

ŞUBAT 2017

Yüksek Lisans Kimya Bölümü

TUĞÇE YİĞİT

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MULTİPLEKS DNA ANALİZİ İÇİN YÜZEYDE
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA
DAYALI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

KİMYA BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TUĞÇE YİĞİT
ŞUBAT 2017

**Multipleks DNA Analizi İçin Yüzeyde Zenginleştirilmiş
Raman Saçılmasına Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi**

Gaziantep Üniversitesi

Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışmanlar

Doç.Dr. Mehmet KAHRAMAN

Yrd. Doç.Dr. Işık Didem KARAGÖZ

Tuğçe YİĞİT

Şubat 2017



© 2017 [Tuğçe YiğİT]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Multipleks DNA Analizi İçin Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman
Saçılmasına Dayalı Biyosensör Geliştirilmesi

Öğrencinin, Adı Soyadı: Tuğçe YİĞİT

Tez Savunma Tarihi: 24/02/2017

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. Ahmet Necmeddin YAZICI

FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ

Enstitü ABD Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Yrd. Doç.Dr. Işık Didem KARAGÖZ

İkinci Tez Danışmanı


Doç.Dr. Mehmet KAHRAMAN

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

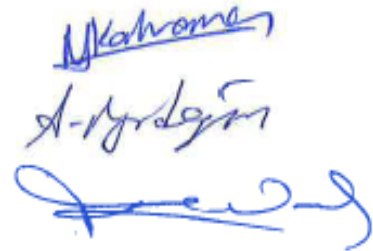
Jüri Üyeleri:

Doç.Dr. Mehmet KAHRAMAN

Doç.Dr. Ayşegül İYİDOĞAN

Yrd. Doç.Dr. Tuba DENKÇEKEN

İmzası



İlgili tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek ilgili tezde yer aldığını beyan ederim.

Tuğçe YİĞİT

ABSTRACT
DEVELOPMENT OF BIOSENSOR BASED ON SURFACE ENHANCED
RAMAN SCATTERING FOR MULTIPLEX DNA ANALYSIS

YİĞİT, Tuğçe

M.Sc. in Chemistry

Supervisors: Assoc. Prof.Dr. Mehmet KAHRAMAN

Assist. Prof. Dr. Işık Didem KARAGÖZ

February 2017

50 pages

Analysis of DNA is very important in biomedical applications. The sequence of the gene on the DNA can influence the protein structures and thus it can be source of many diseases and genetic problems. Rapid, accurate and sensitive DNA analysis is critically important for the diagnostic of genetic diseases. The most common method is fluorescence based microarrays when the DNA analysis methods are evaluated. However there are some disadvantages of the method. The most important is the overlapping of the fluorescence emission depending on the bandwidth of the spectra. Thus, the complex statistical method should be used for the multiplex analysis that can diminish the performance of multiplexing properties. This is the first time in the literature, the method which is independent from SERS substrate properties and without use of any Raman active dyes for the DNA analysis based SERS on was developed. In this method, the presence of target DNA will be demonstrated by peak shifting of certain peak of the small molecules attached to the SERS substrate surface instead of SERS spectrum obtained in the presence of target DNA.

Key Words: DNA analysis, Raman, Biosensor, SERS

ÖZET
MULTİPLEKS DNA ANALİZİ İÇİN YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ
RAMAN SAÇILMASINA DAYALI BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

YİĞİT, Tuğçe
Yüksek Lisans Tezi Kimya Bölümü
Tez Yöneticileri: Doç.Dr. Mehmet KAHRAMAN
Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ
Şubat 2017
50 sayfa

DNA analizi biyomedikal uygulamalarda son derece önemlidir. DNA üzerindeki gen dizilimi sentezlenen proteinin yapısını etkileyebilmekte ve dolayısıyla birçok hastalığın ve genetik sorunun kaynağı olabilmektedir. Hızlı, doğru ve hassas DNA analizi genetik hastalıkların tanısında son derece önemlidir. DNA analiz yöntemlerine bakıldığında zaman en çok kullanılan floresansa dayalı mikroarray tekniğidir. Fakat yöntemin birtakım dezavantajları mevcuttur. Bunlardan en önemlisi elde edilen floresans spektrumunun band büyüklüklerine bağlı olarak üst üste çakışmasıdır. Bu yüzden çoklu analizlerde (multipleksing) kompleks istatistiklere ihtiyaç vardır bu da çoklu analiz özelliğinin performansını düşürmektedir. Bu çalışmada literatürde ilk defa herhangi bir Raman aktif boya kullanmadan ve YZRS substrat özelliğinden bağımsız multipleks DNA analizi için YZRS'ye dayalı yöntem geliştirildi. Bu yöntemde hedef DNA varlığında Raman aktif molekülün spektrumunun elde edilmesi yerine YZRS substratı yüzeyine bağlı küçük molekülün pik kayması ile hedef DNA molekülünün varlığı gösterildi.

Anahtar Kelimeler: DNA analizi, Biyosensör, Raman, YZRS

Çok Değerli EN BİRİNCİ HOCAMA...

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda kişilik olarak ve hayati anlamda da bana çok şey katan hayatımın temel taşlarını oluşturan Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden çok değerli danışman hocam, Sayın Doç.Dr. Mehmet KAHRAMAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Örnek hazırlanmasında desteğini esirgemeyen Doç.Dr. Ramazan SOLMAZ hocama, Zeta-Sizer cihazı kullanımında yardımcı olan Yrd. Doç.Dr. Mehmet DAŞDEMİR hocama sonsuz teşekkür sunarım. Akademik bilgi ve yardımlarından dolayı sayın ikinci tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Işık Didem KARAGÖZ hocama, Yüzeylerin hazırlanmasında yardım eden Handan YÜKSEL'e, örneklerin toplanmasında, hazırlanmasında ve teşhislerinde desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Ebru AKDOĞAN'a çok teşekkür ederim.

Bu çalışmada maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (214Z123 no'lu proje) ve gerekli alt yapıları oluşturan Gaziantep Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunarım. Çalışma süresince beni hep destekleyen başta annem, kardeşim olmak üzere tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT	vi
ÖZET.....	vii
TEŞEKKÜR	ix
İÇİNDEKİLER	x
TABLolar LİSTESİ.....	xii
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xiii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ	1
BÖLÜM 2.....	3
LİTERATÜR ÖZETLERİ	3
2.1 Deoksiribonükleik Asit (DNA)	3
2.2 DNA Analiz Yöntemleri	4
2.2.1 Jel Elektroforezi Tekniği	4
2.2.2 DNA Mikroarray teknolojisi.....	5
2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)	6
2.2.4 Akış (flow) Sitometri.....	7
2.2.5 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP).....	8
2.2.6 Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP)	8
2.3 Raman Spektroskopisi	9
2.3.1 Raman Spektroskopisinin Prensibi	9
2.3.2 Raman Spektrometresi.....	11
2.4 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS)	13
2.4.1 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı DNA analizi	14
BÖLÜM 3.....	18
METERYAL VE METODLAR	18
3.1 Materyal.....	18
3.1.1 Kullanılan Malzemeler	18
3.1.2 Kullanılan Aletler ve Cihazlar	19

3.2 Metod.....	19
3.2.1 14 nm ve 50 nm Altın Nanoparçacık (AuNPs) Sentezi.....	19
3.2.2 Oligonükleotitlerin Hazırlanması ve 14 nm ve 50 nm AuNPs ile Modifiye Edilmesi	20
3.2.3 YZRS Aktif Yüzeyle Oligonükleotitlerin Bağlanması.....	21
3.2.4 Çoklu Analiz için Hedef DNA'nın Farklı Problar ile Hibritleştirilmesi .	22
BÖLÜM 4.....	24
BULGULAR ve TARTIŞMA.....	24
4.1 14 nm ve 50 nm AuNPs Karakterizasyonu	24
4.2 Oligonükleotitler ile Modifiye Olan 14 nm ve 50 nm AuNPs Karakterizasyonu	26
4.3 Oligonükleotitler ile Modifiye Olan Yüzeylerin Karakterizasyonu.....	33
4.4 Çoklu Analiz İçin Hedef DNA'nın Farklı Problar ile Hibritleştirilen Oligonükleotitlerin Karakterizasyonu	35
BÖLÜM 5.....	42
SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 4.1. Hazırlanan AuNPlerin büyüklük ve zeta potansiyel değişimleri.....	25
Tablo 4.2. Hazırlanan AuNPlerin maksimum absorpsiyon dalga boyları.	29
Tablo 4.3.Hazırlanan AuNPlerin büyüklük ve zeta potansiyel değişimleri.....	31
Tablo 4.4. 250 nm Gümüş Kaplı ITO Yüzey Üzerine Modifiye Olmuş ATP'in YZRS Spektrumlarından Alınan Yüksekliklerinin Ortalamaları Standart Sapmaları ve Varyasyon Katsayıları.....	40

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1. DNA'nın yapısı.....	3
Şekil 2.2. Jel elektroforezi.....	4
Şekil 2.3. Mikroarray tekniği	5
Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu.....	7
Şekil 2.5. Enerji diyagramında stokes ve anti-stokes saçılmaları.	10
Şekil 2.6. Raman spektrometresinin şematik gösterimi	13
Şekil 2.7. A) YZRS yüzeye bağlanan oligonükleotitlerin AFM görüntüleri B) Boş YZRS yüzeyden ve oligonükleotit bağlanmış yüzeyden alınan YZRS spektrumları.	14
Şekil 2.8. A) Yapılan çalışmanın genel şeması. B) PNA slaytlarından ortalama SERS sinyalleri.....	15
Şekil 2.9. Multipleks DNA analizi için yöntem geliştirilmesi.....	16
Şekil 3.1. AuNPs diyalizi.....	21
Şekil 4.1. 14 nm ve 50 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları	24
Şekil 4.2. 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların büyüklük dağılımları	25
Şekil 4.3. A) 14 nm ve B) 50 nm altın nanoparçacıkların geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.....	26
Şekil 4.4. Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş 14 nm ve 50 nm AuNPs şematik gösterimi.....	27
Şekil 4.5. 14 nm ve 50 nm AuNPs	27
Şekil 4.6. 14 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş 14 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları.	28
Şekil 4.7. 50 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş 50 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları.	28

Şekil 4.8. 14 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş AuNPs süspansiyonların büyüklük dağılımları.	30
Şekil 4.9. 50 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş AuNPs süspansiyonların büyüklük dağılımları.	30
Şekil 4.10. 14 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye edilen 14 nm AuNPs Raman spektrumları.	32
Şekil 4.11. 50 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye edilen 50 nm AuNPs Raman spektrumları.	32
Şekil 4.12. Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin amit bağı yardımı ile YZRS aktif yüzeye kimyasal olarak bağlanmasının şematik gösterimi.	33
Şekil 4.13. A)ATP molekülleriyle modifiye olmuş B) Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş ITO yüzeylerin AFM görüntüleri	34
Şekil 4.14. 250 nm gümüş kaplı ITO yüzey üzerindeki ATP molekülünün YZRS spektrumları.....	34
Şekil 4.15. 250 nm gümüş kaplı ITO yüzey üzerine modifiye olmuş oligonükleotitlerin YZRS spektrumları.....	35
Şekil 4.16. YZRS aktif yüzeye bağlanmış karboksil grubu içeren oligonükleotitler ile 14 nm AuNPs-P1 (A) ve 50 nm AuNPs-P2 (B) kolloitlerinin hibritleşmesinin şematik gösterimi.	36
Şekil 4.17. YZRS aktif yüzeye bağlanmış karboksil grubu içeren oligonükleotitler hem 14 nm AuNPs-P1 hem de 50 nm AuNPs-P2 kolloidlerinin hibritleşmesinin şematik gösterimi.	36
Şekil 4.18. Hibritleştirilen oligonükleotitlerin agaroz jel görüntüsü (P6, Karboksilli Primer 6; P1, Tiyol Primer 1; P2, Tiyol Primer 2; P1-N, Tiyol Primer 1- Nanoparçacık (14 nm P1); Tiyol P2-N, Primer 2 – Nanoparçacık (50 nm P2), 50bp Marker).....	37
Şekil 4.19. Elde edilen yüzeylerden alınan AFM görüntüleri. (A) ITO-Ag Yüzey, (B) ITO-Ag-ATP-P6 (C) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 (D) ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, (E) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2	38

Şekil 4.20. 250 nm Ag kaplı ITO yüzey üzerindeki, A) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 (B) ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, (C) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2’elde edilen YZRS spektrumları..... 39

Şekil 4.21. 250 nm Ag kaplı ITO yüzey üzerindeki, ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 , ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2’elde edilen YZRS spektrumlarının Karşılaştırılması. 40



SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

DNA	Deoksiribonükleik Asit
SNP	Tek Nükleotit Polimorfizmi
NHS	<i>N</i> -Hidroksisüksinimid
EDC	1-etil-3-[dimetilaminopropil]karbodiimid hidroklorür
MES	2-[<i>N</i> -morfolino]etansülfonik asit
PBS	Fosfat Tamponlu Salin
RFLP	Restriksiyon Parça Polimorfizmi
AFLP	Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizmi
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
UV	Ultraviyole
TEM	Transmission Electron Microscopy (Geçirimli Elektron Mikroskobu)
AFM	Atomic Force Microscopy (Atomik Kuvvet Mikroskobu)
YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi
AuNPs	Altın nanoparçacıklar
PDI	Polidispersite İndeksi
µm	mikrometre
mg	miligram
nm	nanometre
P1	Primer 1

P2	Primer 2
P6	Primer 6
μL	mikrolitre
mM	milimolar



BÖLÜM 1

GİRİŞ

Genetik mutasyonların tespitinde Deoksiribonükleik Asit (DNA) analizi oldukça büyük önem taşımaktadır. Doğru, hassas ve hızlı DNA analizi genetik hastalıkların tanısında son derece önemlidir. Günümüzde hala DNA analiz yöntemlerine ait çalışma çeşitleri devam etmektedir. Son birkaç yıldır farklı DNA analiz yöntemleri geliştirilmeye başlanmıştır. Bu yöntemlerden en dikkat çekici olan ise Raman Spektroskopisi ile yapılan DNA analizi çalışmalarıdır. Raman Spektroskopisinin diğer analiz yöntemlerine göre pek çok avantajı olduğundan, bu yöntem üzerine daha sık çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Raman Spektroskopisinin temeli ışının saçılması olduğundan dolayı bazen bu saçılma zayıf kalabilir. Bu saçılma şiddetini arttırmak için Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) güçlü bir analitik teknik olarak kullanılır. Bu tekniğin titreşim özelliğinden yararlanılarak biyokimyasal alanda ölçüm sınırları genişlemiştir. YZRS, Raman spektroskopisinin genişletilmiş bir türü olarak karşımıza çıkmakta [1] ve Raman spektroskopisinden elde edilen sinyallerde yaklaşık 10^{14} seviyelerinde artış sağlayarak tek bir molekül seviyesinde ölçüme kadar olanak sağlamaktadır [2]. Bu dikkat çekici artışın keşfedilmesiyle YZRS ile yapılan çalışmalar artmaya başlamış ve analitik çalışmalarda çok fazla hassasiyet elde edilerek bu alanda yapılan çalışmalar artmaya başlamıştır. YZRS'nin keşfedilmesinden sonra birçok alanda kullanılmaya başlanmış ve YZRS substratları [3-5], bakteri karakterizasyonu ve tayini [6-10], virüs analizi [11,12] ve DNA analizinde [13-14] kullanılmaktadır. İnsan genomunun çözülmesiyle 3 milyondan fazla tek bir baz dizilişindeki farklılığın (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) keşfedilmesiyle SNP'lerin fenotip üzerine etkisinin çalışılmasının yolu aralanmıştır [15]. SNP'ler gen üzerinde bulunduğu yer incelenirse olduğu yere göre çok değişik sonuçlar doğurur.

Kodlama bölgesinde bulunan SNP, gen tarafından sentezlenen proteinin yapısını etkileyebilmekte ve dolayısıyla birçok hastalığın ve genetik

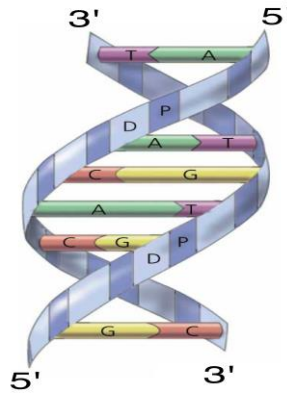
sorunun kaynağı olabilmektedir. SNP'lerin önemini arttıran diğer bir nokta da sentezlenen proteinlerin yapısını etkileyebildiği için ilaç metabolizmasında rol oynayan proteinlerin farmakokinetik analizi için oldukça önemli olmasıdır [16]. SNP analizleri gerek tanı ve gerekse de araştırma amaçlı yoğun olarak yapılmaktadır [17]. SNP analizi için DNA dizilişinin açıklığa kavuşturulması en güvenilir yol olmasına karşın klinik tanı için oldukça pahalı ve zaman alıcıdır. Bilinen bir SNP tanısı/DNA analizi için bugüne kadar birçok yöntem geliştirilmiştir. Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP), Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP), Kütle spektroskopisi, Akış Sitometrisi ve DNA mikroarray yöntemleri ya PCR ürünlerini kullanarak ya da metodun kendisi SNP tanısı/DNA analizi için kullanılmıştır [18-24]. Bu metodlardan en pratik olanı DNA mikroarray yöntemidir ve çok sayıda bilinen SNP tanısı diğerleri ile karşılaştırıldığında kısa sürede gerçekleştirilebilir. Fakat bu tekniğin dezavantajlarından dolayı gelişen bilim çağında eksik kalan yönleri bulunmaktadır. Bu yüzden DNA analiz üzerine çalışmalar hızla devam etmektedir. Bu tezin amacı olarak literatürde ilk defa yapılan multipleks DNA analizi için YZRS'a dayalı biyosensör geliştirilmesi amacıyla 14 nm ve 50 nm boyundaki altın nanoparçacıklar sentezlendi daha sonra bu altın nanoparçacıkların karakterizasyonu UV/VIS Spektrofotometresi Zeta-Sizer cihazı ve geçirimli elektron mikroskobu ile yapıldı. 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklara tiyol grubu içeren oligonükleotitler modifiye edilerek UV/VIS Spektrofotometresi Zeta-Sizer cihazı ve Raman spektrometresi ile karakterize edildi. Yüzey modifikasyonu için, 250 nm gümüş kaplı İndiyum Titan Oksit (ITO) içeren cam slayt Raman aktif bir madde olan 4-aminotiyofenol (ATP) ile inkübe edilip sonra yüzey üzerine karboksil grubu içeren oligonükleotitler modifiye edilerek karakterizasyonu için Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Raman spektrometresi kullanıldı. 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklar tamamlayıcısı olan yüzey üzerinde ki karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle hibritleştirilerek AFM ve Raman spektrometresi ile karakterizasyonu yapılarak yeni bir DNA analiz yöntemi geliştirildi.

BÖLÜM 2

LİTERATÜR ÖZETLERİ

2.1 Deoksiribonükleik Asit (DNA)

Genler hücre çekirdeklerinde kromozomların üzerine yerleşmiş ve uzun zincirli karmaşık bir molekül olan Deoksiribonükleik Asit (DNA)'dan meydana gelirler. Nükleik bir asit olan DNA, deoksiriboz şekeri, fosfat grupları ve kimyasal bileşenleri pürin ve pirimidinden türemiş heterosiklik moleküller olan nükleotit bazlarından oluşmuştur [25-27]. Baz, şeker ve fosfat grubundan oluşan bu temel yapıya nükleotit denir. Nükleotitler 3'-5' fosfodiester bağlarıyla birbirine bağlanmış ve 5'-3'yönünde olan bu tamamlayıcılar şeklinde yerleşmişlerdir [28-31]. Fosfat grubu beş karbonlu deoksiriboz şekerin 5' karbon ucundan bağlanır. Azotlu heterosiklik baz şekerin 1'karbon ucundan bağlanır. DNA bir zincirinde bulunan bazlar, karşıt zincirdeki bulunan tamamlayıcısı ile bir çift oluşturur. Pürin bazlarının (Adenin ve Timin) Primidin bazlarına (Guanin ve Sitozin) sayısı eşittir. Bu bazlar arasındaki ilişki "Çargef Kuralı" (Chargaff's rules) olarak adlandırılır [25]. DNA zincirleri arasında zayıf hidrojen bağı bulunur. Bu bağ ne kadar zayıf olsa da iki zinciri bir arada tutacak kadar bir tutarlılığa sahiptir. DNA'da bulunan atomların birbirine uzaklığı 2,8-2,95 Å (10^{-10} metre) 'dur.



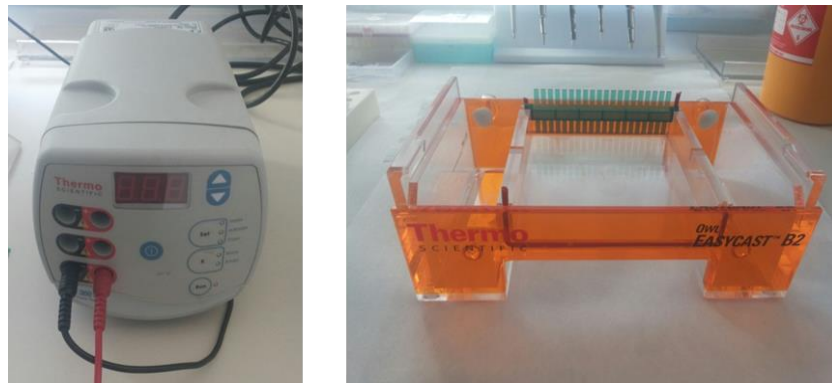
Şekil 2.1. DNA'nın yapısı [25].

2.2 DNA Analiz Yöntemleri

Genetik mutasyonların tanı ve tayini için DNA analizi kullanılmaktadır. DNA analizi yöntemlerinin hepsinin kendi içinde avantaj ve dezavantajları bulunmaktadır. DNA analiz yöntemleri genel anlamda 6 şekilde yapılır.

2.2.1 Jel Elektroforezi Tekniği

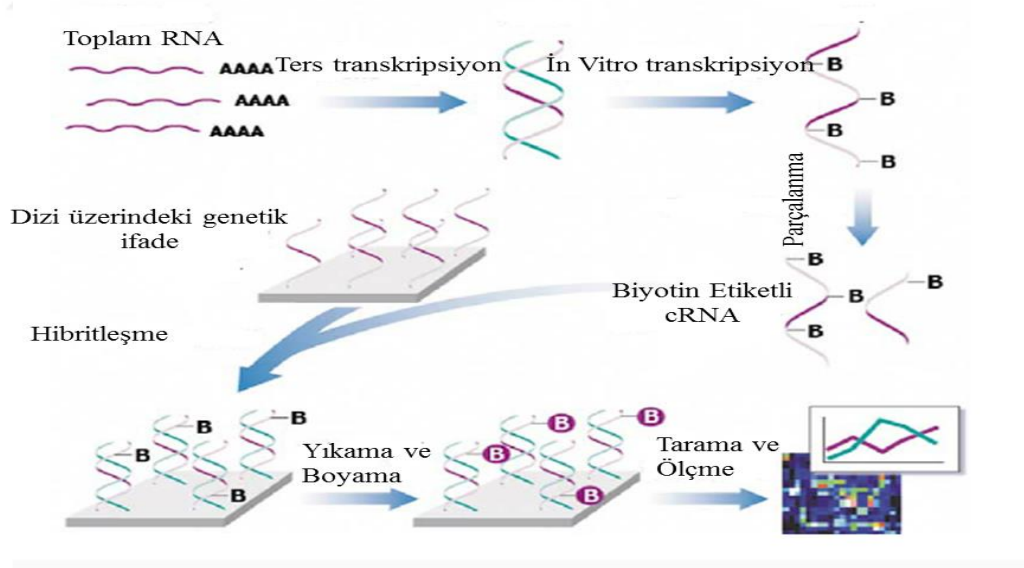
Jel elektroforezi, saflaştırılmış nükleik asit ve proteinlerin molekül ağırlığı, miktarı ve alt tiplerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan moleküler bir inceleme yöntemidir. İki çeşit jel elektroforezi yöntemi vardır bunlardan ilki poliakrilamid diğeri ise agaroz jel elektroforezidir. Nükleik asitler için agaroz jel proteinler için ise poliakrilamid jel elektroforezi yöntemi kullanılır. Jel elektroforezi, elektriksel bir alanda, ortamda çözünmüş moleküllerin elektrik yüklerine göre göç etmeleri prensibine dayanır. Büyük moleküller jel üzerinde yürümekte zorluk çekerken küçük moleküller daha hızlı ve rahat hareket edebilirler. Molekülün katoda mı (- kutup) yoksa anoda mı (+ kutup) doğru hareket edeceği molekül üzerindeki net yük ile belirlenir. DNA ve RNA molekülleri serbest fosfat gruplarından dolayı eksi yüklü moleküllerdir. Bu nedenle jel üzerinde katoddan anoda doğru hareketlenirler. Kullanılan molekülün jel üzerindeki yerini belirlemek için ortamda UV ışığı altında floresan etki gösteren Etidyum Bromürün (EB) veya benzeri bir ışıyıcı maddenin bulunması gerekmektedir. Elektroforez deneyleri tampon çözeltileri içerisinde yapılır. Bunun iki temel nedeni vardır. Birinci neden akımın geçişini sağlamak için ortamın elektrolit miktarını artırmak ikinci nedense ortamın pH'sında meydana gelebilecek radikal değişimlere izin vermemektir.



Şekil 2.2. Jel elektroforezi.

2.2.2 DNA Mikroarray teknolojisi

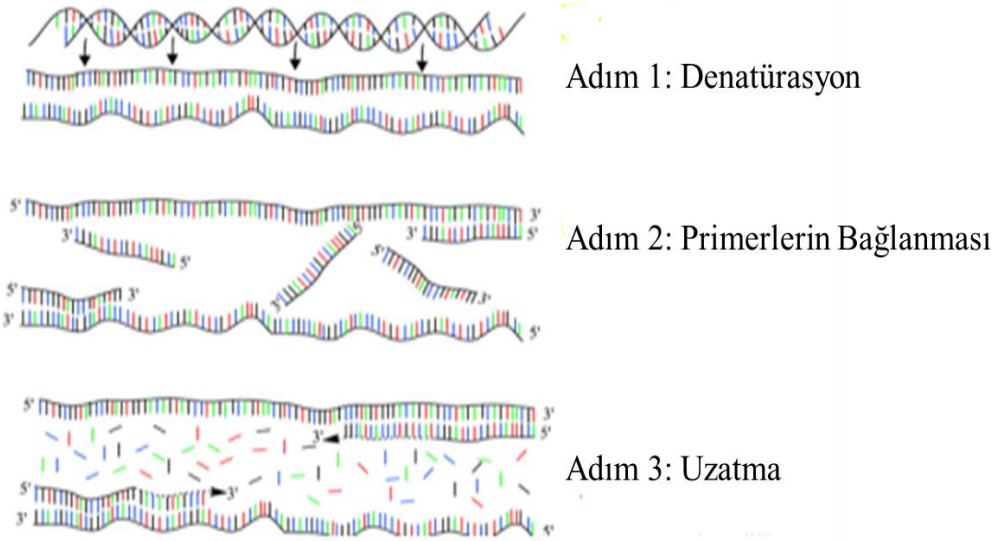
DNA mikroarray, hücre ve dokulardaki gen ekspresyonu profillerindeki değişikliklerin incelenmesinde kullanılan gelişen güçlü bir teknolojidir. Transkripsiyonun gen bakımından bir ölçekte değerlendirilmesi, düzenli bir mozaik şeklinde tüm genomu ya oligonükleotid ya da bireysel genleri temsil eden polimeraz zincir reaksiyonu ürünleri (cDNA mikroarrayleri) koleksiyonu olarak barındıran cam slaytlar ve ince katman camlar ile yani DNA mikroarray teknolojisi ile sağlanmıştır [32]. Bir mikroorganizmanın tüm genleri “tırnak” boyutunda olan bir alanda mikroarraylenebilir ve binlerce genin ekspresyon seviyeleri tek bir deneyde benzer olarak çalışılabilir [33]. DNA mikroarray teknolojisi, birçok genin aktivitesinin aynı zamanda izlenebilmesi; hızlı bir yöntem olması; hasta ve sağlıklı hücrelerdeki genlerin aktivitelerinin karşılaştırılmasını sağlaması ve hastalıkları alt-gruplar halinde sınıflandırması gibi avantajlarının yanı sıra, tek bir seferde çok fazla veri analizi yapıldığından, tüm sonuçların analizinin zaman alması; sonuçların yorumlamak için çok kompleks olabilmesi; sonuçların yeterince kantitatif olmaması ve oldukça pahalı bir teknoloji olması gibi bazı dezavantajlara da sahiptir [34].



Şekil 2.3. Mikroarray tekniği [34].

2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PZR)

PZR, DNA içerisinde yer alan, dizisi bilinen iki bölüm arasındaki spesifik bir bölgeyi laboratuvar ortamında çoğaltmak için uygulanan reaksiyonlarına verilen ortak bir isimdir. PZR çalışmalarının uygulanabilmesi için ilgilenilen gen bölgesine ait baz dizisinin (primer) bilinmesi gerekmektedir. Bu baz dizilerinin, kalıp DNA molekülü yüksek sıcaklıkta denatüre edildikten sonra, tek iplikli DNA bölgeleri üzerinde kendilerine tamamlayıcı olan bölgelerle hibritleştirilmesi yapılmaktadır. Primerlerin hedef dizilere özgün bağlanması düşük sıcaklıklarda gerçekleşmektedir. DNA polimeraz enziminin, uygun tampon, uygun sıcaklık ve deoksiribonükleozid trifosfat varlığında primerin 3' ucundan uzayarak yeni tamamlayıcı DNA ipliğini sentezlediği gösterilmiştir. PZR'un bir döngüsü üç aşamadan oluşur. Bu aşamalar denatürasyon, yapışma (annealing) ve uzama (extension)dir. PZR'ndan sonuç elde edilmesi döngülerin defalarca tekrarlanmasıyla oluşur [35,36]. PZR'da DNA kaynağı olarak birçok değişik biyolojik örnek kullanılmakta ve kullanılan bu örneklerin birçoğu PZR inhibitörü içerir. Kanda bulunan heparin, EDTA, lipid, porfirin kuvvetli PZR inhibitörü olup ortadan uzaklaştırılmaktadır [37-40]. PZR sonucu elde ürünler, poliakrilamid ve agaroz jellerde yapılan elektroforezde SYBR gren Ethidyum bromür, gibi floresan boyalar ile görünür hale getirilir ve UV transilüminatör yardımı ile görüntülenir [39-42]. Kullanılan PZR teknikleri, Multipleks, Hot start, Nested, Koloni, Arbitrary, Revers Transkriptaz, Touchdown, Kısmi Nested, Real Time PZR gibi farklı yöntemler geliştirilmiştir [35]. PZR yönteminin avantajı, çok az miktarda DNA ile çalışmaya olanak sağlamaktadır. PZR tekniği ile laboratuvar tanısında çok büyük bir hız ve kesinlik kazanılmış; birçok durumda radyoaktivite kullanımını gereksiz hale getirmiştir.



Şekil 2.4. Polimeraz Zincir Reaksiyonu [38].

2.2.4 Akış (flow) Sitometri

Akış Sitometri, hücresel yanıt araştırmalarında en çok kullanılan yöntemlerden biridir. Bu yöntemin ilk çalışmaları 1924'te Andrew Moldovan tarafından başlatılmıştır. Hücre veya partiküllerin özelliklerinin ölçülmesi amacıyla hareket halinde olan bir akışkanın içinden geçirilir. Hücreler lazer ışığının önünden geçerken, ışık çeşitli dalga boylarında kırılır ve hücrelerin verdikleri sinyaller toplanarak analiz edilir. Oluşan sinyaller hücrenin büyüklük, granürlük gibi fiziksel özelliklerine ve hücreye bağlanan çeşitli florokromlara göre farklılık gösterir. Bu yöntemle hücre ya da bir partikülün immünofenotipi, enzim aktiviteleri, DNA içeriği, hücre membran potansiyeli gibi çeşitli özellikleri hakkında bilgi toplanabilir [43]. Akış sitometrinin bileşenleri; lazer optikler, elektronik dedektörler, akışkanlar, analog dijital çevrimcilerdir. Akışkan sıvı içinde çözödürölen hücreler cihaza verilir. Optik kısım lazer ışığı yayarak ışını birkaç hücre çapının oluşturduğu demet üzerine odaklayarak lazer kaynağından çıkan ışık demeti tüp içinden geçen hücreler / partiküller tarafından farklı dalga boylarında kesilir. Kırılan lazer ışığı ve hücreler tarafından yayılan floresan ışığı bir araya getirilip aynalar ve optik filtreler tarafından farklı dalga boylarına göre ayrılıp analog sinyallere dönüştürölür [44,45].

2.2.5 Restriksiyon Parça Uzunluk Polimorfizmi (RFLP)

Nükleik asit seviyesinde yapılacak incelemelerde aktif olarak kullanılan Restriksiyon Parçaları Uzunluk Polimorfizmi (RFLP) tekniği, DNA dizisinde olan değişiklikleri dolaylı olarak belirleyen bir yöntemdir [46]. Restriksiyon Enzimleri (RE) çok spesifik olarak DNA'yı belli bölgelerden keserek genellikle 1.000-20.000 baz çiftlik parçalar oluşturan enzimlerdir. DNA'nın uygun görülen bölgelerinden uygun primerlerle çoğaltıldıktan sonra DNA bu enzimlerden bir veya birkaçı ile kesilir. Daha sonra agaroz jel elektroforezinde yürütülerek etidyum bromür ile boyanan jelde oluşan DNA bantlarının yeri ve sayısı kıyaslanarak oluşan çeşitliliğe RFLP adı verilir. DNA'lar restriksiyon enzimi olarak adlandırılan enzimlerle küçük parçalara ayrılabilir [47]. Bu enzimler 4-8 baz çifti uzunluğunda özgün bir dizisini tekrarlanabilir bir şekilde keser. RE'nin DNA ile muamelesi sonucunda çeşitli uzunlukta DNA parçaları oluşmaktadır [48].

2.2.6 Çoğaltılmış Parça Uzunluk Polimorfizm (AFLP)

AFLP yüksek çözünürlüklü, PCR temelli, genomik parmak izi metot yöntemidir. Bu metod 1996 yılında ilk olarak da Asinetobakterler de dahil diğer bakteriler önemli patojenler için kullanılmıştır [49,50]. AFLP, DNA'nın bir veya iki kısıtlama enzimi ile açık uçlu kesimi, amplifikasyon için açık uçlara uygun çift zincirli adaptörlerin bağlanması ve adaptörlere primerler komplementer ile presellektif ve selektif amplifikasyon, elektroforez ve profillerin görüntülenmesi adımlarından oluşur [51]. AFLP prosedürü, 1998'de EcoR1 ve Mse1 kısıtlama enzimleri kullanarak restriksiyon ve ligasyonun tek adımda gerçekleştirilmesi ile uygulanabilir hale geldi [52]. Yöntemin tekrarlanabilirliği ve ayırım gücü açısından PCR şartlarını etkileyecek kontaminant ve inhibitörlerin uzaklaştırılması ve elde edilen DNA'nın yüksek kaliteli olması istenir. RFLP tekniğinin güvenilirliğine göre AFLP nin ayırım gücü güvenilir ve yüksektir. Çünkü RFLP'nin güvenilirliği PCR'ın gücüyle birleştirilmiştir. Tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. AFLP yönteminin en belirgin avantajlarından biri, az miktarda DNA (10-50ng)'nın yeterli olmasıdır. AFLP analizinin bir veri bankası oluşturmaya uygunluğundan dolayı güçlü bir metot olduğu sonucuna varılabilir.

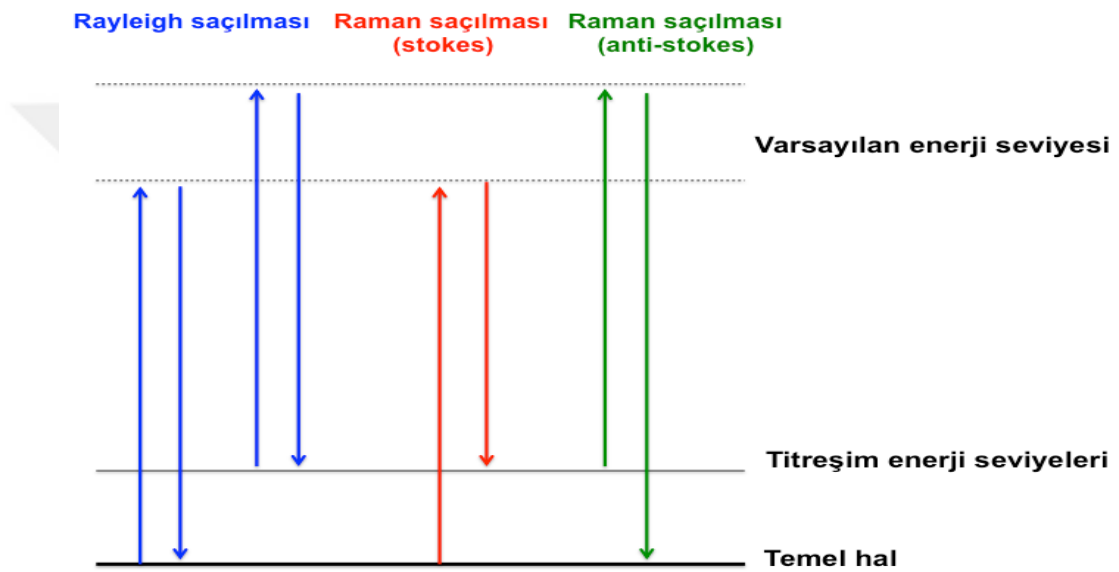
2.3 Raman Spektroskopisi

Işığın elastik olmayan saçılması ile ilgili ilk araştırma 1923 yılında Smekalın tarafından öne sürülmüştür. Ancak 1928 yılında deneysel olarak ilk ortaya koyan Hint bilim adamları Kariamanickam Srinivasa ve Chandrasekhara Venkata Raman ve Krishnan'dır. Ancak yöntem Raman olarak adlandırılmıştır [53,54]. Raman 1921 yılında Sir C.V Raman, okyanusun mavi renginin gökyüzü renginin yansımasından kaynaklanmadığını ve asıl rengin saçılmadan kaynaklandığını gözlemlemiştir. Raman ışığın saçılmasını saçılma etkisinin başlangıcı olarak belirterek bu olayın ışığın saçılması ile ilgili bilimsel çalışmalarının başlangıcı olmuştur [55,56]. Raman, Calcutta Üniversitesi'ndeki araştırmalarıyla 11 Aralık 1930 yılında Sir Raman'a nobel ödülü kazandırmıştır.

2.3.1 Raman Spektroskopisinin Prensibi

Bir cisim üzerine ışık gönderildiğinde fotonlardan meydana gelen ışık dört şekilde gösterebilir. Işık soğurulabilir, saçılabilir, soğurulup tekrar yayılabilir ya da cisimle etkileşmeden doğrudan geçebilir. Gelen fotonun enerjisi temel enerji düzeyi ile uyarılmış enerji düzeyi arasında olması fotonu soğurabilmesi veya yüksek enerjili seviyeye çıkarabilmesi absorpsiyon spektroskopisi ile ölçülür [57,58]. Molekül üzerine gönderilen ışığın saçılmasıyla kullanılan temel teknik Raman saçılmasıdır. Raman saçılması Jablonski (enerji seviyesi) diyagramıyla açıklanır. Bir foton cisimle etkileştiğinde temel enerji seviyesinde bulunan enerjisi uyarılmış enerji seviyesine artar. Polarlanmaya neden olan uyarılan bu seviye lazerle elektronun etkileştiği anda ki seviyedir. Uyarılmış seviyeye çıkan molekül, yayılan bir foton ile orijinal seviyesine geri döner [59]. Cisim üzerine gönderilen ışın iki şekilde saçılır. Bu saçılmalardan ilki Rayleigh Saçılmasıdır. Rayleigh saçılması, gelen fotonun enerjisi cisimle karşılaştıktan sonra değişmediği zaman gelen foton ile saçılan fotonun frekansı aynı kalır. Rayleigh Saçılması bu yönüyle aynı zamanda elastik bir saçılmadır [60]. Diğer saçılma türü ise Raman saçılmasıdır. Raman saçılması, ışık saçılırken çekirdek hareketi ile indüklenen enerji molekülden saçılan fotona ya da gelen fotondan moleküle elastik olmayan saçılma göstermesiyle gerçekleşir [57,58]. Raman saçılması iki yolla ortaya çıkar. Eğer gelen fotonun enerjisi saçılan fotonun enerjisinden düşük ise Anti-Stokes, saçılan fotonun enerjisinden büyükse Stokes

Raman saçılması oluşur [61]. Moleküllerin birçoğu oda sıcaklığında en düşük enerji seviyesindeyken lazer ile etkileşmeden önce kararlı hale sahiptirler. Anti-Stokes ve Stokes Raman saçılmaları karşılaştırıldığında Anti-Stokes Raman saçılımı uyarılmış titreşim seviyesinde meydana geldiği için olasılığı daha düşüktür. Bu olasılık Boltzman dağılım yasasına göre de hesaplanabilir. Bu yasaya göre de fotonla etkileşmeden önce uyarılmış titreşim enerji düzeylerinde bulunan moleküllerin sayısı temel enerji düzeyinde bulunan moleküllerin sayısından çok daha az olmasından dolayı Anti-Stokes Raman saçılmasının meydana gelme olasılığı Stokes saçılmasından düşüktür [57,58].



Şekil 2.5.Enerji diyagramında stokes ve anti-stokes saçılmaları.

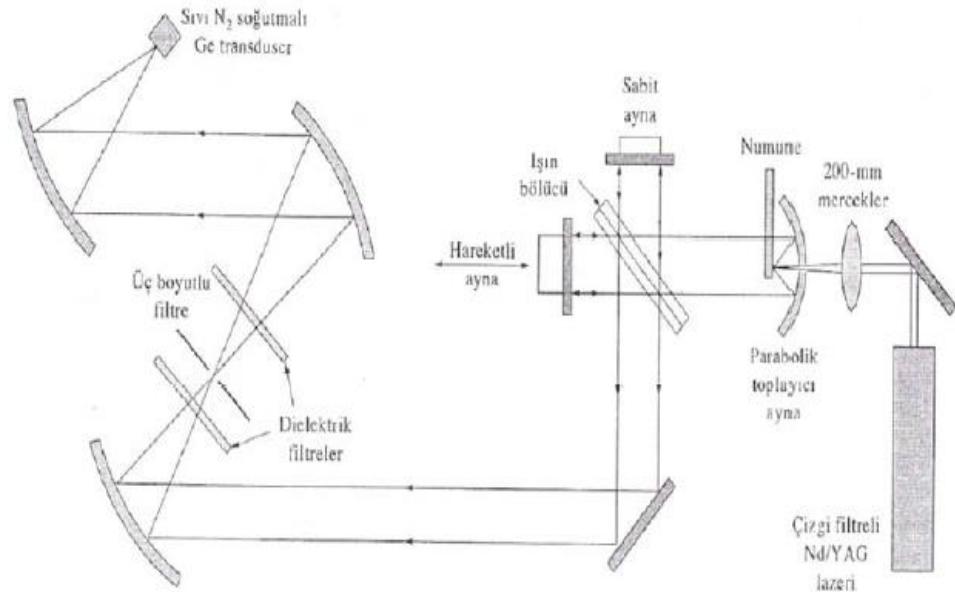
Raman saçılması spektrumu ile infrared spektrumu dikkate değer bir şekilde benzemektedir. Ancak bu iki spektrum birbirinin karşıtı değil tamamlayıcısı niteliğinde olduğundan dolayı bazı sorunlar için infrared yöntemi uygun iken bazı durumlarda Raman spektrumu daha iyi sonuç vermektedir. Raman spektrumunun infrared spektrumuna göre en belirgin özelliği suyun girişim yapmamasıdır. Yani sulu çözeltilerden Raman spektrumu elde edilebilmektedir. Bir başka avantajı ise cam ve kuvars kullanılabilmesidir. Ancak Raman spektrumunun en belirgin iki özelliği vardır; birincisi sinyalin zayıf gelmesi, ikincisi ise numune üzerindeki safsızlıktan dolayı floresans girişimi yapmasıdır. Bir molekülün Raman saçılması yapabilmesi için geçici bir dipol momentinin olması gerekir. Yani molekülün titreşim sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi gerekmektedir [59]. Bir molekülün Raman aktif olabilmesi ve o molekülden Raman

spektrumu alınabilmesi için, o molekülün titreşim esnasında polarlanabilirliğinin değişmesi ve simetrik gerilime sahip olması gerekir. Bir molekülün Raman sinyali verebilmesi için yüksek polarlanabilme özelliğine sahip olması gerekir. Raman spektrumu pek çok molekülün yapısının aydınlatılmasında ve kimyasal olarak tanınmasında büyük rol oynar. Raman spektrumları monokromatik lazer ışın kaynağının molekülle etkileşmesiyle elde edilir. Raman spektrumları gelen ışın ve saçılan foton arasındaki enerjinin bir fonksiyonu olduğu için saçılma şiddetini gösterirken gelen ışın ve saçılan ışın arasındaki referans farkı da Raman kayması olarak adlandırılır ve cm^{-1} ile gösterilir [60].

2.3.2 Raman Spektrometresi

Günümüzde kullanılan Raman spektrometresi üç ana bileşenden oluşur. Uygun bir spektrometre, bir lazer kaynağı ve bir numune aydınlatma sistemi. Raman saçılması Rayleigh saçılmasından daha zayıf olduğu için bu bileşenlerin performans özellikleri diğer moleküler spektrometrelerden daha iyi olmalıdır. 1970'li yılların sonuna kadar Raman spektrometreleri klasik UV/görünür bölge geçirdiği ışınları birbirinden ayıran dalga taşıyıcı ortamlarda kullanılan cihazlarla aynı tür bileşenleri kullanmaktaydı ve bu cihazlara tasarım yönünden benzerlerdi. Bunların birçoğunda transdusere ulaşan gerçek olmayan ışını en alt düzeye indirmek için çift optik ağıllı sistemler kullanıldı. Transduser olarak fotoçoğaltıcılar kullanıldı. Fakat şu anda birçok Raman spektrometresi ya germanyum transduseri ile donatılmış Fourier cihazlar olarak ya da yük eşleşmiş düzeneklere (CCD) dayalı çok kanallı cihazlar olarak kullanılmaktadır. Bu transduserler, floresansa yol açmadan birçok bileşimin Raman uyarımını sağlayan ve diyod lazerleri ile 785 nm'de üretilen ışığa karşı duyarlıdır. Fakat CCD bir Nd/YAG lazerinden gelen 1064 nm ışınına duyarlı değildir. Bu yüzden günümüzde kullanılan floresans gösteren örneklerde Raman ölçümleri için hangi tür cihazın daha iyi olduğu konusunda tam bir netlik yoktur. Raman spektroskopisinde örnek hazırlanması IR spektroskopisine göre daha kolaydır. Bunun sebebi, mercekler, pencereler ve diğer optik bileşenler için daha kırılğan ve atmosferik olarak daha az dayanıklı kristal halojen yerine cam kullanılabilir. Ayrıca lazer kaynağı, örneğin küçük bir alanına kolaylıkla odaklanabilir. Saçılan ışın bir slit üzerine uygun bir şekilde odaklanabilir. Bu durumun sonucunda çok küçük örnekler dahi incelenebilir. Son yıllarda geliştirilen

cihazlarda saçılan ışınları toplamak ve örnek ışınlama için optik mikroskoplar kullanılmaktadır. Bu optik mikroskoplar, kullanılan objektifler sayesinde numunenin çok küçük bir alanından Raman spektrumunun alınmasını sağlamaktadır. Raman spektroskopinin IR'ye göre üstünlüklerinin başında gelen örnek hazırlamada suyun zayıf bir Raman saçıcısı, fakat kuvvetli IR absorplayıcısı olma özelliği olmasıdır. Böylece sulu çözeltiler, IR ile değil Raman spektroskopisiyle rahatlıkla incelenebilir. Bu üstünlük, biyolojik ve inorganik sistemler için ve su kirliliği sorunlarına ilişkin çalışmalarda özellikle çok önemlidir. Katı örneklerinde Raman spektrumları, bir cam lam üzerine örnek konularak kolaylıkla Raman spektrumları alınır. Gaz örnekler için ışın yolu uzatılmış gaz hücrelerinin Raman spektrumu almak için, kullanılmaktadır [61]. Raman sinyalleri zayıf olduğundan Raman saçılmasını gerçekleştirebilmek için yüksek enerjili bir ışın kaynağı gereklidir. Lazerler yüksek ışık kaynağı olduklarından modern Raman spektrometrelerinde kullanılırlar. Raman spektrometrelerinde genellikle beş lazer çeşidi vardır. Bunlar, Argon iyonu (488,0 veya 514,5 nm), Kripton (530,9 veya 647,1 nm), Helyum / Neon (632,8 nm), Diyot lazeri (785 veya 830 nm) ve Nd-YAG (1064 nm) lazer kaynaklarıdır. Argon ve kripton kaynakları, Raman saçılımının şiddeti frekansın dördüncü kuvvetiyle doğru orantılı olmasından dolayı spektrumun mavi ve yeşil bölgesine göre daha avantajlıdır. Ancak kısa dalga boyundan dolayı bu ışık kaynaklarında floresans oluşturma ve örneğe zarar verme riskini artırır. Diyod serili lazerler ise çoğu zaman floresansı önemli ölçüde düşürmektedir. Raman spektrometresi için en avantajlı lazer kaynağı floresans girişimini giderdiği için Nd/YAG lazer kaynağıdır. Ancak bu lazer sistemi pahalı olduğundan dolayı pek tercih edilememektedir.



Şekil 2.6. Raman spektrometresinin şematik gösterimi [62].

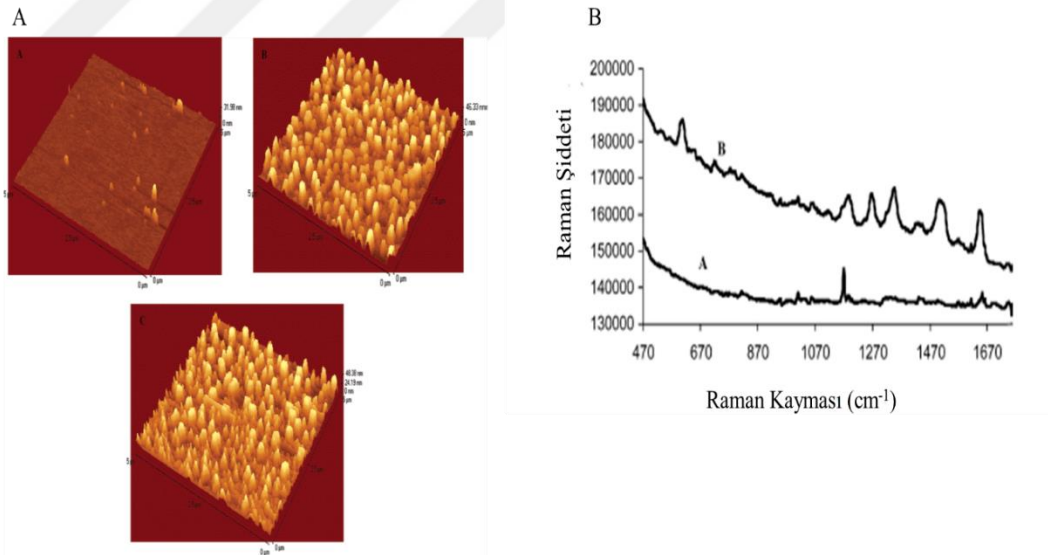
2.4 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS)

Tek bir lazere bağlı kalınmayıp, lazer çeşitlerinin artmasıyla ilgili çalışmalar Raman spektroskopisi çeşitlerinin oluşmasına sebep olmuştur. Temelde iki çeşit Raman spektroskopisi vardır. Bunlar, Rezonans Spektroskopisi ve Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisidir.

YZRS tekniği 1977 yılında Van Duyne ve Jeanmaire ile Albrecht ve Creighton yapıya metalik nano yapıların bağlanmasıyla molekülden alınan Raman sinyalinin artırılması amacıyla keşfedilmiştir. Bu spektroskopide Raman saçılımları 10^3 ile 10^6 kat kadar kuvvetlendirilir. Yüzey zenginleştirilmesi, elektromanyetik zenginleştirme ve kimyasal zenginleştirme olmak üzere iki şekilde yapılır. Elektromanyetik zenginleştirmeyi sağlayan nanoparçacıkların kendi etraflarında oluştukları yüzey plazmonlarıdır. Kimyasal zenginleştirme ise metal ile moleküller arasındaki yük transferiyle olur. Kimyasal zenginleştirmenin değeri elektromanyetik zenginleştirmeden oldukça düşüktür. YZRS çok yönlü ve güçlü bir tekniktir. Ayrıca hem laboratuvar alanında hem de kendi alanında çok hızlı bir şekilde popülerite kazanmıştır. YZRS birçok biyolojik molekülün tanı ve tayininde kullanılmaya başlamıştır. Son yıllarda DNA analizi için de YZRS yöntemi ile çalışmalar hızla devam etmektedir.

2.4.1 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı DNA analizi

Günümüzde hala kullanılmakta olan DNA analiz yöntemlerinin kendi içinde avantajları ve dezavantajları bulunmaktadır. Gelişen bilim dünyası bu dezavantajları giderebilmek için yeni yöntemler geliştirmeye başlamıştır. Bu yöntemlerden en göze çarpanı YZRS'ye dayalı DNA analizi çalışmalarıdır. Biyomedikal teşhis için fenotip gen tanımlama, gen haritalama ve radyoaktif olmayan doğası nedeniyle DNA dizilimi için optik tekniklerin geliştirilmesine güçlü bir iletişim vardır. En belirgin ve en iyi bilinen moleküler tanıma olaylarından biri, bir nükleik asidin tamamlayıcı hedefle hibritleşmesidir. Dolayısıyla DNA dizilerinin tanımlanması için, bir nükleik asit probunun DNA hedefine hibridizasyonu ile çok yüksek bir doğruluk derecesi sağlanabilir. Tıbbi teşhiste DNA tabanlı YZRS problemleri kullanılmaya başlanmıştır. Aynı zamanda biyolojik ve çevresel analiz için etkin YZRS aktif katı substratların gelişimi de incelenir. YZRS yüzeye karboksil grubu içeren oligonükleotitler karboimid reaksiyonu ile sağlanır. Bağlanmanın gerçekleşip gerçekleşmediği de AFM ve Raman Spektrometresi ile belirlenir.

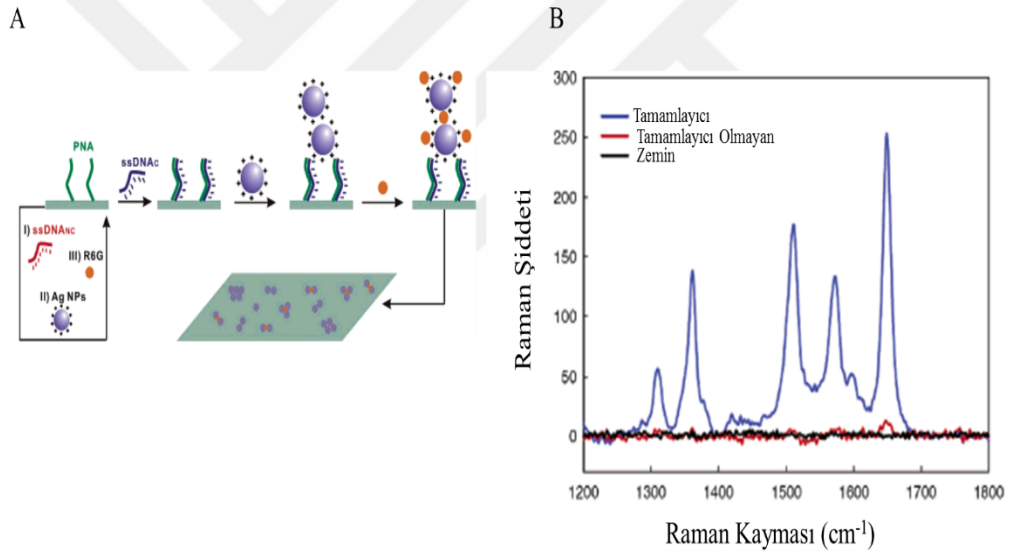


Şekil 2.7. A) YZRS yüzeye bağlanan oligonükleotitlerin AFM görüntüleri B) Boş YZRS yüzeyden ve oligonükleotit bağlanmış yüzeyden alınan YZRS spektrumları [63].

Şekil 2.7’de M. Çulha ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada [63] geliştirilen yüzey geliştirilmiş Raman geni (SERGen) problemleri, tamamlayıcı DNA problemlerine hibridizasyon yoluyla DNA hedeflerini saptamak için kullanılır. Problemler, radyoaktif etiketler kullanmayı gerektirmeden yüksek duyarlılık ve potansiyeline

sahiptir. Bu yaklaşımın etkinliği ve kanser gen teşhisinde uygulanması (BRCA1 meme kanseri geni) araştırılmıştır [64]. Raman işaretleyicisi olarak merkaptohexsan kullanılmıştır. Yüzeye bağlanan oligonükleotitler ilk önce AFM ile karakterize edilmiştir (Şekil 2.7 A). İlk resimde boş yüzey ikinci yüzeydeki tepecikler bağlanan oligonükleotitler görülmektedir. Üçüncü yüzeyde ise yatay olarak bağlanmış olan ikinci yüzeydeki oligonükleotitleri dik konuma getirmek için 6-merkapt-1-hekzanol kullanılmıştır. Raman grafiğinde ise boş yüzeyden ve oligonükleotit bağlanmış yüzeyden alınan YZRS spektrumları arasındaki pik farklılığı oligonükleotitlerin bağlandığını göstermektedir.

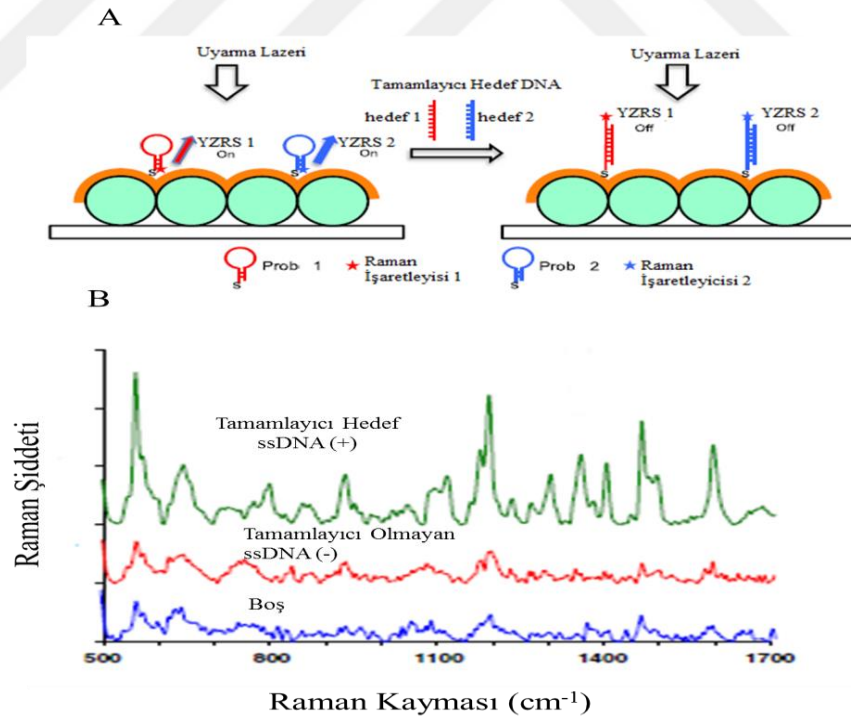
Metal nanoparçacıkların polarizlenebilmesi ve eksi yük taşımasından dolayı da tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olup analizi yapılabilmektedir.



Şekil 2.8. A) Yapılan çalışmanın genel şeması. B) PNA slaytlarından ortalama SERS sinyalleri [65].

Şekil 2.8’de yüzey-bağlı Peptit Nükleik Asitleri (PNA’lar) ve ssDNA / PNA hibridizasyonu üzerine YZRS sinyalleri veren elektrostatik etkileşimlerin bir etkileşiminden yararlanan tek sarmallı bir DNA (ssDNA) tanımlama yöntemi gösterilmektedir. PNA’larda, DNA’nın negatif yüklü şeker fosfat bağları peptidomimetik nötr amid bağlarıyla değiştirilir, böylece daha hızlı hibridizasyon oranları ve biyolojik bozulmaya karşı daha direnç elde edilir. Genel yaklaşım, pratik bazı avantajlar sunmaktadır ve konjuge polielektrolitlerden faydalanan floresan

saptama yöntemlerinde kullanılan elektrostatik montaj konseptlerine kısmen dayanmaktadır [65]. Özellikle önem taşıyan ise, metalik bir YZRS substratının prefabrike edilmesine hiç ihtiyaç duyulmamasıdır. Bunun yerine güçlendirme, metalik kümelerin elektrostatik çökeltilmesi ile elde edilir. PNA slaytlar ticari olarak mevcuttur ve uygun Ag nanoparçacık solüsyonlarının hazırlanması iyi oluşturulmuştur. Şekil 2.8’de yaklaşımın şematik bir çizimini göstermektedir. Biri, yüzeye bağlı PNA’ya sahip bir cam slaytla başlar (yeşil renkle gösterilir). Tamamlayıcı olmayan ssDNA’nın (kırmızı renkte gösterilen ssDNANC) ilavesi, orijinal PNA yüzeyini bozulmadan bırakarak bağ oluşturmaz. Tamamlayıcı ssDNA (mavi ile gösterilen ssDNAC) eklendiğinde, hibridizasyon net negatif yükle bir yüzey elde ederek gerçekleşir. Slayt, daha sonra pozitif yüklü Ag NP’leri içeren bir solüsyona maruz bırakılmıştır. Elektrostatik etkileşimler nedeniyle, Ag NP’leri, polielektrolit tabaka-tabaka biriktirme yöntemlerine benzer bir şekilde, hibridize DNA / PNA ile yüzeye tercihen bağlanmıştır. Bu bağlanma, modifiye edilmemiş (nötr) PNA yüzeylerinde önemli ölçüde daha zayıf olması beklenmiştir. Son adımda, slaytlar uygun bir YZRS işaretleyicisi içeren bir solüsyona batırılmıştır.



Şekil 2.9. Multipleks DNA analizi için yöntem geliştirilmesi [66].

Multipleks DNA analizine ait çalışmalardan biri T. Vo-Dinh ve arkadaşları tarafından yapılan genellikle hastalık başlangıcı ve ilerlemesi ile ilgili olan birden fazla genetik biyolojik belirleyiciyi aynı anda saptamak için kullanılabilir. Ayrıca, uygun veri analizi için genellikle gerekli olan, ilgi ve kontrol sekanslarının her iki hedef dizisini de tespit etmek için kullanılabilir. Birden çok farklı DNA sekansı aynı anda tespit edildiğinden, multipleks DNA tespiti, çalışma süresini, maliyeti ve gerekli örnek hacmi azaltabilir. Moleküler sentinel ip (MSC) teknolojisini kullanan oklama algılama şeması şekil 2.9'da gösterilmektedir. İki farklı Raman raportörüyle etiketlenmiş iki farklı molekül tek zincirli, bimetalik bir nanodalga çipinde altın-tiyol bağlarıyla immobilize edilmiştir [66]. Her bir moleküler tek zincirli, belirli bir hedef DNA sekansı için tamamlayıcı olacak şekilde tasarlanmıştır. İki probdan elde edilen YZRS yoğunlukları temelinde aynı anda iki farklı hedef DNA sekansı tespit edilmiştir.

BÖLÜM 3

METERYAL VE METODLAR

3.1 Materyal

3.1.1 Kullanılan Malzemeler

- (Tetraurat dihidrat) $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich)
- (Trisodyum sitrat) $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (Sigma Aldrich)
- (4-Aminotiyofenol) ATP (Sigma Aldrich)
- (1-Etil-3[3-dimetilaminopropil]karboiimid hidroklorür) (EDC) (Sigma Aldrich)
- *N*-Hidroksisüksinimid (NHS) (Sigma Aldrich)
- Tuz Tamponu (2-(*N*-morfolino) etansülfonik asit) (MES) (Thermo Scientific)
- Tuz Tamponu (Phosphate buffered saline) (PBS) (Thermo Scientific)
- Etidyum Bromür (Biorad)
- Orange G (Biolabs)
- NaCl (Sigma Aldrich)
- Distile Su
- Erlen
- Isıtıcı
- Filtre (45 μm)
- Manyetik Karıştırıcı
- Falkon Tüpler
- Diyaliz Keseleri
- Oligonükleotitler
- Termomikser
- Ependorf tüpler

3.1.2 Kullanılan Aletler ve Cihazlar

- UV/Görünür Bölge Spektrofotometre (Thermo/Evolution 201)
- Zeta-Sizer Cihazı (Malvern Zetasizer ZS)
- Raman Spektroskopi Sistemi (Renishaw inVia Raman mikroskop)
- Taramalı Elektron Mikroskobu (JEOL JEM 100C)
- Jel Elektroforezi Tankı (Thermo scientific Owl Easycast B2)
- Görüntüleme Cihazı (Biorad Gel Doc EZ Imager)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
- Hassas Terazî (AND HR 250-AZ)
- Termomikser (Eppendorf Termomixer C)

3.2 Metod

3.2.1 14 nm ve 50 nm Altın Nanoparçacık (AuNPs) Sentezi

Çoklu DNA analizinin çalışıp çalışmadığını test etmek için iki farklı büyüklükte nanoparçacık sentezlendi. Bunun amacı büyüklük farkı kullanılarak baskı derecesini değiştirmek ve buna bağlı olarak kayma derecelerini değiştirmektir. Bu amaç için 14 nm ve 50 nm AuNPs sentezlendi. 14 nm AuNPs için, 100 mL %0,01'lik $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kaynayınca kadar 250 rpm'de karıştırıldı. Kaynamaya başladığı anda 2 mL %1'lik $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7$ (sodyum sitrat) altın çözeltisine eklenerek kimyasal indirgenmesi sağlandı. 15 dakika kaynadıktan sonra soğumaya bırakıldı ve soğuduktan sonra 45 μm 'lik filtre ile süzüldü. 50 nm AuNPs sentezi için ise 100 mL %0,01'lik $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi kaynayınca kadar karıştırılıp, kaynadığı anda %1'lik sodyum sitrat çözeltisinden 0,8 mL eklenip kimyasal indirgenmesi sağlandı. Soğuduktan sonra 45 μm 'lik filtre ile süzüldü.

3.2.2 Oligonükleotitlerin Hazırlanması ve 14 nm ve 50 nm AuNPs ile Modifiye Edilmesi

Ticari olarak temin edilen 100 μM 'lık karboksil grubu ve Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerden 10 μM 'lık stok oligonükleotitler hazırlandı.

Karboksil Grubu içeren oligonükleotitler;

5-Carboxy-C10Modifiye-Primer-6

AAAAAAAAAATCGAGTAGAACTTATACGTTACATCCCAAAAAAAAAAAAA
AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCACATAAGTGGACACTCACTTAATCTA
TA

Tiyol Grubu içeren oligonükleotitler;

3-ThiolC3S-S-Primer1: AAA AAA AAA ATT GGG ATG TAA CGT ATA AGT
TCT ACT CGA T

3-ThiolC3S-S-Primer2: AAA AAA AAA ATA TAG ATT AAG TGA GTG TCC
ACT TAT GTG G

Tiyol grubu içeren oligonükleotitler ile 14 nm ve 50 nm AuNPs modifikasyonu için, falkon tüpe 5 mL 14 nm AuNPs konularak üzerine 25 μL (10 μM) tiyol grubu içeren primer 1 (P1) eklendi. Diğer falkon tüpe ise 5 mL 50 nm AuNPs konularak üzerine 25 μL (10 μM) tiyol grubu içeren primer 2 (P2) eklendi. Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerin Au yüzeyine bağlanması için termomikserde oda sıcaklığında 850 rpm'de bir gece karıştırıldı. Bir gece sonunda AuNPs yüzeyine tutunmayan oligonükleotitleri uzaklaştırmak için 20 kDa'luk diyaliz keseleri ile 1 gece boyunca diyaliz edildi. (Şekil 3.1) Elde edilen oligonükleotitler ile modifiye olmuş 14 nm ve 50 nm AuNP'ler Thermo Scientific Evolution 201 marka UV-VIS Spektrofotometresi kullanıldı. Analizler için 400 ile 800 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı. AuNPlerin büyüklükleri ve yüzey yükleri analizi için Malvern ZetaSizer ZS markalı cihaz kullanıldı. Süspansiyonların Raman aktivitesini ölçmek için süspansiyonlardan 5 μL alınarak CaF_2 slayt üzerine damlatılarak kurumaya bırakıldı. Karakterizasyon için Renishaw inVia marka Raman cihazı kullanıldı. %5 (15mW) lazer gücüyle nanoparçacıkların üzerinde 10 farklı bölgeden spektrumlar alındı.



Şekil 3.1. AuNPs diyalizi.

3.2.3 YZRS Aktif Yüzeylere Oligonükleotitlerin Bağlanması

Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin yüzeye modifikasyonu için, elektrokimyasal yöntemle elde edilen ITO yüzeye gümüş kaplanıp tek tabakalı yüzey oluşturuldu ve YZRS yüzeyi elde edildi. Daha sonra ITO-Ag yüzeylerin Raman aktif olabilmesi için Raman aktif bir madde olan 4-aminotiyofenol (ATP) çözeltisi 10^{-3} M hazırlanarak 8 adet ITO-Ag yüzey 1 saat boyunca ATP çözeltisinde inkübe edildi. 1 saat sonunda ITO-Ag yüzey üzerindeki fazla ATP moleküllerini gidermek için etanol ile yüzeyler yıkandı. Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin aktifleştirilmesi için, 8 adet 1,5 mL'lik ependorf tüpe 20 mM 100 μ L 1-Etil-3[3-dimetilaminopropil] karboiimid hidroklorür (EDC), 50 mM 100 μ L N-Hidroksisüksinimid (NHS) ve 10 μ M 100 μ L karboksil grubu içeren oligonükleotitler eklenip termomikserde 850 rpm'de 1 saat karıştırılarak aktifleştirilmesi sağlandı. Daha sonra ITO-Ag-ATP yüzeylere karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin modifikasyonunu sağlamak amacıyla 1,5 mL'lik ependorf tüpe karışımın pH'ının sabit kalması için 1 mL fosfat tamponu (PBS), aktifleştirilmiş olan karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin, EDC ve NHS çözeltilerinin olduğu karışım ve ITO-Ag-ATP yüzey eklendi. Oligonükleotitlerin ITO-Ag-ATP yüzeylere modifikasyonu için termomikserde 4

saat boyunca karıştırıldı. 4 saat sonunda yüzeyler karışımdan alınıp önce PBS ile daha sonra distile su ile yıkanarak yüzey karakterizasyonuna hazırlandı. AFM ölçümleri Park Systems XE-100-E kullanılarak oda sıcaklığında “non-contact” modda 0,5 Hz tarama hızıyla yapıldı. Yüzeylerin YZRS spektrumları Renishaw inVia marka Raman cihazı Static modda %0,0001 lazer gücüyle alındı.

3.2.4 Çoklu Analiz için Hedef DNA’nın Farklı Problar ile Hibritleştirilmesi

Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerin (prob 2) 14 nm ve 50 nm AuNPs ile modifikasyonu sayesinde tek zincirli oligonükleotitleri tamamlayıcısı olan karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle hibritleştirmek için, karboksil grubu içeren oligonükleotitler ITO-Ag-ATP yüzeye modifiye edildi. Bu tiyol ve karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin hibritleştirilmesi için aşağıda ki koşullar oluşturuldu. ITO yüzeyler aktifleştirilip multipleks karboksilli DNA bağlandıktan sonra yüzeyler 1,5 ml’lik ependorf tüp içerisine;

ITO-Ag-ATP + 5 µL 14 nm Primer 1;

ITO-Ag-ATP + 5 µL 50 nm Primer 2;

ITO-Ag-ATP + 5 µL 50 nm Primer 1;

ITO -Ag-ATP + 5 µL 14 nm Primer 2;

ITO -Ag-ATP +5 µL 14 nm Primer 2 + 5 µL 50 nm Primer 1;

ITO -Ag-ATP + 5 µL 50 nm Primer 2 + 5 µL 14 nm Primer 1;

konularak ve üzerine 10 µL 3XSSC (450 mM NaCl ve 45 mM Sodyum Sitrat) tuz tamponu, 5 µL %0,2’lik SDS solüsyonu ve 5 µL %40’lık formamid eklenerek 45°C’de 6 saat inkübasyona bırakıldı. Yüzeyler AFM ve Raman Spektrometresiyle karakterize edildi. Ayrıca oligonükleotitleri jel elektroforezinde karakterize etmek için oligonükleotitlerin hibritleşme koşulları aşağıda yapılan deneyler sonucunda optimize edildi. Dizilerin hibritleşmesinin gerçekleştirilmesi için; 0,7 mL’lik ependorf tüpler içine 9 farklı dizi kombinasyonu yapıldı.

1. 25 µL Primer 6 (Karboksil içeren oligonükleotit)
2. 25 µL Primer 1 (Tiyol içeren oligonükleotit)
3. 25 µL Primer 2 (Tiyol içeren oligonükleotit)
4. 25 µL Primer 6 + 25 µL Primer 1
5. 25 µL Primer 6 + 25 µL Primer 2
6. 25 µL Primer 6 + 25 µL Primer 1 + 25 µL Primer 2
7. 25 µL Primer 6 + 500 µL Primer 1-N (14 nm AuNPs)
8. 25 µL Primer 6 + 500 µL Primer 2-N (50 nm AuNPs)
9. 25 µL Primer 6 + 250 µL Primer 1-N + 250 µL Primer 2-N) konuldu.

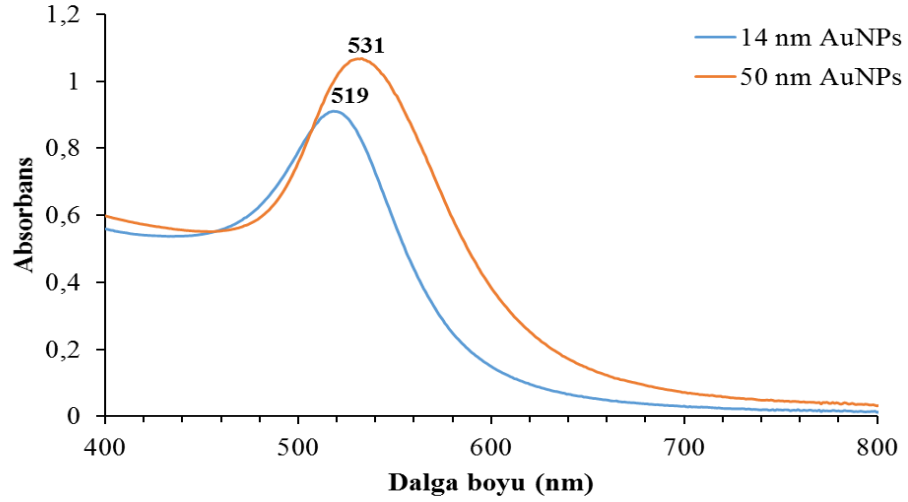
Üzerlerine 50 µL 3XSSC (450 mM NaCl ve 45 mM Sodyum Sitrat) tuz tamponu, 25 µL %0,2'lik SDS solüsyonu ve 25 µL %40'lık formamid eklenerek 45 °C'de 6 saat inkübasyona bırakıldı Daha sonra hibrit ürünler %1,5'lik agaroz jelde 60 dk yürütülerek UV altında görüntülendi.

BÖLÜM 4

BULGULAR ve TARTIŞMA

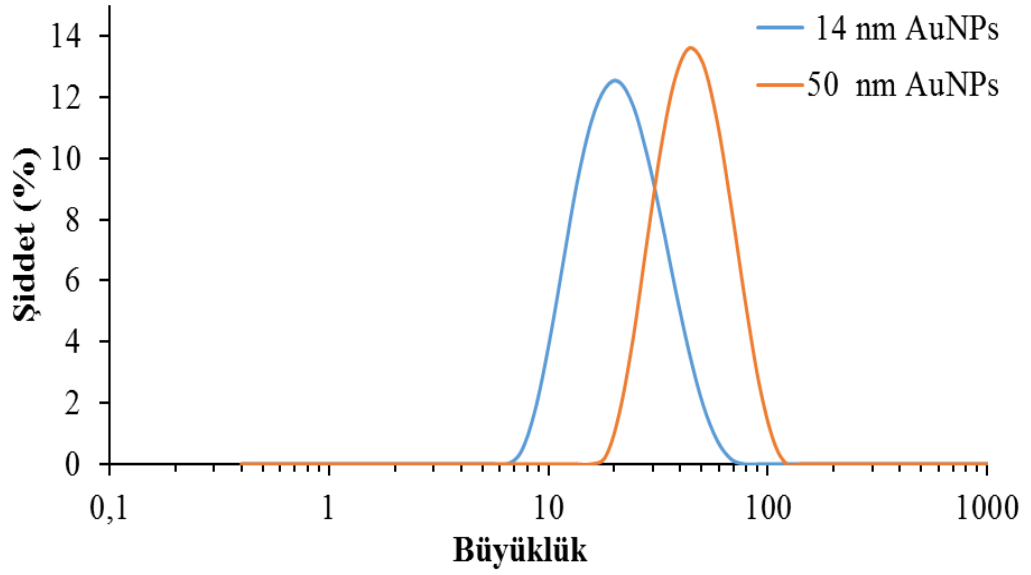
4.1 14 nm ve 50 nm AuNPs Karakterizasyonu

14 nm ve 50 nm AuNPs karakterizasyonu için UV-VIS Spektrofotometre, Zeta-Sizer ve TEM cihazları kullanıldı. Metal nanoparçacıklar (Au, Ag vs.) görünür bölgede ışığı absorplamaktadırlar. Bundan dolayı UV Spektrofotometresi kullanıldı. 14 nm ve 50 nm AuNPs absorpsiyon spektrumu Şekil 4.1’de görülmektedir.



Şekil 4.1. 14 nm ve 50 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.1 incelendiğinde 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon spektrumları görülmektedir. Dalga boyu parçacıkların cinsine büyüklüğüne bağlıdır. Parçacık boyutu arttıkça dalga boyunun arttığı, renginin de kırmızıdan maviye kaydığı gözlemlendi. Nanoparçacıkların yüzey yüklerini hidrodinamik çaplarını ve büyüklüklerini ölçmek için kullanılan bir diğer yöntem ise Dinamik Işık Saçılması (DLS) tekniğidir. Şekil 4.2’de iki farklı boydaki altın nanoparçacıkların büyüklük dağılımları görülmektedir.



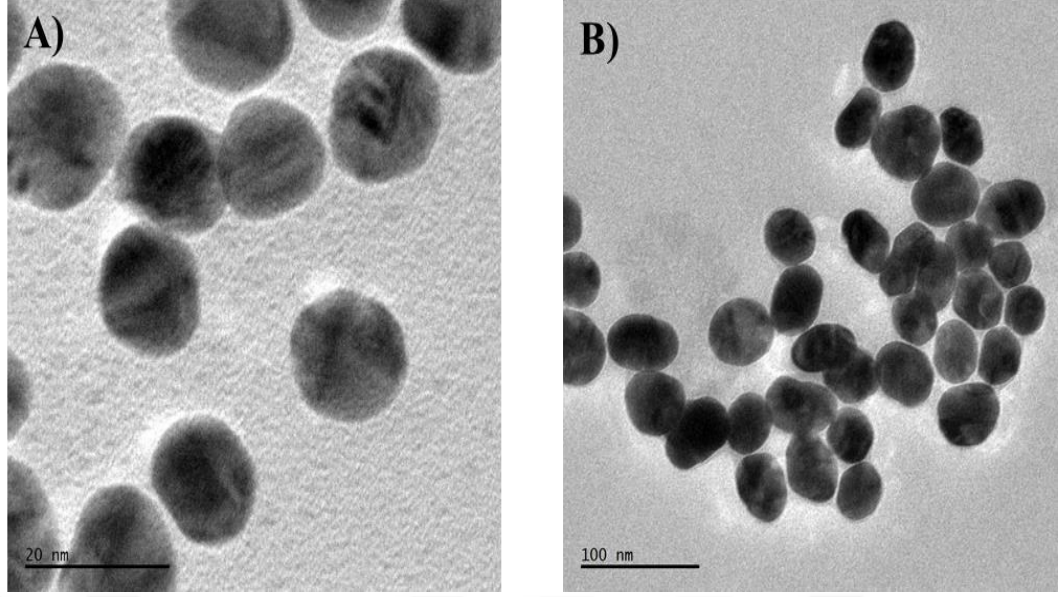
Şekil 4.2.14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların büyüklük dağılımları.

Şekil 4.2’de Altın nanoparçacıkların büyüklük dağılımları incelendiğinde 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların beklenen boylarından büyük çıkmasının nedeni hidrodinamik çaptan dolayıdır. Aynı zamanda süspansiyonların çözücü sıvı ve parçacık arasında ki potansiyel olan Zeta potansiyel değerleri de ölçüldü. Tablo 4.1’de altın nanoparçacıkların büyüklük ve Zeta değerleri görülmektedir.

Tablo 4.1. Hazırlanan AuNPlerin büyüklük ve zeta potansiyel değişimleri.

	Polidispersite İndeksi (PDI)	Büyüklik (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
14 nm AuNPs	0,19	18,72	-39,4
50 nm AuNPs	0,55	53,34	-39,4

Tablo 4.1’de ki Zeta değerlerinin negatif çıkmasının nedeni ortamda ki sitrat varlığıdır. Nanoparçacıkları görüntülemek için yüksek çözünürlüğe sahip geçirimli elektron mikroskobu kullanılır. Şekil 4.3’de farklı boylarda ki altın nanoparçacıkların taramalı elektron mikroskobu görüntüleri görülmektedir.

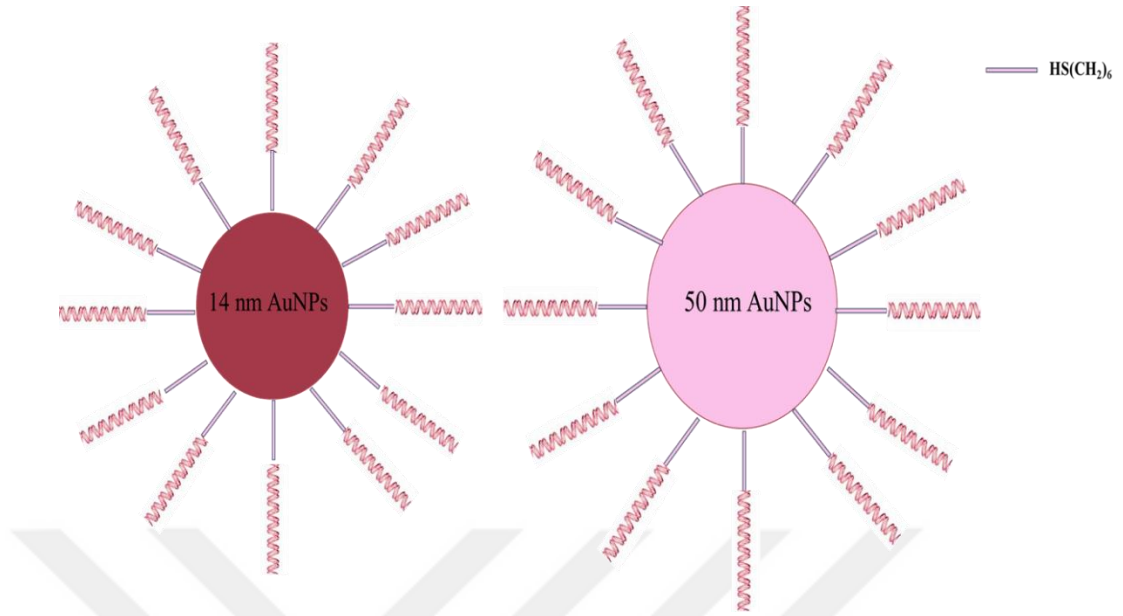


Şekil 4.3. A) 14 nm ve B) 50 nm altın nanoparçacıkların geçirimli elektron mikroskobu görüntüleri.

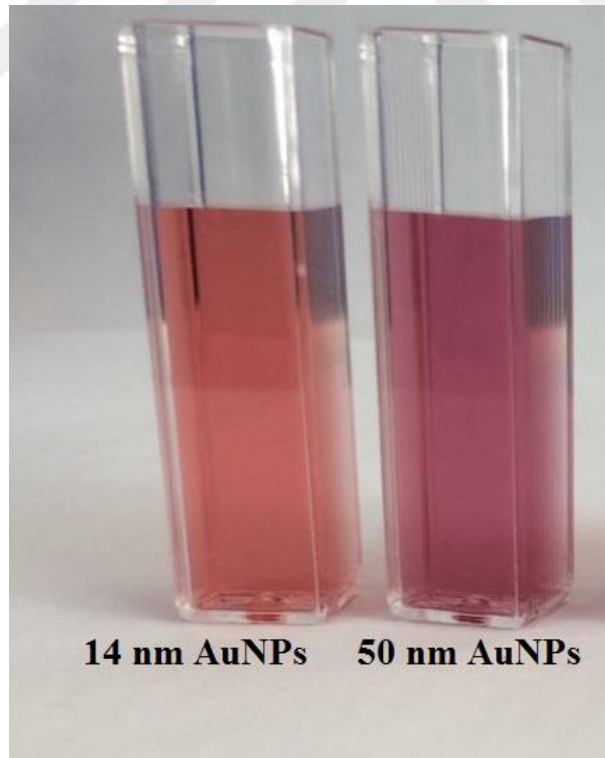
Şekil 4.3 incelendiğinde Şekil 4.3 A görüntüsünde 14 nm altın nanoparçacıkların homojen olarak dağıldığı görüldü. Şekil 4.3 B görüntüsünde ise 50 nm altın nanoparçacıkların yoğun olarak bir araya geldikleri görüldü. Genel olarak altın nanoparçacıklar beklenen boyutta ve şekilde görüldü.

4.2 Oligonükleotitler ile Modifiye Olan 14 nm ve 50 nm AuNPs Karakterizasyonu

14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklar oligonükleotitlerle modifiye edildikten (Şekil 4.4.) sonra modifiye olan altın nanoparçacıkların karakterizasyonu için UV-Vis Spektrofotometre, Zeta Sizer ve Raman Spektrometresi kullanıldı. 14 nm AuNPs, 50 nm AuNPs, 14 nm AuNPs/Primer-1, 14 nm AuNPs /Primer-2 50 nm AuNPs /Primer-1 ve 50 nm AuNPs Primer-2 kolloidlerinin absorbans ve dalga boyları Şekil 4.6 ve Şekil 4.7’de kolloidlerin maksimum absorpsiyon spektrumları gösterilmektedir.

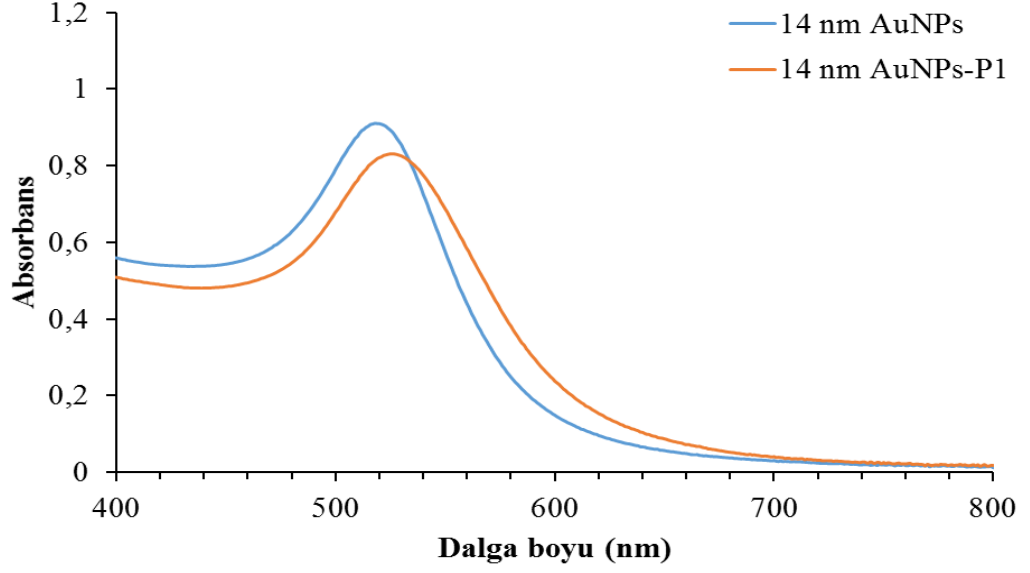


Şekil 4.4. Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş 14 nm ve 50 nm AuNPs şematik gösterimi.

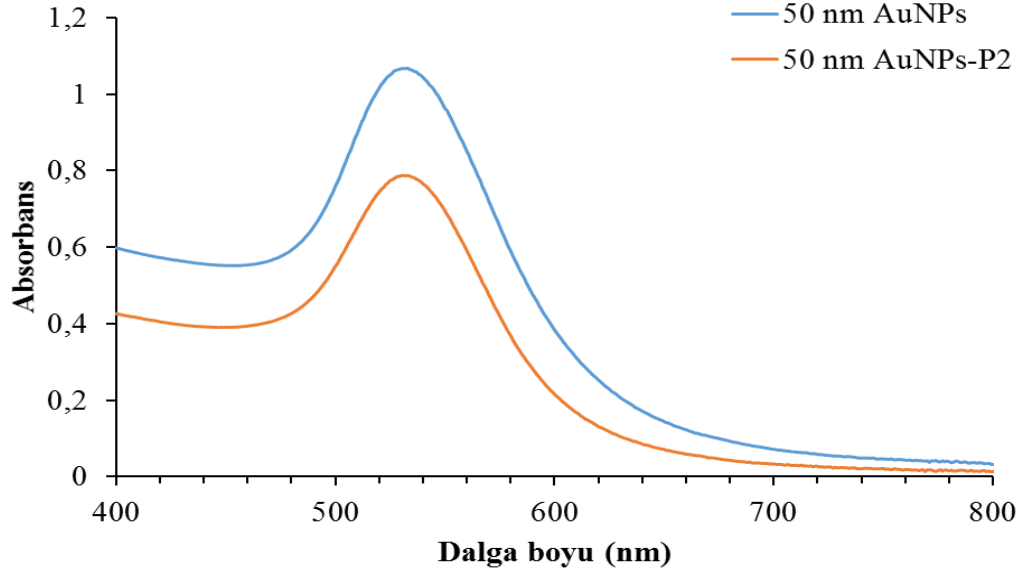


Şekil 4.5. 14 nm ve 50 nm AuNPs.

14 nm AuNPs, 50 nm AuNPs, 14 nm AuNPs/Primer-1 ve 50 nm AuNPs/Primer-2 kolloidlerinin şekil 4.6 ve 4.7’de absorbands spektrumları görölmektedir.



Şekil 4.6. 14 nm AuNPs ve oligonökleotitler ile modifiye olmuş 14 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları.



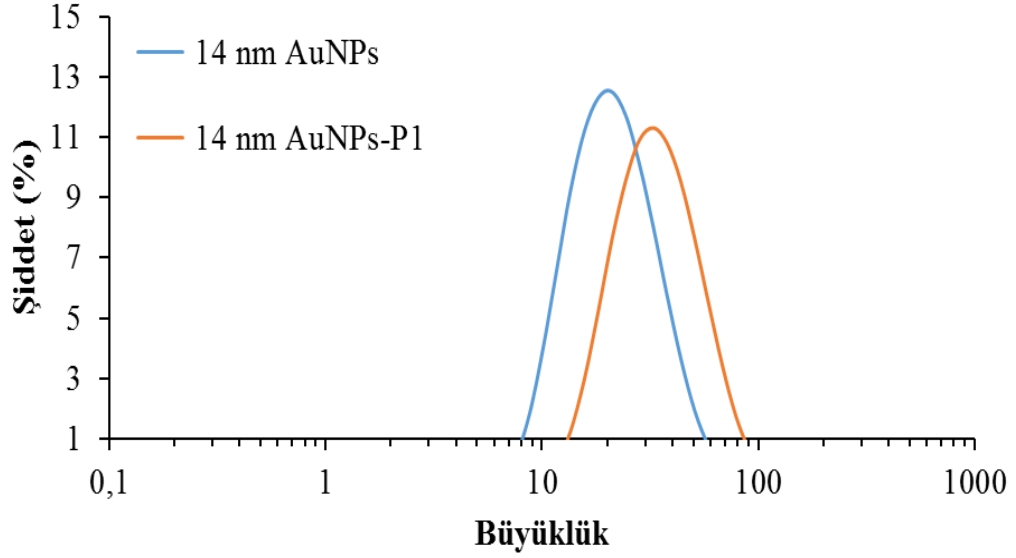
Şekil 4.7. 50 nm AuNPs ve oligonökleotitler ile modifiye olmuş 50 nm AuNPs absorpsiyon spektrumları.

14 nm olarak sentezlenen AuNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyu 519 nm ve tiyol içeren oligonükleotitler ile modifiye edilen AuNPlerin absorbands dalga boylarında birkaç nm değişim görülmektedir (Şekil 4.6). Literatüre bakıldığında plazmonik nanomalzemelerin yüzeyi modifiye edildiğinde dielektrik çevresi değiştiğinden birkaç nm yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyunda kayma olmaktadır. Elde edilen verilere bakıldığında benzer sonuçlar elde edildi. Tablo 4.2’de elde edilen maksimum absorpsiyon dalga boyları verilmektedir.

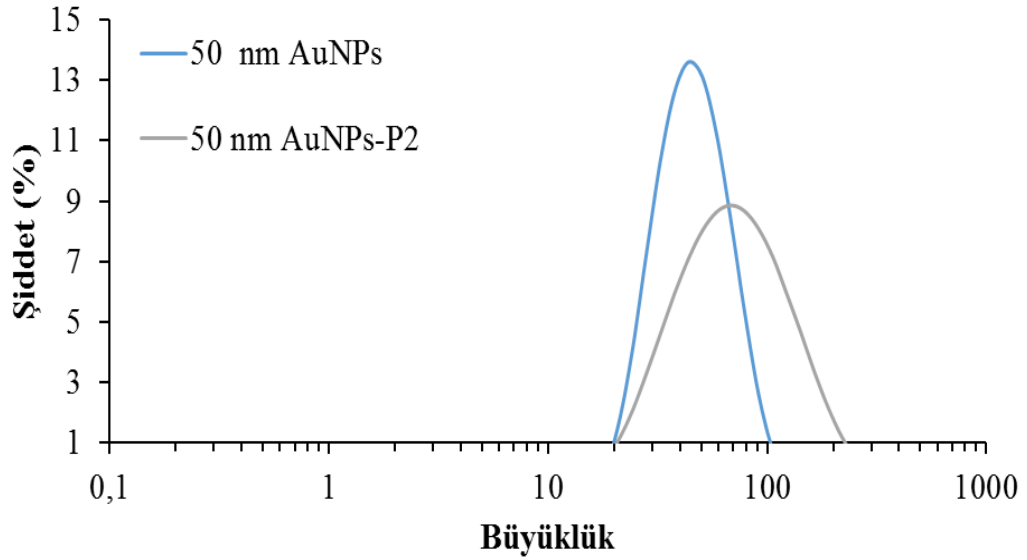
Tablo 4.2. Hazırlanan AuNPlerin maksimum absorpsiyon dalga boyları.

AuNPs/ Oligonükleotit	Max. Absorbans (nm)
14 nm	519
14 nm-P1	525
50 nm	531
50 nm-P2	532

Tabloda görüldüğü gibi oligonükleotiler ile modifiye edilen AuNPlerin absorpsiyon dalga boylarında birkaç nm kayma olmaktadır. Ayrıca oligonükleotilerle modifiye edilen AuNPleri karakterize etmek için Zetasizer cihazı kullanıldı. Bu cihaz yardımı ile hem nanoparçacıkların hidrodinamik çapları hem de yüzey yükleri (zeta potansiyel) ölçümleri yapıldı. Şekil 4.8 ve 4.9’da hazırlanan nanoparçacıklardan elde edilen büyüklük dağılım grafiği görülmektedir.



Şekil 4.8. 14 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş AuNPs süspansiyonların büyüklük dağılımları.



Şekil 4.9. 50 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye olmuş AuNPs süspansiyonların büyüklük dağılımları.

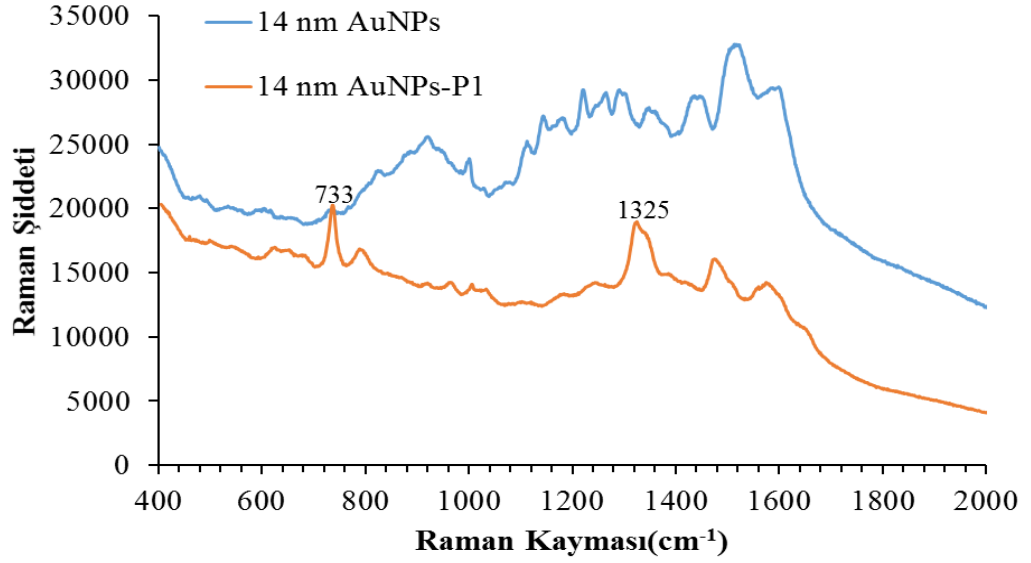
AuNPlar oligonükleotitler ile modifiye edildiğinde büyüklüğünde bir değişim meydana gelmektedir. Bu da süspansiyon içerisindeki nanoparçacıkların hidrodinamik çapında büyümeye neden olmaktadır. Bu değişimi belirleyebilecek en iyi yöntem dinamik ışık saçılmasıdır. Şekil 4.8 ve 4.9'da görüldüğü gibi oligonükleotitler ile modifiye edilen AuNPlerin büyüklükleri modifiye edilmemiş AuNPlere göre daha büyüktür. Bu da oligonükleotitlerin yüzeye kimyasal olarak

bağlandığını göstermektedir. Zetasizer cihazından alınan değerler (büyüklük ve zeta potansiyel) Tablo 4.3’de verilmektedir.

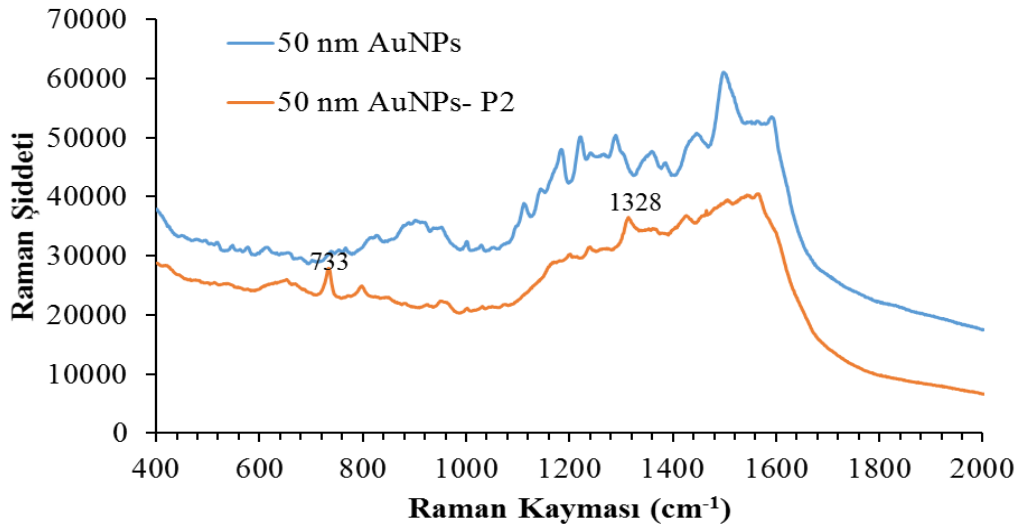
Tablo 4.3. Hazırlanan AuNPlerin büyüklük ve zeta potansiyel değişimleri.

	PDI	Büyüklük (nm)	Zeta Potansiyel (mV)
14 nm AuNPs	0,19	18,72	-39,4
14 nm-Primer 1	0,46	36,25	-21,5
50 nm AuNPs	0,55	53,34	-39,4
50 nm-Primer 2	0,51	79,50	-23,8

Sentezlenen AuNPlerin hidrodinamik çapları yaklaşık olarak 18 nm ve 50 nm ölçüldü. Tiyol içeren oligonükleotitler ile modifiye edildiğinde hidrodinamik çaplarında değişimler gözlemlendi (Tablo 4.3). Hidrodinamik çapı 18 nm olan AuNPlar oligonükleotitlerin yüzeyine bağlanması ile yaklaşık 36 nm olarak ölçüldü. Hidrodinamik çapı 50 nm olan AuNPlar oligonükleotitlerin yüzeyine bağlanması ile yaklaşık 80 nm olarak ölçüldü. Bu değişim AuNPlerin oligonükleotitler ile başarı ile modifiye edildiğini göstermektedir. Son olarak oligonükleotitler ile modifiye edilen AuNPleri karakterize etmek için Raman spektrometre kullanıldı (Şekil 4.10 ve 4.11).



Şekil 4.10. 14 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye edilen 14 nm AuNPs Raman spektrumları.

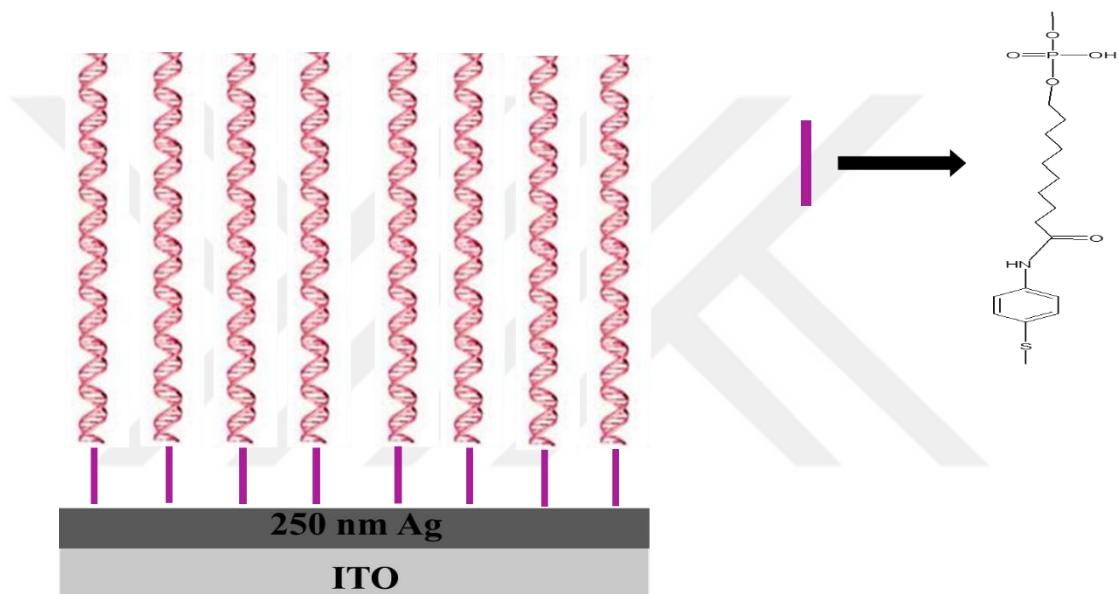


Şekil 4.11. 50 nm AuNPs ve oligonükleotitler ile modifiye edilen 50 nm AuNPs Raman spektrumları.

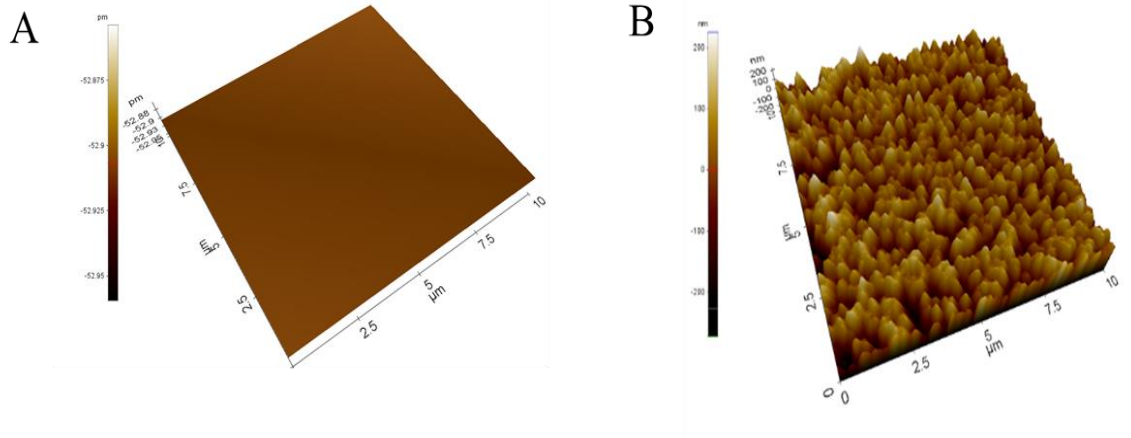
Oligonükleotitler modifiye edilen nanoparçacıklardan elde edilen Raman spektrumunda 730 ve 1319 cm^{-1} dalga sayısında pik görülmektedir. Bu pikler oligonükleotitlerde bulunan adenin bazından kaynaklanmaktadır [67]. Bu da nanoparçacıkların oligonükleotitler ile kimyasal olarak modifiye olduğunu göstermektedir.

4.3 Oligonükleotitler ile Modifiye Olan Yüzeylerin Karakterizasyonu

Tiyol grubu oligonükleotitler altın nanoparçacığa bağlandıktan sonra tamamlayıcısı olan oligonükleotitlerle hibritleştirmek için karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin (P6) yüzeye modifikasyonu, elektrokimyasal yöntemle ITO yüzeye 250 nm gümüş kaplanıp tek tabakalı yüzey oluşturularak YZRS yüzeyi elde edildi (Şekil 4.12). Yüzey karakterizasyonu için sıklıkla kullanılan Atomik Kuvvet Mikroskobu kullanıldı. Şekil 4.13’de ATP molekülleri ile modifiye ve karboksil grubuyla modifiye olmuş ITO gümüş yüzeylerin AFM görüntüleri görülmektedir.

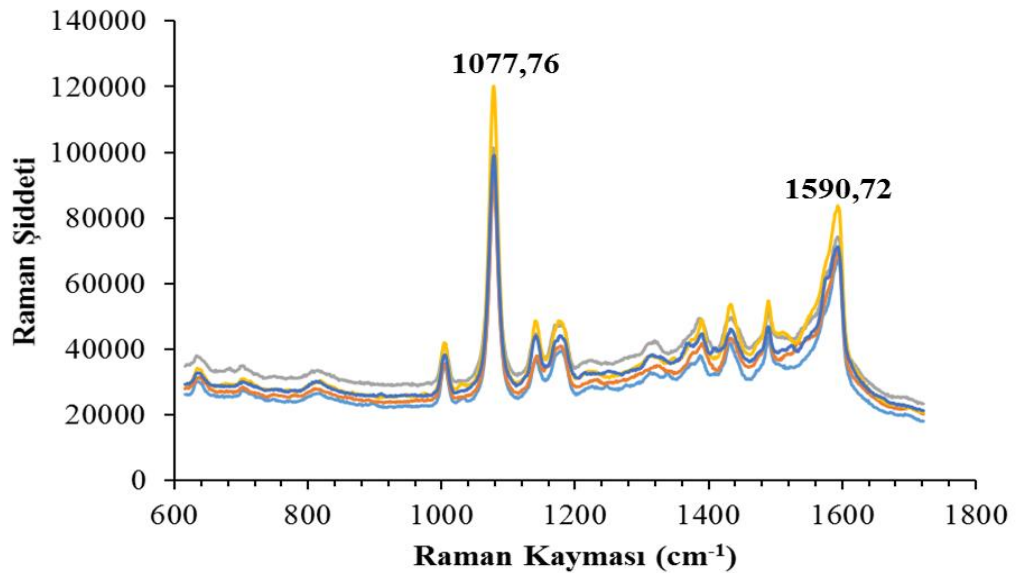


Şekil 4.12. Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin amit bağı yardımı ile YZRS aktif yüzeye kimyasal olarak bağlanmasının şematik gösterimi.

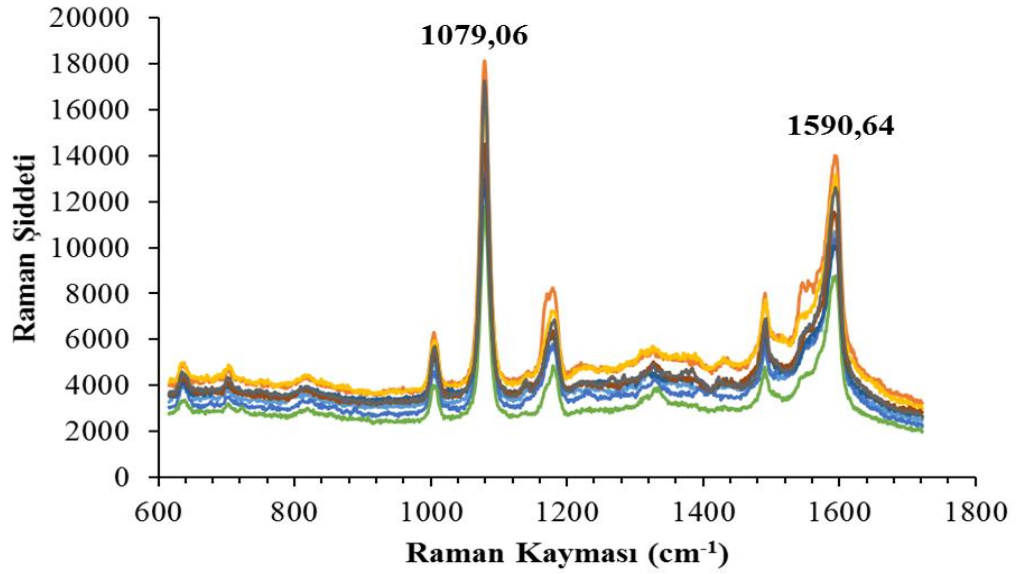


Şekil 4.13. A) ATP molekülleriyle modifiye olmuş B) Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş ITO yüzeylerin AFM görüntüleri.

Şekil 4.13 A’da ATP molekülleriyle modifiye olmuş 250 nm ITO yüzeyin AFM görüntüsü görülmektedir. Bu görüntüye göre yüzey oldukça temiz ve düzgündür. Şekil 4.13 B’de ise 250 nm gümüş kaplı ITO yüzey üzerine modifiye olmuş karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin varlığını göstermektedir. Bunu Raman spektrometresinde karakterize edebilmek için Raman aktif madde olan ATP molekülleri ile inkübe edilen yüzeylerin YZRS spektrumları şekil 4.14’de görülmektedir.



Şekil 4.14. 250 nm gümüş kaplı ITO yüzey üzerindeki ATP molekülünün YZRS spektrumları.

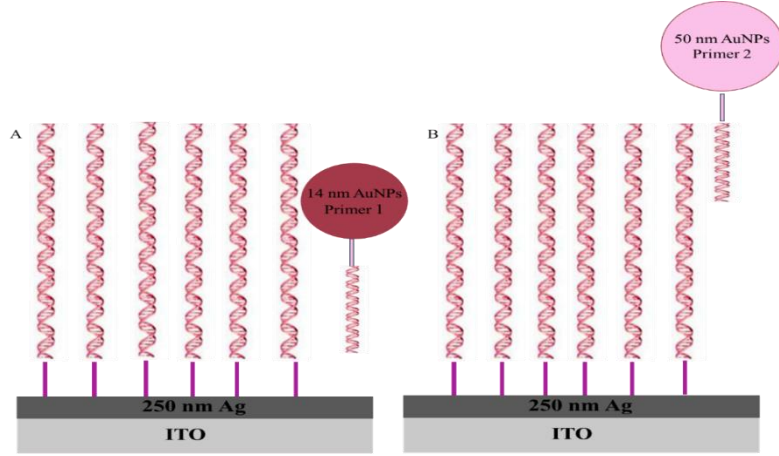


Şekil 4.15. 250 nm gümüş kaplı ITO yüzey üzerine modifiye olmuş oligonükleotitlerin YZRS spektrumları.

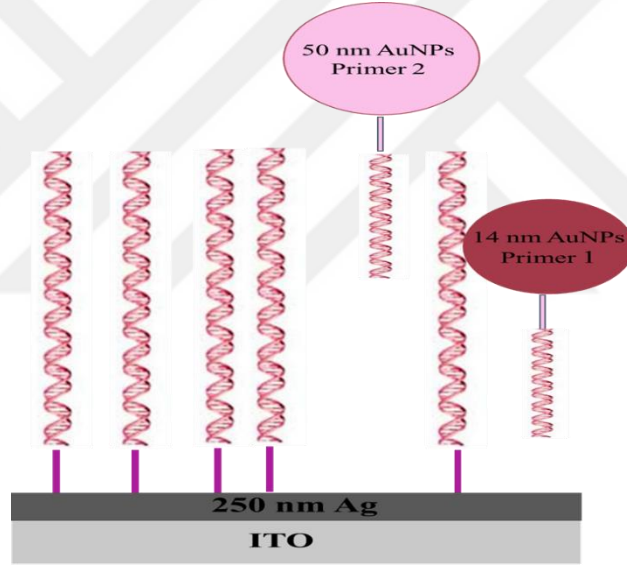
Şekil 4.14’de 250 nm Ag kaplı ITO yüzey üzerindeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları yüzeyin 10 farklı bölgesinden alınarak elde edildi. Tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu gözlemlendi. Serbest haldeki ATP moleküllerinden elde edilen spektrumların ortalaması, yüzeye oligonükleotitler bağlandıktan sonra ve hedef DNA ile nanoparçacıklar hibritleştirildikten sonra piklerdeki kaymayı belirlemek için referans olarak kullanıldı. Şekil 4.15’de ise P6 ile modifiye olan ITO yüzey üzerinde bulunan ATP moleküllerindeki kaymayı belirlemek amacıyla, yüzeyden alınan 10 adet YZRS spektrumu görülmektedir. Spektrumların tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu gözlemlendi. ATP molekülüne spesifik olan C-S bağlarındaki 1077 cm^{-1} pikin oligonükleotit varlığından dolayı birkaç derece kaydığı görüldü.

4.4 Çoklu Analiz İçin Hedef DNA’nın Farklı Problar ile Hibritleştirilen Oligonükleotitlerin Karakterizasyonu

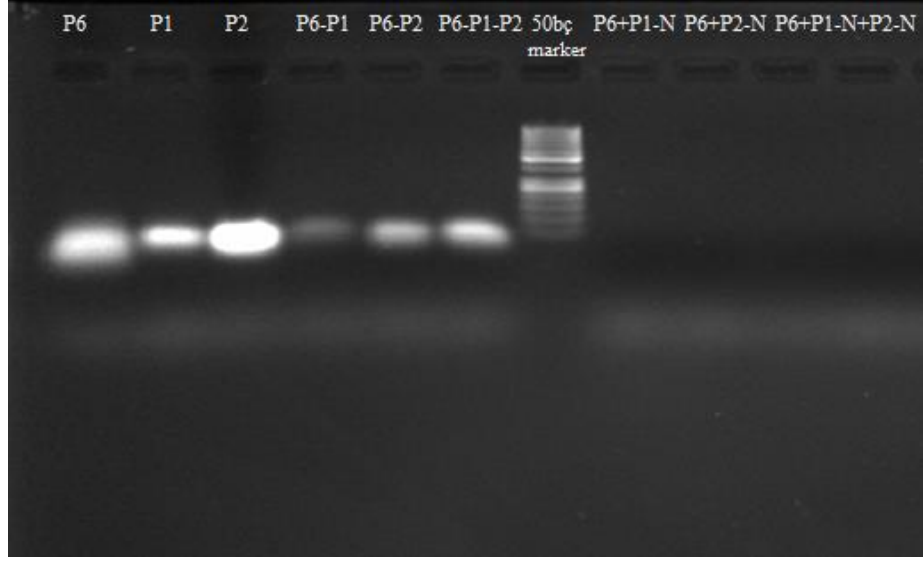
Tiyol içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş 14 nm ve 50 nm AuNPs tamamlayıcısı olan yüzeye modifiye olmuş oligonükleotitlerle hibritleştirildi (Şekil 4.16 ve 4.17). Hibritleşme karakterizasyonu için, jel elektroforezi, AFM ve Raman Spektrometresi kullanıldı. Şekil 4.18’de hibritleştirilen oligonükleotitlerin agaroz jeldeki bantları görülmektedir.



Şekil 4.16. YZRS aktif yüzeye bağlanmış karboksil grubu içeren oligonükleotitler ile 14 nm AuNPs-P1 (A) ve 50 nm AuNPs-P2 (B) kolloidlerinin hibritleşmesinin şematik gösterimi.

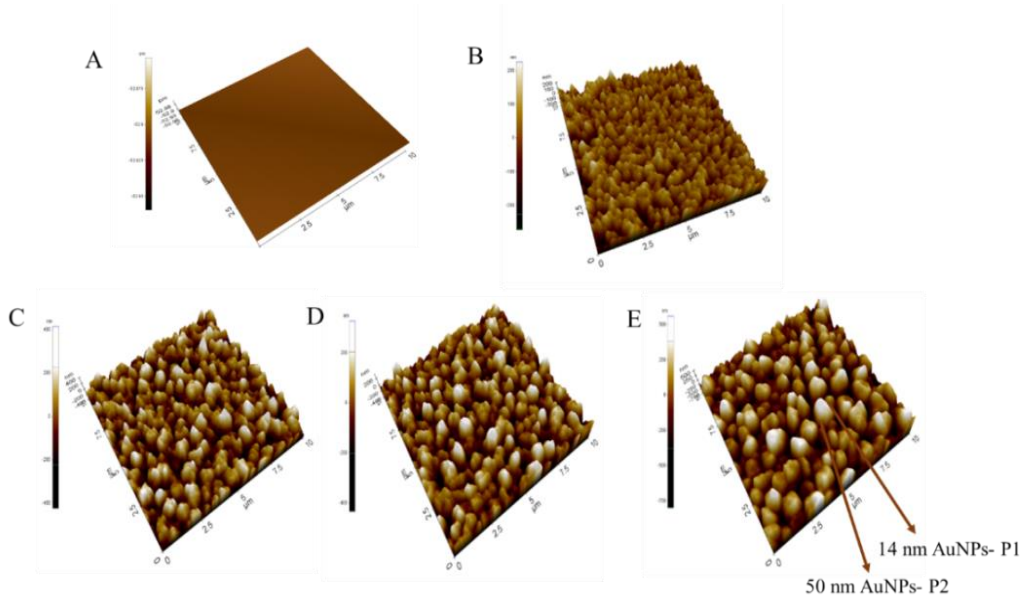


Şekil 4.17. YZRS aktif yüzeye bağlanmış karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin 14 nm AuNPs-P1 ve 50 nm AuNPs-P2 kolloidlerinin hibritleşmesinin şematik gösterimi.



Şekil 4.18. Hibritleştirilen oligonükleotitlerin agaroz jel görüntüsü (P6, Karboksilli Primer 6; P1, Tiyo Primer 1; P2, Tiyo Primer 2; P1-N, Tiyo Primer 1- Nanoparçacık (14 nm P1); Tiyo P2-N, Primer 2- Nanoparçacık (50 nm P2), 50bp Marker)

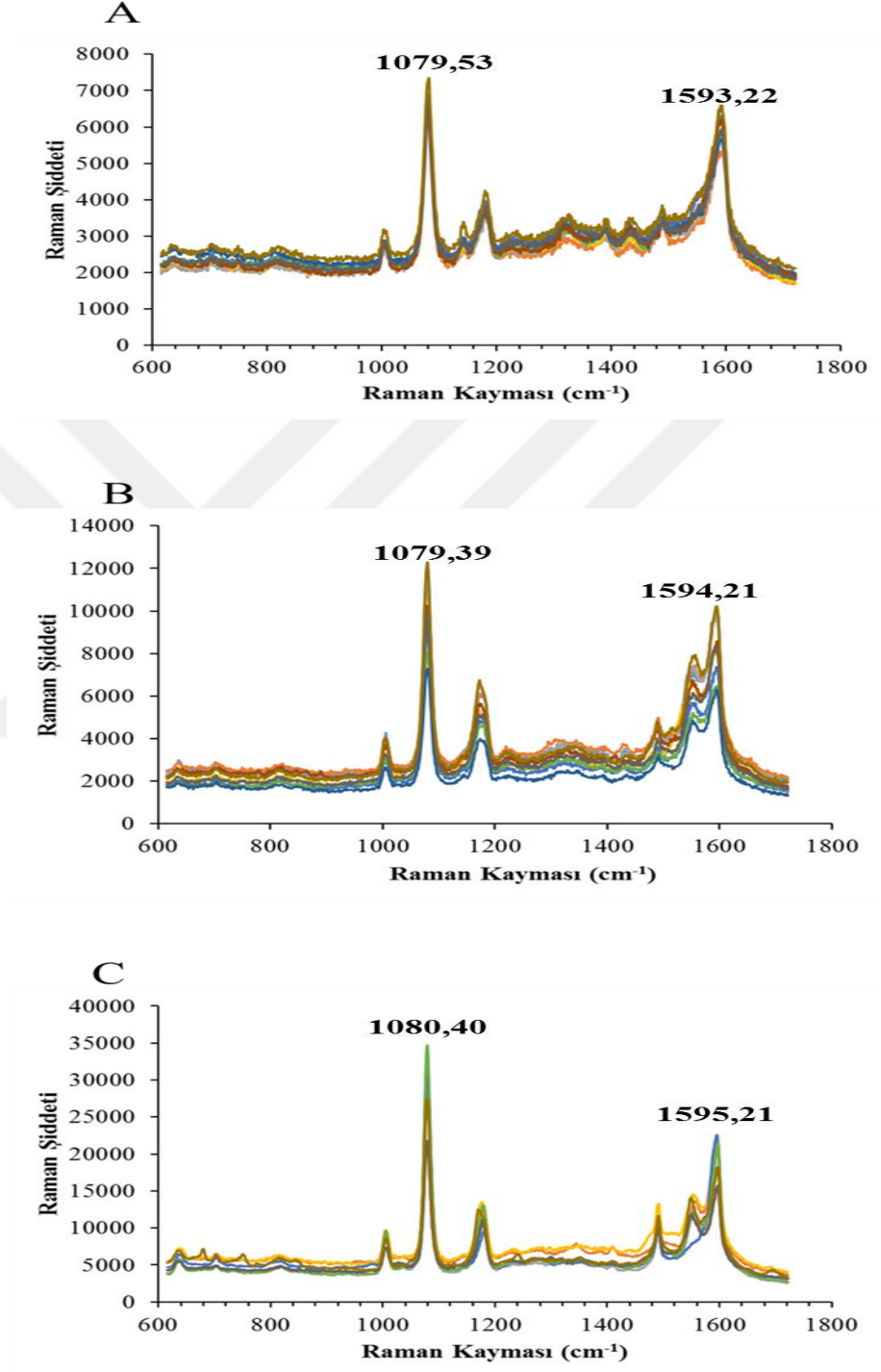
Şekil 4.18’de yer alan agaroz jel görüntüsünde içerisinde nanoparçacık olmayan hibritleşen oligonükleotitlerin olduğu kuyucuklarda tek bantın gözlenerek parlaklığının artması ve yoğunluklarından dolayı karboksilli oligonükleotitlerin ile 14 nm Primer 1 ve 50 nm Primer 2 nanoparçacıklarla beraber yüklendikleri kuyucuklarda daha az yürümüş olması hibridizasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Hibritleşmenin olduğunu desteklemek amacıyla hibritleşmesi gerçekleşen oligonükleotitleri karakterize etmek için Atomik kuvvet mikroskobu kullanıldı. Şekil 4.19’da hibritleşen oligonükleotitlerin AFM görüntüleri görülmektedir.



Şekil 4.19. Elde edilen yüzeylerden alınan AFM görüntüleri. (A) ITO-Ag Yüzey, (B) ITO-Ag-ATP-P6 (C) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 (D) ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, (E) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2

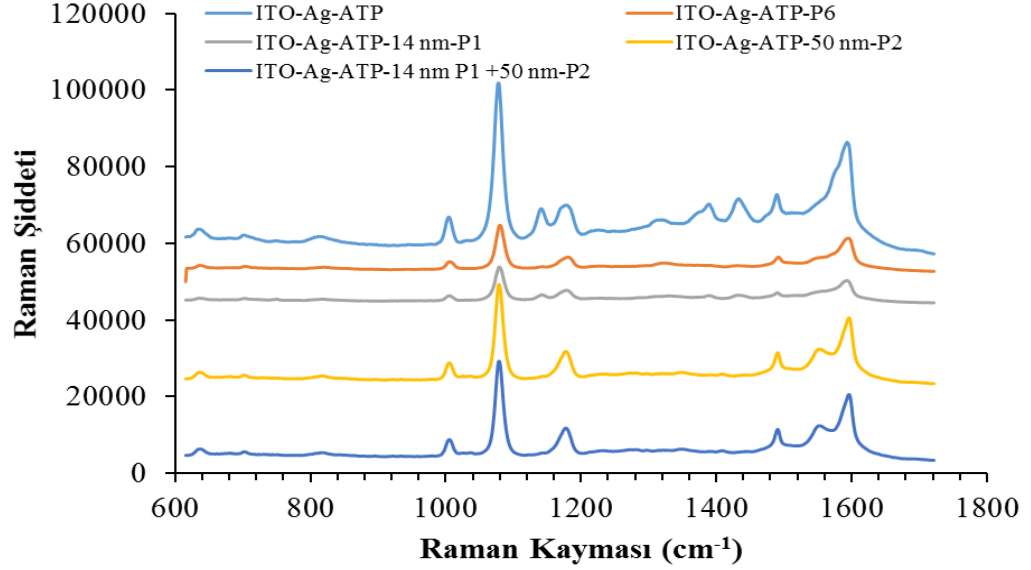
Şekil 4.19 A’da 250 nm Ag kaplı ITO yüzeyin AFM görüntüsü görülmektedir. Düz bir yüzey olduğu görülmektedir. B’de ise karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş yüzey görülmektedir. AFM görüntüsünde görünen yükselti oligonükleotitlerin yüzeye başarılı bir şekilde bağlandığını göstermektedir. Şekil 4.19 C’de ise karboksilli oligonükleotitlerle 14 nm AuNPs-P1 hibritleşmesi görülmektedir (Şematik gösterim Şekil 4.16 A). Yüzey üzerindeki parlaklıklar hibritleşme sonucunda yüzeye bağlanan 14 nm AuNPs kaynaklanmaktadır. Şekil 4.19 D’de karboksilli oligonükleotitlerle 50 nm AuNPs-P2 hibritleşmesi görülmektedir (Şematik gösterim Şekil 4.16 B). Yüzey üzerindeki parlaklıklar hibritleşme sonucunda yüzeye bağlanan 50 nm AuNPs kaynaklanmaktadır. 14 nm AuNPs-P1 ile karşılaştırıldığında 50 nm AuNPs-P2 nanoparçacıkların büyüklüklerinin daha büyük olduğu görülmektedir. Şekil 4.19 E’de son olarak hem 14 nm AuNPs-P1 ve 50 nm AuNPs-P2 ile hibritleştirilen yüzeyin AFM görüntüsü görülmektedir (Şematik gösterim Şekil 4.17). Görüntüdeki büyüklü küçüklü tepeciklerin olduğu görülmektedir. Küçük tepeciklerin 14 nm AuNPs, büyük tepeciklerin ise 50 nm AuNPs olduğu düşünülmektedir. AFM analizleri tiyol grubu içeren primerle modifiye edilen nanoparçacıkların karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye edilen yüzeylerle başarılı bir şekilde hibritleştirildiğini göstermektedir. Hibritleştirilen oligonükleotitlerin

tekrarlanabilirliklerini ve kayma derecelerini gözlemlemek için YZRS spektrumları alındı. Şekil 4.20’de hibritleştirilen oligonükleotitlerin YZRS spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.20. 250 nm Ag kaplı ITO yüzey üzerindeki, A) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 (B) ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, (C) ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2’elde edilen YZRS spektrumları.

Çoklu DNA analizi için yüzeye karboksil grubu içeren oligonükleotitler (P6) modifiye edildikten sonra 14 nm AuNPs-P1(Primer 1), 50 nm AuNPs- P2 (Primer 2) ve 14 nm AuNPs-P1+50 nm AuNPs- P2 hibritleştirildi. Daha sonra yüzey üzerinde ki ATP moleküllerinin 10 adet YZRS spektrumu alındı (Şekil 4.20). Spektrumlar incelendiğinde tekrarlanabilirliklerinin iyi olduğu görüldü.



Şekil 4.21. 250 nm Ag kaplı ITO yüzey üzerindeki, ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1, ITO-Ag-ATP-P6+50 nm AuNPs-P2, ITO-Ag-ATP-P6+14 nm AuNPs-P1 + 50 nm AuNPs-P2’elde edilen YZRS spektrumlarının Karşılaştırılması.

Tablo 4.4. 250 nm Gümüş Kaplı ITO Yüzey Üzerine Modifiye Olmuş ATP’in YZRS Spektrumlarından Alınan Yüksekliklerinin Ortalamaları ve Standart Sapmaları.

	ITO-Ag-ATP	ITO-ATP-P6 Modifikasyon	14 nm AuNPs-P1	50 nm AuNPs-P2	14 nm AuNPs-P1+50nm AuNPs-P2
C-S (cm ⁻¹)	1077,76 ±0,087	1079,06 ±0,21	1079,53 ±0,14	1079,39 ±0,22	1080,40 ±0,17
C-C (cm ⁻¹)	1590,72 ±0,41	1590,64 ±0,29	1593,22 ±0,46	1594,21 ±0,44	1595,21 ±0,43

Şekil 4.21’de ATP molekülü, yüzey üzerine modifiye edilmiş karboksil grubu içeren oligonükleotitler (P6), 14 nm-P1, 50 nm P2 ve 14 nm-P1+50 nm P2 oluşturduğu YZRS spektrumlarının karşılaştırılması görülmektedir. Bu grafiğe göre P6 oligonükleotitlerinin yüzeye modifiye olarak oluşturduğu 1077 cm^{-1} ’den 1078 cm^{-1} ’e 1 birimlik oluşan kayma ATP molekülünün üzerine modifiye olduğunu göstermektedir. 14 nm AuNPs ile modifiye olmuş P1 tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olduktan sonra karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin yüzeye modifiye edilmesiyle birbirinin tamamlayıcı olan oligonükleotitler hibritleştirilerek YZRS spektrumları elde edildi. ATP molekülünün spektrumuyla karşılaştırıldığında pikin az miktarda sağa kaydığını göstermektedir. Tablo 4.4’de de 1,5 birimlik kayma gözlemlendi 50 nm + P2 hibritleştirilmesiyle alınan YZRS spektrumlarındaki kayma 50 nm AuNPs’nin ATP moleküllerine yaptığı baskıdandır. 14 nm AuNPs ve 50 nm AuNPs tiyol içeren oligonükleotitlerle yüzeye modifiye olan karboksil içeren oligonükleotit zincirinin tamamıyla hibritleştirilmesiyle oligonükleotit zincirinin alt kısmına 14 nm AuNPs üst kısmına ise 50 nm AuNPs ile hibritleştirilmesiyle oligonükleotitlerin zinciri tamamlanarak YZRS spektrumları alındı. Bu spektrumlar incelendiğinde C-S ve C-C bağlarında ki 3 birimlik en fazla kaymanın bu spektrumda olduğu görüldü. Bunun sebebi ise 50 nm altın nanoparçacıkların ATP molekülüne göre çok büyük olması ve ATP moleküllerine baskı uygulayarak polarizlenebilirliğini değiştirerek pik derecelerini arttırmıştır.

BÖLÜM 5

SONUÇ

DNA analizinde hızlı ve doğru tayin oldukça önemlidir. Genel olarak DNA analizinde kullanılan yöntemler birçok dezavantaja sahip olduğundan gelişen bilim karşısında yetersiz kalmaktadır. Sunulan bu çalışmada yeni hızlı ve hassas multipleks DNA analizi için yöntem geliştirildi. Bu çalışmada 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklar kimyasal indirgeme metodu ile sentezlenerek UV-VIS Spektrofotometresi, Zeta-Sizer cihazı, TEM ile karakterize edildi. Yapılan UV-VIS ölçümüne göre 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon bantlarının ölçülmesiyle altın nanoparçacıkların boyunun artmasıyla maksimum absorpsiyon bantlarının büyüdüğü görüldü. Dinamik ışık saçılması yöntemiyle de altın nanoparçacıkların hem boyları hemde zeta potansiyelleri ölçülerek TEM cihazıyla da boylarının doğru olduğu desteklenmiş oldu. Sentezlenen 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklarla tiyol grubu içeren oligonükleotitlerler modifiye edilerek karakterizasyonları tekrar UV-VIS, Zeta Sizer ve Raman Spektrometresi ile karakterize edildi. 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon dalga boyları ve tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle modifiye olmuş altın nanoparçacıkların maksimum absorpsiyon dalga boyları karşılaştırıldığında, dalga boylarının arttığı görüldü. Dinamik ışık saçılması yöntemiyle oligonükleotitlerle modifiye olan altın nanoparçacıkların boylarının artması oligonükleotitlerin başarıyla modifiye olduğunu belirledi. Oligonükleotitlerin modifiye olduğunu belirlemek için bir de Raman Spektrometresiyle altın nanoparçacıkların Raman spektrumları alınarak literatürde belirlenen adenin ve guanin pikinin spektrumda gözlenmesiyle oligonükleotitlerin altın nanoparçacıklara modifiye olduğu belirlendi. Tiyol grubu içeren oligonükleotitlerin tamamlayıcısı olan karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin hibritleştirilmesi amacıyla elektrokimyasal yöntemle elde edilen ITO yüzey üzerine 250 nm gümüş kaplanmasıyla elde edilen yüzeylerin Raman aktif olması için iyi bir Raman işaretleyicisi olan 4-ATP'le inkübe edildi.

Karboksil grubu içeren oligonükleotitlerin yüzeylerle modifiye olabilmesi için karboimid reaksiyonu ile çapraz bağların açılması sağlandı. Oligonükleotitler yüzeye modifiye edilerek AFM görüntüleri ve ATP molekülünün YZRS spektrumları alındı. ATP moleküllerinin Raman işaretleyici olmasından dolayı yüzeye modifiye olan oligonükleotitlerin modifiye olduğunu ATP pikindeki kaymadan belirlendi. 14 nm ve 50 nm altın nanoparçacıklarla modifiye olmuş tiyol grubu içeren oligonükleotitlerle, tamamlayıcısı olan ITO gümüş yüzeye modifiye olmuş karboksil grubu içeren oligonükleotitlerle hibritleştirilmesinden sonra AFM ve Raman Spektrometresiyle karakterize edildi. AFM görüntüleri incelendiğinde, 14 nm AuNPs- P1 olan yüzeydeki parlak tepciklerin küçük, 50 nm AuNPs-P2 olan yüzeydeki parlak tepciklerin ise daha büyük olduğu görüldü. 14 nm-P1 + 50 nm-P2 olan yüzeyde büyüklü küçüklü parlak tepciklerin olduğu görüldü. Yüzey üzerinde oligonükleotitlerin varlığını belirlemek için yüzeyden YZRS spektrumları alınarak karşılaştırılma yapıldı. ATP molekülüne spesifik olan 1077 cm^{-1} değer oligonükleotitler yüzeye modifiye olduktan birkaç derece artmış daha sonra tamamlayıcısı olan altın nanoparçacıklarla modifiye olmuş oligonükleotitlerle hibritleştirildikten sonra pik derecesi nanoparçacıkların yaptığı baskıdan dolayı artmıştır [68]. Bu çalışmada hedeflenen multipleks için YZRS'ye dayalı biyosensör geliştirilmiştir. Çalışma için beklenen sonuçlar gerçekleşmiş ve böylece yeni, hassas ve hızlı bir yöntem geliştirildi. Geliştirilen bu yöntem sayesinde ileride DNA analizleri için protip bir YZRS biyoçip üretilmesi beklenmektedir. Buna ek olarak YZRS yüzey üzerindeki prob DNA değiştirilerek klinik öneme sahip DNA için biyoçip üretilmesi mümkün olacaktır.

KAYNAKLAR

- [1]. Tripp, R.A., Dluhy, R.A., ve Zhao, Y. (2008). Novel nanostructures for SERS biosensing. *Nano Today*. **3**, 31-37.
- [2]. Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., ve Feld, M.S. (1999). Surface enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level. *Chemical Physics*. **247**, 155-162.
- [3]. Liu, S., Chen, N., Li, L., Pang, F., Chen, Z., ve Wang, T. (2013). Fabrication of Ag/Au core-shell nanowire as a SERS substrate. *Optical Materials*. **35**, 690-692.
- [4]. Panarin, A.Y., Terekhov, S. N., Kholostov, K.I., ve Bondarenko, V.P. (2010). SERS-active substrates based on n-type porous silicon. *Applied Surface Science*. **256**, 6969-6976.
- [5]. Sancı, R., ve Volkan, M. (2009). Surface-enhanced Raman scattering (SERS) studies on silver nanorod substrates. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **139**, 150-155.
- [6]. Guven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U., ve Boyacı, I.H. (2011). SERS-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for Escherichia coli enumeration. *Analyst*. **136**, 740-748.
- [7]. Premasiri, W.R., Moir, D.T., Klempner, M.S., Krieger, N., Jones, G., ve Ziegler, L.D. (2004). Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. *The Journal of Physical Chemistry B*. **109**, 312-320.
- [8]. Ravindranath, S.P., Wang, Y., ve Irudayaraj, J. (2011). SERS driven crossplatform based multiplex pathogen detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **152**, 183-190.

- [9]. Wang, Y., Lee, K., Irudayaraj, J. (2010). Silver Nanosphere SERS Probes for Sensitive Identification of Pathogens. *The Journal of Physical Chemistry*. **114**, 16122-16128.
- [10]. Yan, B., Thubagere, A., Premasiri, W.R., Ziegler, L.D., Dal Negro, L., ve Reinhard, B.M. (2009). Engineered SERS Substrates with Multiscale Signal Enhancement: Nanoparticle Cluster Arrays. *ACS Nano*, **3**, 1190-1202.
- [11]. Sivashanmugan, K., Liao, J.-D., You, J.-W., ve Wu, C.-L. (2013). Focused-ionbeam- fabricated Au/Ag multilayered nanorod array as SERS-active substrate for virus strain detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **181**, 361-367.
- [12]. Yao, C.-K., Liao, J.-D., Chang, C.-W., Lin, J.-R. (2012). Spatially reinforced nano-cavity array as the SERS-active substrate for detecting hepatitis virüs core antigen at low concentrations. *Sensors and Actuators B: Chemical*. **174**, 478-484.
- [13]. Fang, C., Agarwal, A., Buddharaju, K.D., Khalid, N.M., Salim, S.M., Widjaja, E., Garland, M.V., Balasubramanian, N., ve Kwong, D.-L. (2008). DNA detection using nanostructured SERS substrates with Rhodamine B as Raman label. *Biosensors and Bioelectronics*. **24**, 216-221.
- [14]. Yuan, W., Ho, H.P., Lee, R.K.Y., ve Kong, S.K. (2009) Surface-enhanced Raman scattering biosensor for DNA detection on nanoparticle island substrates, *Applied Optics*. **48**, 4329-4337.
- [15]. Sachidanandam, R.A. (2001). Map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*. **409**, 928-933.
- [16]. Evans, W. E., Relling, M.V. (1999). Pharmacogenomics: translating functional genomics into rational therapeutics. *Science*. **286**, 487–491.
- [17]. Syvänen, A. C. (2001). Accessing genetics variation: genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nat. Rev. Genet.* **2**, 930–940.
- [18]. Ahmadian, A., Gharizadeh, B., Gustafsson, A. C., Sterky, F., Nyren, P., Uhlen, M., Lundeberg, J. (2000). Single-nucleotide polymorphism analysis by pyrosequencing, *Anal. Biochem.* **280**, 103–110.
- [19]. Cai, H., White, P. S., Torney, D., Deshpande, A., Wang, Z., Keller, R. A., Marrone, B., Nolan, J. P. (2000). Flow cytometry-based minisequencing:

A new platform for high-throughput single-nucleotide polymorphism scoring, *Genomics*. **66**, 135–143.

- [20]. Chen, X., Kwok, P.Y. (1997). Template-directed dye-terminator incorporation (TDI) assay: A homogeneous DNA diagnostic method based on fluorescence resonance energy transfer. *Nucleic Acids Res.* **25**, 347–353.
- [21]. Laken, S. J., Jackson, P. E., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Strickland, P. T., Groopman, J. D., Friesen, M. D. (1998). Genotyping by mass spectrometric analysis of short DNA fragments. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1352–1356.
- [22]. Ronaghi, M., Uhlen, M., Nyren, P. A. (1998). Sequencing method based on real-time pyrophosphate. *Science*. **281**, 363–365.
- [23]. Ross, P., Hall, L., Smirnov, I., Ha, L. (1998). High level multiplex genotyping by MALDI-TOF mass spectrometry. *Nat. Biotechnol.* **16**, 1347–1351.
- [24]. Syvanen, A.C. (1999). From gels to chips: Minisequencing primer extension for analysis of point mutations and single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* **13**, 1–10.
- [25]. Zhang, Z., Wen, Y., Ma, Y., Luo, J., Jiang, L., ve Song, Y. (2011). Mixed DNA functionalized nanoparticle probes for surface-enhanced Raman scattering based multiplex DNA detection. *Chemical Communications*. **47**, 7407-7409.
- [26]. Passarge, E., Color Atlas of Genetics, Second ed., Thime. (2001). Bhagavan, N.V. ve Ha, C.-E., Chapter 21- Structure and Properties of DNA, Essentials of Medical Biochemistry. (eds: Bhagavan, N.V. and Ha, C., Academic Press, San Diego, 275-286.
- [27]. Hoy, M.A., (2013). Chapter 1- DNA, Gene Structure, and DNA Replication, Insect Molecular Genetics (Third Edition). (eds: Hoy, M.A.), Academic Press, San Diego, 3-36.
- [28]. Choi, S. (2004). DNA Chips and Microarray Analysis, Handbook of fungal biotechnology. Marcel Dekker, Inc. (D. Arora, Ed).
- [29]. Sassanfar, S., Walker, G., (2003). DNA Microarray Technology. What Is It and How Is It Useful, MIT, Biology Science Outreach.

- [30]. NCBI. (2004). Microarrays: Chipping Away at the Mysteries of Science <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/About/primer/microarrays.html>.
- [31]. Bednar, M. (2000). DNA Microarray Technology and Application, *Med Sci Monit*, **6(4)**, 796–800.
- [32]. Choi, S. (2004). DNA Chips and Microarray Analysis, Handbook of fungal biotechnology. Marcel Dekker, Inc. (D. Arora, Ed).
- [33]. Sassanfar, S., Walker, G. (2003). DNA Microarray Technology. What Is It and How Is It Useful, MIT, Biology Science Outreach.
- [34]. Kubista, M., Andrade, J. M., Bengtsson, M., et al. (2006). The Real Time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med.* **27**, 95–125.
- [35]. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning A Laboratory Manual 2.ed., New York.
- [36]. Akane, A., Matsubara, H., Nakamura, S., et al. (1994). Identification of the heme compound copurified with deoxyribonucleic acid (DNA) from bloodstains, a major inhibitor of polymerase chain reaction (PCR) amplification. *J Forensic Sci.* **39**, 362–72.
- [37]. Izraeli, S., Pfleiderer, C., Lion, T. (1991). Detection of gene expression by PCR amplification of RNA derived from frozen heparinized whole blood. *Nucleic Acids Res.* **19**, 6051.
- [38]. Temizkan, G., Arda, N. (2004). Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler, İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri.
- [39]. Tübitak Gen mühendisliği ve Biyoteknoloji Araştırma Enstitüsü (2003). Moleküler Biyoloji Yöntemleri Uygulamalı Eğitim Kitabı.
- [40]. Meuer, S., Wittwer, C., Nakagawara, K. (2001). Rapid Cycle Real Time PCR methods and Applications, *Springer. Heidelberg*.
- [41]. PCR Applications Manual. (3rd ed.). <http://www.roche-applied-science.com>
- [42]. Brosterhus H, Brings S, Leyendeckers H. (1999). Enrichment and detection of live antigen-specific CD4(+) and CD8(+) T cells based on cytokine secretion. *Eur J Immunol.* **29**, 4053–4059.
- [43]. Bilgiç Gazioğlu S. (2004). Flow sitometrinin tarihçesi, çalışma metodolojisi ve Flow sitometri ve tıpta kullanımı. İstanbul: Bilmedya Grup 1-11.

- [44]. Maecker HT. Cytokine flow cytometry. In: Hawley TS, Hawley RG editors. *Flow Cytometri Protocols*. Second ed. Totova, NJ: Humana Press Inc, **263**.95-107.
- [45]. Sambrook, I., Fritsch, E.F., ve Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning, A Laboratory Manual*, second edition. New York. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [46]. Disaia, P.J., Creasman, W.T. (2003). *Klinik Jinekolojik Onkoloji*, 576: Ankara, Güneş Kitabevi.
- [47]. P. Janssen, R. Coopman, G. Huys, J. Swings, M. Bleeker, P. Vos, M. Zabeau, K. Kersters. (1996). Evaluaton of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiyology*. **142**, 1881-1893.
- [48]. P. Janssen, K. Maquelin., R. Coopman, I., Tjernberg, P., Bouvet, K. Kersters, Dijkshoorn, L. (1997). Discrimination of Acinetobacter Genomic Species by AFLP Fingerprinting. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **140**, 1179-1187.
- [49]. P. Vos., R. Hogers, M. Bleeker., M. Rijans., Theo van de lee., M. Horner, A. Frijters., J. Pot, J. Peleman., M. Zabeau (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*. **23(21)**, 4407-4414.
- [50]. Koeleman, J.G., Stoof, J., Biesmans, D.J., Savelkoul, P.H., ve Vandenbroucke-Grauls, C.M. (1998). Comparison of amplified ribosomal DNA restriction analysis, random amplified polymorphic DNA analysis, and amplified fragment length polymorphism fingerprinting for identification of Acinetobacter genomic species and typing of Acinetobacter baumannii. *J. Clin. Microbiol.* **36**, 2522–2529.
- [51]. V., R.C., (1930). The molecular scattering of light,
- [52]. Ferraro, J.R., Nakamoto, K., and Brown, C.W. (2003). Chapter 1- San Diego: Basic Academic Press,
- [53]. Amer, M.S. (2010). *Raman Spectroscopy, Fullerenes and Nanotechnology*, RSC Publishing.
- [54]. Chandrasekhara Venkata, R., (2014). *Molecular diffraction of light*, https://openlibrary.org/books/OL7035307M/Molecular_diffraction_of_light, Mayıs.

- [55]. Güven, B. (2011). Gıda Uygulamalarına Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi, Hacettepe Üniversitesi.
- [56]. Seda, K. (2010). Preparation And Characterization Of Silver Sers Nanotags, Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- [57]. B. Schrader and Moore, D.S. (1997). Laser-Based Molecular Spectroscopy For Chemical Analysis: Raman Scattering Processes.
- [58]. Doğan, Ü. (2011). Preparation And Characterization Of Surface Enhanced Raman Scattering Substrate Through Electro Deposition Of Silver-Pedot Film On Ito Glass Surface, Orta Doğu Teknik Üniversitesi.
- [59]. Yıldız A, Genç Ö, and S., B. (1997). Enstrümental Analiz Yöntemleri Ankara: Hacettepe Üniversitesi Yayınları.
- [60]. Movasaghi, Z., Rehman, S., ve Rehman, I.U. (2007). Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Applied Spectroscopy Reviews*. **42**, 493-541.
- [61]. Kılıç, E., Köseoğlu, F., and Yılmaz, H., (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri. Ankara: Bilim Yayıncılık.
- [62]. Chase., B. (1987). Fourier-Transform Raman-Spectroscopy, *Anal. Chem.* **59**, 888.
- [63]. Culha, M., D. Stokes., Leonardo R. Allain., ve T. Vo-Dinh. (2003). Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Based on a Self-Assembled Monolayer for Use in Gene Diagnostics. *Analytical Chemistry*. **75**, 6196-6201.
- [64]. Vo-Dinh, T. Hiromoto, M. Y. K. Begun, G. M. Moody, R.L. (1984). *Analytical. Chem.* **56**, 1667-1670.
- [65]. L. Fabris., M. Dante, G. Braun, S.J. Lee, N.O. Reich, M. Moskovits, T.Q. Nguyen, and G.C. Bazan (2007). A Heterogeneous PNA-Based SERS Method for DNA Detection. *J. Am Chem. Soc.* **129**, 6087.
- [66]. Hoan T. N. Hsin-Neng Wang Andrew M. Fales T. Dinh (2016). Plasmonic SERS biosensing nanochips for DNA detection, *Anal Bioanal Chem* **408**,1773–1781.
- [67]. Lan Sun, Chenxu Yu, Joesph Irudayaraj. (2007). Surface-Enhanced Raman Scattering Based Nonfluorescent Probe for Multiplex DNA Detection. *Anal. Chem.* **79**, 3981-3988.

- [68]. U. S. Dinish, M. Olivo SERS for Sensitive Biosensing and Imaging (2015). Handbook of Photonics for Biomedical Engineering.

