nonkomplementer) ile sandviç yapı oluşturulmuştur. Bu amaçla daha önce açıklanan deneme prosedürü temel alınmış ve YGRS sonuçları elde edilmiştir. Hedef dizilim ile hedef dizilimden farklı dizilimin relatif intensitelerinin sonuçlarının kıyaslaması aşağıda verilmiştir (Şekil 4.36). Bu amaçla 0.1 µM hedef dizilimden elde edilen YGRS intensitesi 100 kabul edilmiştir.



Şekil 4.36. Hedef dizilim ile hedef dizilimden farklı dizilimin relatif intensiteleri

Sonuçlar incelendiğinde hedef dizilimden farklı olan dizilimin relatif şiddetinin oldukça düşük olduğu bununla birlikte blank ile yakın değerlere sahip olduğu görülmektedir. Nonkomplementer yapıdan elde edilen YGRS sinyallerinin hedef dizilimden düşük ve blank sinyallerine yakın olması sistemin hedef dizilime karşı seçici olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen metodun doğruluğunu ortaya koymak amacıyla Bt-176 mısır geninin 35 S bölgesinin 200 bazlık bölgesi PZR ile çoğaltılılarak elde edilen PZR ürünü gerçek örnek denemesi için kullanılmıştır. Elde edilen PZR ürünü gerekli seyreltmeler yapılarak 0.2 ve 0.5 µM olarak yukarıda açıklanan prosedürde olduğu gibi hedef dizilimi ekleme aşamasında yapıya dahil edilmiş ve YGRS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen sonuç Şekil 4.33'deki kalibrasyon grafiğinde elde edilen 0.2 ve 0.5 µM konsantrayonlarının YGRS şiddeti ile kıyaslanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. 0.2 ve 0.5 μM PZR ürünü ile kalibrasyon eğrisinden elde edilen YGRS şiddetlerinin kıyaslanması

	Hedef Dizilim	PZR ürünü
0.2 μM	11633.0	11348.75
0.5 μM	16861.4	16596.4

5. SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu tez kapsamında analiz ortamında genetik modifiye gıdaları temsil edebilecek hedef dizilim ya da dizilimlerin olması durumunda bu dizilimin varlığını ortaya koyabilecek, paralel amplifikasyon olarak adlandırılan yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemin uygulanabilmesi için öncelikle manyetik olan ve olmayan nanopartiküller sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Manyetik altın partikül sentezi için öncelikle demir nanopartikül sentezlenmiştir. Bu partiküllerin oluşumu kontrollü bir yükseltgenme ile gerçekleştirildiğinden kendiliğinden manyetik özellik göstermektedir. Elde edilen bu demir çekirdeklerin üzeri altın kaplanmış ve denemelerde kullanılmıştır. Altın kaplama yapılmasının nedeni, altının spesifik kimyasal reaksiyonlarının iyi bilinmesidir. Ortama eklenen moleküller, altın yüzey ile reaksiyona girip kovalent olarak bağlanabilmektedir. Manyetik olmayan partikül olarak, yine altın çubuk nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu partiküller, çekirdek yönlendirmeli büyüme yöntemi kullanılarak elde edilmiştir. Sentezlenen partiküllerin karakterizasyonu TEM ve UV ölçümleri ile gerçekleştirilmiştir.

Daha öncede bahsedildiği gibi altın, kimyasal reaksiyonların gerçekleşebildiği ve moleküllerin kovalent bağlanabildiği yüzeylerdir. Dolayısıyla tespit edilmek istenen DNA diziliminin partiküller aracılığı ile ortamdan alınabilmesi için bu DNA' nın komplementeri olan dizilimlerin (prob) nanopartikül yüzeylerine immobilize olması gerekmektedir. Bunun için partikül yüzeylerinde fonksiyonel grupların oluşturulması gerekmektedir. Bu aşamada manyetik altın nanopartikül yüzeyinde 11-MUA ile, altın çubuk yüzeyinde ise aynı zamanda YGRS işaretçisi olarak bilinen DTNB ile SAM oluşturulmuş ve böylece tiol gruplarından altın demir nanopartiküller üzerine kimyasal olarak fonksiyonel grupların (karboksil grupları) bağlanması sağlanmıştır. Bir sonraki aşama, partikül yüzeylerindeki karboksil gruplarının aktive edilmesidir. Bunun için EDC-NHS aktivasyonu yapılmaktadır. Bu işlem sonucu, partiküller, üzerlerine prob bağlamaya hazır olmaktadır. Bölüm 3' de anlatıldığı üzere, her bir aşama farklı konsantrasyonlarda moleküller kullanılarak optimize edilmeye çalışılmıştır. Aynı şekilde immobilize edilen prob miktarlarına farklı konsantrasyonlarda hedef dizilim ortama eklenerek sandviç yapılar elde edilmiş (Şekil 3.1) ve YGRS sinyalleri takip edilmiştir. Tüm bu aşamalarda SAM moleküllerinin konsantrasyonları, spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek

için kullanılan blokasyon ajanları, yıkama prosedürleri ve çeşitleri gibi pek çok parametre üzerinde de optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Tüm bu optimizasyon çalışmaları sonucu hedef dizilimi yüksek hassasiyetle tespit eden paralel amplifikasyon yöntemi geliştirilmiştir.

Paralel amplifikasyon yönteminde oluşturulan sandviç yapı üzerine Şekil 4.32'de gösterildiği gibi altın çubuklar üzerindeki prob 2 ile hibridize olabilecek komplementer dizilimi taşıyan diğer prob 2 bağlı altın çubuk gönderilmektedir. Altın çubukları birleştirerek sinyal artışını sağlayan DNA dizilimi anlaşılacağı üzere her iki ucundan prob 2 komplementeri olarak dizayn edilmiştir. Bu işlem iki katmanlı amplifikasyon oluşturacak şekilde gerçekleştirilerek YGRS sinyalinin daha fazla artması sağlanmıştır. Böylece ortamda çok düşük konsantrasyonda (50 nM) hedef dizilim olsa bile tespit edilebildiği gösterilmiştir. Bu çalışmada raman işaretçisi olarak DTNB ile etiketlenmiş 15x45 nm boyutunda altın çubuklar ve 9.0±2 nm boyutunda altın manyetik küre partiküller kullanılmıştır. Sandiviç yapı oluşturarak partiküllerin oluşturduğu temas noktalarından (hot-spot) faydalanılarak sinyallerde artış elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemde oluşturulan sandiviç yapı için 0-0.3 μM aralığındaki hedef dizilim konsantrasyonlarına karşı DTNB bant şiddetindeki değişimi takip edilerek, gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) sırasıyla 0.29 μM ve 0.95 μM olarak bulunmuştur. Alınan sinyalleri daha da güçlendirmek ve hassasiyeti arttırmak için yapılan 2 katmanlı paralel amplifikasyonda birinci katman için elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.24 μM ve 0.80 μM ve ikinci katman için elde edilen LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.14 μM ve 0.49 μM ve lineer korelasyon R^2=0.927 olarak bulunmuştur. Oluşturulan katmanlarla birlikte hassasiyet artmıştır ve geliştirilen model için 2. katmanda oluşturulan amplifikasyonda en düşük hedef molekül konsantrasyonunun (0.05 μM) sinyali %141 oranında artmıştır. Tüm bu sonuçlar çizelge 5.1'de özetlenmistir.

Çizelge 5.1. Paralel amplifikasyon stratejisi için elde edilen sonuçlar

PARALEL AMPLİFİKASYON STRATEJİSİ	
Regresyon Katsayısı	0.927
Grafik Denklemi	y= 25517x + 12032
LOD (sandiviç yapı)	0.29 μM
LOD (1. Katman)	0.24 μM
LOD (2. Katman)	0.14 μM
Seçicilik	+
Spesifiklik	+
Hassasiyet	+
% Artış	% 141
Optimum mesafe	5 spacer prob

Geliştirilen paralel amplifikasyon denemesine benzer literatürde Hu vd. tarafından gerçekleştirilmiş tek bir çalışma bulunmaktadır [114]. Bu tez kapsamında yapılan çalışma ile diğer çalışma karşılaştırıldığında, her şeyden önce her iki çalışmada önemli bir DNA dizilimini YGRS sinyali üzerinden saptamayı hedeflemiştir. Bu çalışmada mısırda genetik modifikasyon yapılıp yapılmadığı tespit edilirken Hu vd.'nin yaptığı çalışmada HIV'e ait dizilim olup olmadığı araştırılmıştır. Her iki yöntemde de belirli bir dizilimin tespiti amaçlanmış olsa bile bazı farklılıklar bulunmaktadır. Bu çalışmada manyetik altın nanoküreler ve manyetik olmayan altın nanoçubuklar kullanılmış ve üzerlerinde farklı moleküller ile SAM oluşturulmuştur. Bu moleküllerden biri daha önceden de bahsedildiği gibi nanoçubukların işaretlendiği DTNB'dir ve çalışma DTNB sinyali üzerinden yürütülmüş ve yaklaşık 1300 cm^{-1} de karakteristik NO_2 bandı ile takip edilmiştir. Diğer çalışmada ise YGRS işaretçisi olarak X-Rhodamin kullanılmış ve karakteristik bant olarak C-C gerilmesine bağlı olarak 1497 cm^{-1} bandı tercih

edilmiştir. DNA probları, uçlarına X-Rhodamine eklenmiş olarak sentezletilmiştir. Çalışma altın yüzeyde gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ise manyetik altın nanoküreler üzerinden, manyetik ayrıma bağlı olarak gerçekleştirilmiştir. Diğer çalışma sinyal oluşumu için gereken sandviç yapıyı ve sinyal artışı için diğer katmanları birbirinin komplementeri olan iki prob kullanarak gerçekleştirmiştir. Dolayısıyla her bir katman oluşumu için ortama sıralı verilmiş ve hibridizasyon sağlanmıştır. Bu çalışmada ise manyetik olan ve olmayan yüzeylerine immobilize edilen problar birbirinin komplementeri değildir. Ama katman oluşumu hep nanoçubuk üzerindeki DNA dizilimleri (prob 2) ile sağlanmıştır. Bu da her iki ucundan prob 2'nin komplementeri olan diğer bir dizilim ile gerçekleştirilmiştir. Hu vd. tarafından gerçekleştirilen çalışmada 4 katman olacak şekilde sinyal artışı sağlanmış ve en yüksek YGRS intensitesi en son tabakada elde edilebilmiştir ve birinci katman için elde edilen sinyal artışı %115 olarak belirtilmiştir. Yaptığımız çalışmada ise 2. katmanda oluşturulan amplifikasyonda en düşük hedef molekül konsantrasyonu (0.05 μM) için %141 sinyal artışı gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada ise atopik deri iltihabının genetik markörü olan kemokin CCL17 (chemokines CCL17) materyalini takip edebilmek için porlu yapıya sahip çitosanlı gümüş nanopartikül ve rodamin B işaretçisini kullanmışlar. Burada YGRS substratı hazırlığı için zahmetli basamaklar gerekmekte ve substratın hazır hale gelmesi için donma, liyofilizasyon, yıkama gibi basamakları için yaklaşık 1 hafta gerekmektedir. Bu nedenle bu yöntem DNA tayini için çok pratik değildir [59].

DNA spacer uzunluklarını konu alan bir çalışmada porlu gümüş partiküller kullanılarak 8, 14, ve 20 baz çiftini içeren DNA probları denenmiştir. Gümüş partiküller ile sandiviç yapı oluşturularak spacerlar denenmiş ve aradaki uzaklığın artmasıyla YGRS şidetleri arasında ters orantı olduğu saptanmıştır. Gümüşteki porlu yapıların YGRS sinyallerini önemli bir biçimde arttırdığı saptanmış fakat bu artışın por büyüklükleriyle değişmediğini ancak değişen YGRS şiddetinin baz uzunluklarıyla ilgili olduğu ortaya koyulmuştur. Bu durum por büyüklüklerine karşı elde edilen relatif şiddetin por büyüklüklerine karşı hassasiyet teşkil etmediğini göstermektedir [94]. Yaptığımız çalışmada ise 14, 18 ve 23 (1,5 ve 10 spacer problar) baz dizilimli DNA uzunlukları denenmiştir ve sandiviç yapı altın çubuk ve manyetik küre nanpartiküller arasında oluşturulmuştur. Kullanılan partiküller porlar

içermediği için por büyüklüklerine göre YGRS şiddetlerinin değişmesi söz konusu olmayıp elde edilen YGRS şiddetleri baz uzunluklarına göre değişimi göstermiştir. En iyi hassasiyet ve doğruluk 5 spacer prob olarak adlandırdığımız 18 baz dizilimli DNA parçacacığı için (modifiye edilmiş iki partikül arası mesafe yaklaşık olarak 7.8 nm olarak) elde edilmiştir.

DNA ile patojen tayinine yönelik yapılan bir çalışmada altın çubuk nanopartiküller kullanılarak sandiviç tipi analiz yöntemi geliştirilmiştir. Çalışılan patojenin spesifik gen dizilimine karşı sistem seçici davranırken spasifik olmayan bir patojenin gen dizilimine karşı sistem seçicilik göstermemiştir [111]. Altın çubuk partiküller ile yapılan çalışmada kullanılan GDO'lu gen dizilimi (Bt-176 mısır örneği) ve bu dizilime seçici olmayan hedef dizilim (non-complementary) için kurulan sandiviç yapıda, sistem seçici davranış gösterek non-komplementer kısım için elde edilen sinyaller blank sinyallerine çok yakın çıkmıştır.

Çalışmanın pozitif ve negatif kontrollerine yönelik yapılan denemde ise 0.1 μM konsantrasyonda hedef dizilimin 100 birimlik relatif sinyale karşılık hedef dizilimden farklı dizilimde ise 56 birimlik relatif sinyal tespit edilmiştir. Bt-176 mısır örneği PZR'da çoğaltılarak farklı derişimlerdeki örnekler geliştirilen amplifikasyon yöntemleriyle etkileştirilmiş ve band şiddetlerindeki değişim incelenmiştir. Buna göre paralel amplifikasyonda ise 0.5 μM konsantrasyonu için hedef dizilimden 16861 a.u., PZR ürününden ise 16596 a.u. değeri elde edilirken, 0.2 μM konsantrasyonu için hedef dizilimden 11633.0 a.u., PZR ürününden ise 11349 a.u. değeri elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde geliştirilen analiz yönteminin PZR ile paralel sonuçlar verdiği ve DNA'nın tayinine alternatif bir yöntem olabileceği söylenebilir.

KAYNAKLAR

[1] Kulaç İ., Ağırdil Y., and Mehmet, Y., Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri, *Türk Biyokimya Dergisi*, 31, 151-155, **2006**.

[2] Ece, K., Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar (GDO), *Sağlık ve Afiyet*, 17, 2-15, **2013**.

[3] Holst-Jensen, A., Bertheau, Y., de Loose, M., Grohmann, L., Hamels, S., Hougs, L., Morisset, D., Pecoraro, S., Pla, M., den Bulcke, M.V., and Wulff, D., Detecting un-authorized genetically modified organisms (GMOs) and derived materials, *Biotechnology Advances*, 30, 1318-1335, **2012**.

[4] Zhu, D., Liu, J., Tang, Y., and Xing, D., A reusable DNA biosensor for the detection of genetically modified organism using magnetic bead-based electrochemiluminescence, *Sensors and Actuators B-chemical*, 149, 221-225, **2010**.

[5] Liu, J., Xing, D., Shen, X., and Zhu, D., Detection of genetically modified organisms by electrochemiluminescence PCR method, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 436-441, **2004**.

[6] Abdullah, T., Radu, S., Hassan, Z., and Hashim, J.K., Detection of genetically modified soy in processed foods sold commercially in Malaysia by PCR-based method, *Food Chemistry*, 98, 575-579, **2006**.

[7] Kim, J.-H., Zhang, D., and Kim, H.-Y., Detection of sixteen genetically modified maize events in processed foods using four event-specific pentaplex PCR systems, *Food Control*, 35, 345-353, **2014**.

[8] Şehnaz, Ö., Moleküler Metotların Gıda Kontrollerindeki Uygulama Alanları, *Türkiye Bilimsel Derlemeler Dergisi*, 5, 75-81, **2012**.

[9] Kong, R.-M., Song, Z.-L., Meng, H.-M., Zhang, X.-B., Shen, G.-L., and Yu, R.-Q., A label-free electrochemical biosensor for highly sensitive and selective detection of DNA via a dual-amplified strategy, *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 442-447, **2014**.

[10] Thavanathan, J., Huang, N.M., and Thong, K.L., Colorimetric detection of DNA hybridization based on a dual platform of gold nanoparticles and graphene oxide, *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 91-98, **2014**.

[11] Imani, R., Iglič, A., Turner, A.P.F., and Tiwari, A., Electrochemical detection of DNA damage through visible-light-induced ROS using mesoporous TiO2 microbeads, *Electrochemistry Communications*, 40, 84-87, **2014**.

[12] Jing, X., Cao, X., Wang, L., Lan, T., Li, Y., and Xie, G., DNA-AuNPs based signal amplification for highly sensitive detection of DNA methylation, methyltransferase activity and inhibitor screening, *Biosensors and Bioelectronics*, 58, 40-47, **2014**.

[13] Mese, F., Congur, G., and Erdem, A., Voltammetric and impedimetric detection of DNA hybridization by using dendrimer modified graphite electrodes, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 719, 92-97, **2014**.

[14] Chidumayo, N.N., Yoshii, K., Saasa, N., Sakai, M., and Kariwa, H., Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins, *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 78, 373-378, **2014**.

[15] Priya, R., Khan, M., Rao, M.K., and Parida, M., Cloning, expression and evaluation of diagnostic potential of recombinant capsid protein based IgM

ELISA for chikungunya virus, *Journal of Virological Methods*, 203, 15-22, **2014**.
[16] Tripp, R.A., Dluhy, R.A., and Zhao, Y., Novel nanostructures for SERS biosensing, *Nano Today*, 3, 31-37, **2008**.
[17] Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R.R., and Feld, M.S., Surface-enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level, *Chemical Physics*, 247, 155-162, **1999**.
[18] Guven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U., and Boyac, I.H., SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration, *Analyst*, 136, 740-748, **2011**.
[19] Premasiri, W.R., Moir, D.T., Klempner, M.S., Krieger, N., Jones, G., and Ziegler, L.D., Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria, *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, 312-320, **2004**.
[20] Ravindranath, S.P., Wang, Y., and Irudayaraj, J., SERS driven cross-platform based multiplex pathogen detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 152, 183-190, **2011**.
[21] Wang, Y., Lee, K., and Irudayaraj, J., Silver Nanosphere SERS Probes for Sensitive Identification of Pathogens, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114, 16122-16128, **2010**.
[22] Yan, B., Thubagere, A., Premasiri, W.R., Ziegler, L.D., Dal Negro, L., and Reinhard, B.M., Engineered SERS Substrates with Multiscale Signal Enhancement: Nanoparticle Cluster Arrays, *ACS Nano*, 3, 1190-1202, **2009**.
[23] Liu, S., Chen, N., Li, L., Pang, F., Chen, Z., and Wang, T., Fabrication of Ag/Au core-shell nanowire as a SERS substrate, *Optical Materials*, 35, 690-692, **2013**.
[24] Panarin, A.Y., Terekhov, S.N., Kholostov, K.I., and Bondarenko, V.P., SERS-active substrates based on n-type porous silicon, *Applied Surface Science*, 256, 6969-6976, **2010**.
[25] Sancı, R. and Volkan, M., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies on silver nanorod substrates, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 139, 150-155, **2009**.
[26] Bishnoi, S.W., Lin, Y.-j., Tibudan, M., Huang, Y., Nakaema, M., Swarup, V., and Keiderling, T.A., SERS Biodetection Using Gold–Silica Nanoshells and Nitrocellulose Membranes, *Analytical Chemistry*, 83, 4053-4060, **2011**.
[27] Chon, H., Lee, S., Son, S.W., Oh, C.H., and Choo, J., Highly Sensitive Immunoassay of Lung Cancer Marker Carcinoembryonic Antigen Using Surface-Enhanced Raman Scattering of Hollow Gold Nanospheres, *Analytical Chemistry*, 81, 3029-3034, **2009**.
[28] Dou, X., Takama, T., Yamaguchi, Y., Yamamoto, H., and Ozaki, Y., Enzyme Immunoassay Utilizing Surface-Enhanced Raman Scattering of the Enzyme Reaction Product, *Analytical Chemistry*, 69, 1492-1495, **1997**.
[29] Neng, J., Harpster, M.H., Wilson, W.C., and Johnson, P.A., Surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection of multiple viral antigens using magnetic capture of SERS-active nanoparticles, *Biosensors and Bioelectronics*, 41, 316-321, **2013**.

[30] Ilaslan, K., Boyaci, I.H., and Topcu, A., Rapid Analysis of Glucose, Fructose And Sucrose Contents of Commercial Soft Drinks Using Raman Spectroscopy, *Food Control*, **2014**.
[31] Özbalci, B., Boyaci, İ.H., Topcu, A., Kadılar, C., and Tamer, U., Rapid analysis of sugars in honey by processing Raman spectrum using chemometric methods and artificial neural networks, *Food Chemistry*, 136, 1444-1452,
[32] Sivashanmugan, K., Liao, J.-D., You, J.-W., and Wu, C.-L., Focused-ion-beam-fabricated Au/Ag multilayered nanorod array as SERS-active substrate for virus strain detection, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 361-367, **2013**.
[33] Yao, C.-K., Liao, J.-D., Chang, C.-W., and Lin, J.-R., Spatially reinforced nano-cavity array as the SERS-active substrate for detecting hepatitis virus core antigen at low concentrations, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 174, 478-484, **2012**.
[34] Fang, C., Agarwal, A., Buddharaju, K.D., Khalid, N.M., Salim, S.M., Widjaja, E., Garland, M.V., Balasubramanian, N., and Kwong, D.-L., DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label, *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 216-221, **2008**.
[35] Guven, B., Dudak, F.C., Boyaci, I.H., Tamer, U., and Ozsoz, M., SERS-based direct and sandwich assay methods for mir-21 detection, *Analyst*, 139, 1141-1147, **2014**.
[36] Yuan, W., Ho, H.P., Lee, R.K.Y., and Kong, S.K., Surface-enhanced Raman scattering biosensor for DNA detection on nanoparticle island substrates, *Applied Optics*, 48, 4329-4337, **2009**.
[37] Zhang, Z., Wen, Y., Ma, Y., Luo, J., Jiang, L., and Song, Y., Mixed DNA-functionalized nanoparticle probes for surface-enhanced Raman scattering-based multiplex DNA detection, *Chemical Communications*, 47, 7407-7409, **2011**.
[38] Smith Even and Geoffrey, D., *Modern Raman Spectroscopy – A Practical Approach*, Wiley John, **2005.**
[39] Zhu, G., Zhu, X., Fan, Q., and Wan, X., Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78, 1187-1195, **2011**.
[40] Mikla, V.I. and Mikla, V.V., 8 - Raman Spectroscopy in Medicine, *Medical Imaging Technology*. (eds: Mikla, V.I. and Mikla, V.V.), Elsevier, Oxford, 129-141, **2014.**
[41] V., R.C., *The molecular scattering of light*, **1930.**
[42] Ferraro, J.R., Nakamoto, K., and Brown, C.W., *Chapter 1 - Basic Theory* Academic Press, San Diego, **2003.**
[43] Amer, M.S., *Raman Spectroscopy, Fullerenes and Nanotechnology*, RSC Publishing, **2010.**
[44] Chandrasekhara Venkata, R., Molecular diffraction of light, https://openlibrary.org/books/OL7035307M/Molecular_diffraction_of_light, **Mayıs 2014**.
[45] Güven, B., *Gida Uygulamalarina Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, Hacettepe Üniversitesi, **2011.**
[46] Seda, K., *Preparation And Characterization Of Silver Sers Nanotags*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, **2010.**

[47] B. Schrader and Moore, D.S., *Laser-Based Molecular Spectroscopy For Chemical Analysis: Raman Scattering Processes*, **1997.**
[48] Doğan, Ü., *Preparation And Characterization Of Surface Enhanced Raman Scattering Substrate Through Electro Deposition Of Silver-Pedot Film On Ito Glass Surface*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, **2011.**
[49] Yıldız A, Genç Ö, and S., B., *Enstrümental Analiz Yöntemleri* Hacettepe Üniversitesi Yayınları, Ankara, **1997.**
[50] Movasaghi, Z., Rehman, S., and Rehman, I.U., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 493-541, **2007**.
[51] Das, R.S. and Agrawal, Y.K., Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications, *Vibrational Spectroscopy*, 57, 163-176, **2011**.
[52] Efremov, E.V., Ariese, F., and Gooijer, C., Achievements in resonance Raman spectroscopy: Review of a technique with a distinct analytical chemistry potential, *Analytica Chimica Acta*, 606, 119-134, **2008**.
[53] Smith, W.E. and Rodger, C., Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS), Applications, *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Second Edition)*. (eds: Lindon, J.C.), Academic Press, Oxford, 2822-2827, **1999.**
[54] Pelletier, M.J. and Pelletier, C.C., RAMAN SPECTROSCOPY | Instrumentation, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. (eds: Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C.), Elsevier, Oxford, 94-104, **2005.**
[55] Fan, M., Andrade, G.F.S., and Brolo, A.G., A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry, *Analytica Chimica Acta*, 693, 7-25, **2011**.
[56] Yazğan, N.N., *Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (YGRS) Tekniği İle Proteaz Aktivitesi Tayini*, Yüksek lisans tezi, Hacettepe Üniversitesi, **2011.**
[57] Kosuda, K.M., Bingham, J.M., Wustholz, K.L., and Van Duyne, R.P., *3.09 - Nanostructures and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy* Academic Press, Amsterdam, **2011.**
[58] Fleischmann, M., Hendra, P.J., and McQuillan, A.J., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*, 26, 163-166, **1974**.
[59] Jeanmaire, D.L. and Van Duyne, R.P., Surface raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry*, 84, 1-20, **1977**.
[60] Albrecht, M.G. and Creighton, J.A., Anomalously intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 99, 5215-5217, **1977**.
[61] Baia, M., Astilean, S., and Iliescu, T., *Raman and SERS Investigations of Pharmaceuticals* Springer, Berlin, **2008.**
[62] Eric C. Le Ru and Etchegoin, P.G., *Principles of Surface Enhanced Raman Spectroscopy and Related Plasmonic Effects*, First Edition, Elsevier, **2009.**
[63] Sebahattin Gürmen and Ebin, B., Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri -1, *Metalurji Dergisi*, **2008**.
[64] Sharma, D., Single step, pH induced gold nanoparticle chain formation in lecithin/water system, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 107, 262-266, **2013**.

[65] Gilmartin, N. and O'Kennedy, R., Nanobiotechnologies for the detection and reduction of pathogens, *Enzyme and Microbial Technology*, 50, 87-95, **2012**.
[66] Temur, E., *Bakteri Tayini İçin Nanopartikül Tabanlı Sensör Geliştirilmesi*, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi, Ankara, **2010.**
[67] Luo, P.G. and Stutzenberger, F.J., Nanotechnology in the Detection and Control of Microorganisms, *Advances in Applied Microbiology*. (eds: Allen I. Laskin, S.S. and Geoffrey, M.G.), Academic Press, 145-181, **2008.**
[68] Perrault, S.D. and Chan, W.C.W., Synthesis and Surface Modification of Highly Monodispersed, Spherical Gold Nanoparticles of 50−200 nm, *Journal of the American Chemical Society*, 131, 17042-17043, **2009**.
[69] Mitamura, K. and Imae, T., Functionalization of Gold Nanorods Toward Their Applications, *Plasmonics*, 4, 23-30, **2009**.
[70] Murphy, C.J., Jana, N.R., Gearheart, L.A., Obare, S.O., Caswell, K.K., Mann, S., Johnson, C.J., Davis, S.A., Dujardin, E., and Edler, K.J., Synthesis, Assembly and Reactivity of Metallic Nanorods, *The Chemistry of Nanomaterials*. (eds: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 285-307, **2005.**
[71] Gole, A. and Murphy, C.J., Seed-Mediated Synthesis of Gold Nanorods: Role of the Size and Nature of the Seed, *Chemistry of Materials*, 16, 3633-3640, **2004**.
[72] Li, C.M., Zhen, S.J., Wang, J., Li, Y.F., and Huang, C.Z., A gold nanoparticles-based colorimetric assay for alkaline phosphatase detection with tunable dynamic range, *Biosensors and Bioelectronics*, 43, 366-371, **2013**.
[73] Ma, H., Tarr, J., DeCoster, M.A., McNamara, J., Caruntu, D., Chen, J.F., O'Connor, C.J., and Zhou, W.L., Synthesis of magnetic porous hollow silica nanotubes for drug delivery, *Journal of Applied Physics*, 105, -, **2009**.
[74] Salas, G., Costo, R., and Morales, M.d.P., Chapter 2 - Synthesis of Inorganic Nanoparticles, *Frontiers of Nanoscience*. (eds: Jesus, M.d.l.F. and Grazu, V.), Elsevier, 35-79, **2012.**
[75] Gültekin, A., *Sentetik Reseptörlere Dayalı Nano Algılama Sistemleri*, Doktora tezi, Trakya Üniversitesi, Edirne, **2009.**
[76] Murphy, C.J., Gole, A.M., Hunyadi, S.E., Stone, J.W., Sisco, P.N., Alkilany, A., Kinard, B.E., and Hankins, P., Chemical sensing and imaging with metallic nanorods, *Chemical Communications*, 544-557, **2008**.
[77] Ningthoujam, R.S., Vatsa, R.K., Kumar, A., and Pandey, B.N., 6 - Functionalized Magnetic Nanoparticles: Concepts, Synthesis and Application in Cancer Hyperthermia, *Functional Materials*. (eds: Banerjee, S. and Tyagi, A.K.), Elsevier, London, 229-260, **2012.**
[78] Mørup, S., Hansen, M.F., and Frandsen, C., 1.14 - Magnetic Nanoparticles, *Comprehensive Nanoscience and Technology*. (eds: Andrews, D.L., Scholes, G.D., and Wiederrecht, G.P.), Academic Press, Amsterdam, 437-491, **2011.**
[79] Shubayev, V.I., Pisanic Ii, T.R., and Jin, S., Magnetic nanoparticles for theragnostics, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 467-477, **2009**.
[80] Guo, H., Wyart, Y., Perot, J., Nauleau, F., and Moulin, P., Application of magnetic nanoparticles for UF membrane integrity monitoring at low-pressure operation, *Journal of Membrane Science*, 350, 172-179, **2010**.

[81] Safarik, I., Horska, K., Pospiskova, K., and Safarikova, M., Magnetic techniques for the detection and determination of xenobiotics and cells in water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404, 1257-1273, **2012**.
[82] Şöföroğlu, M., *Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi Tekniği Kullanılarak Hedef DNA Dizi Tayini*, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, **2013.**
[83] Portakal, O., Biyolojik Ölçümler ve Nanopartiküller, *Türk Biyokimya Dergisi*, 33, 35-38, **2008**.
[84] Li, L., Li, X., Li, L., Wang, J., and Jin, W., Ultra-sensitive DNA assay based on single-molecule detection coupled with fluorescent quantum dot-labeling and its application to determination of messenger RNA, *Analytica Chimica Acta*, 685, 52-57, **2011**.
[85] Xiang, D.-s., Zeng, G.-p., and He, Z.-k., Magnetic microparticle-based multiplexed DNA detection with biobarcoded quantum dot probes, *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4405-4410, **2011**.
[86] Passarge, E., *Color Atlas of Genetics*, Second ed., Thime, **2001.**
[87] Tamarin, R.H., *Principles of Genetics*, Seventh Ed., McGraw-Hill, **2001.**
[88] Kaynar, P., Genetik Olarak Değiştirilmiş Organizmalar (GDO)' a Genel Bakış, *türk Hijyen ve Deneysel Biyoloji Dergisi*, 66, 177-185, **2009**.
[89] Bhagavan, N.V. and Ha, C.-E., Chapter 21 - Structure and Properties of DNA, *Essentials of Medical Biochemistry*. (eds: Bhagavan, N.V. and Ha, C.-E.), Academic Press, San Diego, 275-286, **2011.**
[90] Hoy, M.A., Chapter 1 - DNA, Gene Structure, and DNA Replication, *Insect Molecular Genetics (Third Edition)*. (eds: Hoy, M.A.), Academic Press, San Diego, 3-36, **2013.**
[91] Sinden, R.R., Pearson, C.E., Potaman, V.N., and Ussery, D.W., DNA: Structure and function, *Advances in Genome Biology*. (eds: Ram, S.V.), JAI, 1-141, **1998.**
[92] Karabıçak, S., *Applicatin of Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) method for Genetic Analyses*, Doctor of Philosophy, Middle East Technical University, Ankara, **2011.**
[93] Lavery, R., Course 1 DNA structure, dynamics and recognition, *Les Houches*. (eds: Didier Chatenay, S.C.R.M.D.T. and Jean, D.), Elsevier, 1-40, **2005.**
[94] DNA sequence,
[95] Daniel L. Hartl and Jones, E.W., *Genetics: Principles and Analysis*, Fourth ed., Jones and Bartlett **1998.**
[96] Robinson, R., *Genetics*. Thomson Gale, **2003**.
[97] Bertheau, Y., *Genetically Modified and Non-Genetically Modified Food Supply Chains: Co-Existence and Traceability*. First ed. ed., Wiley-Blackwell, **2013**.
[98] Çırak, M.Y., Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Sistemleri, *Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi*, 19, **1999**.
[99] Weber, D., Milkovic, L., Bennett, S.J., Griffiths, H.R., Zarkovic, N., and Grune, T., Measurement of HNE-protein adducts in human plasma and serum by ELISA—Comparison of two primary antibodies, *Redox Biology*, 1, 226-233, **2013**.
[100] Ahmed, F.E., *Testing of Genetically Modified Organisms in Foods*. Food Products Press, **2004**.

[101] Gachet, E., Martin, G.G., Vigneau, F., and Meyer, G., Detection of genetically modified organisms (GMOs) by PCR: a brief review of methodologies available, *Trends in Food Science & Technology*, 9, 380-388, **1998**.
[102] Batista, F.M., Arzul, I., Pepin, J.-F., Ruano, F., Friedman, C.S., Boudry, P., and Renault, T., Detection of ostreid herpesvirus 1 DNA by PCR in bivalve molluscs: A critical review, *Journal of Virological Methods*, 139, 1-11, **2007**.
[103] Fajardo, V., González, I., Rojas, M., García, T., and Martín, R., A review of current PCR-based methodologies for the authentication of meats from game animal species, *Trends in Food Science & Technology*, 21, 408-421, **2010**.
[104] Mohamad, N.A., El Sheikha, A.F., Mustafa, S., and Mokhtar, N.F.K., Comparison of gene nature used in real-time PCR for porcine identification and quantification: A review, *Food Research International*, 50, 330-338, **2013**.
[105] García-Cañas, V. and Cifuentes, A., *Chapter 18 - A Particular Case of Novel Food: Genetically Modified Organisms* Academic Press, Boston, **2012.**
[106] Mannelli, I., Minunni, M., Tombelli, S., and Mascini, M., Quartz crystal microbalance (QCM) affinity biosensor for genetically modified organisms (GMOs) detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 18, 129-140, **2003**.
[107] Wang, R., Tombelli, S., Minunni, M., Spiriti, M.M., and Mascini, M., Immobilisation of DNA probes for the development of SPR-based sensing, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 967-974, **2004**.
[108] Carpini, G., Lucarelli, F., Marrazza, G., and Mascini, M., Oligonucleotide-modified screen-printed gold electrodes for enzyme-amplified sensing of nucleic acids, *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 167-175, **2004**.
[109] Kalogianni, D.P., Koraki, T., Christopoulos, T.K., and Ioannou, P.C., Nanoparticle-based DNA biosensor for visual detection of genetically modified organisms, *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 1069-1076, **2006**.
[110] Ballari, R.V. and Martin, A., Assessment of DNA degradation induced by thermal and UV radiation processing: Implications for quantification of genetically modified organisms, *Food Chemistry*, 141, 2130-2136, **2013**.
[111] Tamer, U., Gündoğdu, Y., Boyacı, İ., and Pekmez, K., Synthesis of magnetic core–shell Fe3O4–Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1187-1196, **2010**.
[112] Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyaci, I., Temiz, H., Yegenoglu, H., Daniel, P., Dinçer, İ., and Elerman, Y., Gold-Coated Iron Composite Nanospheres Targeted the Detection of Escherichia coli, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6223-6240, **2013**.
[113] Temur, E., Boyacı, İ., Tamer, U., Unsal, H., and Aydogan, N., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1595-1604, **2010**.
[114] Hu, J., Zheng, P.-C., Jiang, J.-H., Shen, G.-L., Yu, R.-Q., and Liu, G.-K., Sub-attomolar HIV-1 DNA detection using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analyst*, 135, 1084-1089, **2010**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı: Gülüzar Görkem Büyükgöz

Doğum Yeri: Ceyhan

Medeni Hali: Evli

E-posta: gdgork07@hacettepe.edu.tr

Adresi: Hacettepe Üniversitesi Beytepe Kampüsü Araştırma Lab1.

Beytepe/Ankara

Eğitim

Lise: Halil Çiftçi Anadolu Lisesi

Lisans: Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yüksek Lisans: Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil Düzeyi

İngilizce

İş Deneyimi

-

Deneyim Alanları

-

Tezden üretilmiş Projeler ve Bütçesi

1.) 111T096 no'lu, "Yüksek hassasiyette DNA analizine yönelik yeni stratejilerin geliştirilmesi" isimli TUBİTAK projesi (bütçe: 297.750 TL)

Tezden Üretilmiş Yayınlar

-

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

10th Nanoscience and Nanotechnology Conference (poster ile katılım)