

NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE NANOTIP UYGULAMALARI

PRODUCTION OF NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATIONS IN NANOMEDICINE

FİLİZ SAYAR

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Biyomühendislik Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
DOKTORA TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2010

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **BIYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan


:.....
Prof. Dr. Tülin Kutsal

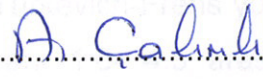
Üye (Danışman)


:.....
Prof. Dr. Erhan Pişkin

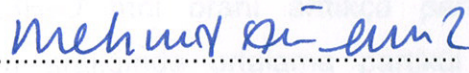
Üye


:.....
Prof. Dr. Kevser Pişkin Özden

Üye


:.....
Prof. Dr. Ayla Çalimli

Üye


:.....
Prof. Dr. Mehmet Ali Onur

ONAY

Bu tez / / tarihinde Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından kabul edilmiştir.

..... / /

Prof. Dr. Adil DENİZLİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRÜ

NANOPARTİKÜL ÜRETİMİ VE NANOTIP UYGULAMALARI

Filiz SAYAR

ÖZ

Sunulan çalışmanın amacı, üç farklı nanopartikül üretilmesi ve bunların nanotıp uygulamalarıdır. Tez çalışması farklı şekil, boyut ve yapıda altın nanopartiküllerin sentez, karakterizasyonu ve bu nanopartiküllerin nanotıp uygulamaları olmak üzere iki ana grup altında toplanmıştır. İlk bölümde, küresel ve çubuk formunda altın nanopartikül ve nanoçubuklar, çekirdek/kabuk formunda altın kaplı manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4/Au) olmak üzere üç farklı nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Farklı boyutta küresel altın nanopartikülleri, tetrakloraurat altın tuzunun ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) indirgeme ajanı (sodyum sitrat) ile indirgenmesi yöntemi olan Turkevich-Frens yöntemiyle sentezlenmiştir. Trisodyum sitrat/ $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ mol oranı 1.0- 4.5 arasında değiştirilerek trisodyum sitrat miktarının partikül boy, boy dağılımına ve optik özelliklerine etkileri incelenmiştir. Trisodyum sitrat/ $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$ mol oranı arttıkça partikül boyunun azaldığı görülmüş, 66 ile 13 nm aralığında ortalama partikül çapında küresel altın nanopartiküller elde edilmiştir. Partikül boyu arttıkça dalga boyu kayması (red-shift) olduğu görülmüştür.

Çekirdek/kabuk (Fe_3O_4/Au) yapısındaki nanopartiküllerin sentezi, ilk olarak manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin üretimi daha sonra bunların altın ile kaplanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Altın tuz miktarının manyetit nanopartikül etrafında oluşturduğu altın kabuk kalınlığına olan etkisi incelenmiştir. Ortalama partikül çapı 40 ve 90 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülünün altın ile kaplanması sonucu sırasıyla ortalama partikül çapı 87 ve 175 nm olan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikülleri elde edilmiştir. Manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) ile ölçülmüş, manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü 24 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı gösterirken altın kaplı manyetik nanopartikülü (Fe_3O_4 /Au) ise 0.003 emu/g (Ms) doygunluk mıknatıslığı göstermiştir. Manyetit nanopartiküllerinin altın ile kaplanması sonucu manyetik özelliğinin azaldığı görülmüştür.

Altın nanoçubukları küresel formdaki altın çekirdeklerinin büyütülmesi yöntemi olan çekirdek geliştirme (seed growth method) metodu ile üretilmiştir. Farklı uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar üretilerek uzunluk/çap oranına bağlı optik özelliklerindeki değişim incelenmiştir. $AgNO_3$ miktarı, çekirdek çözelti miktarı, askorbik asit miktarı, surfaktant türü ve derişimi, reaksiyon sıcaklığı, farklı çekirdek çözeltilerinin ve farklı sürelerde bekletilmiş çekirdek çözeltilerin kullanılması gibi parametrelerin uzunluk/çap oranına dolayısıyla çözelti rengi ve optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir. Altın nanoçubuklar radyal ve ekstenel yönde olmak üzere iki farklı dalga boyunda absorbanş göstermişlerdir. Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda farklı uzunluk/çap oranına sahip farklı renkte ve farklı optik özellik gösteren altın nanoçubuklar üretilmiştir. Ekstenel plasmon dalga boyu 600-900 nm aralığında aspect ratio oranı 2.0-5.0 aralığında olan gök kuşığı şeklinde farklı optik özelliklere sahip altın nanoçubuklar elde edilmiştir.

İkinci bölümde, ilk kısımda yapılan çalışmalar sonucunda sentezlenmiş ve karakterize edilmiş farklı boyut ve şekildeki altın nanopartiküllerin mikroemülsiyon fazda tanı kitleri veya “nanoarray” sistemlerinde ve cam gibi taşıyıcı yüzeylere adsorbe edilerek SPR destekli elipsometrik biyosensörlerinde kullanılabilirlikleri olmak üzere iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti veya nanoarray geliştirilmesi çalışmalarında, uzunluk/çap oranı 4.8 ve 2.1 olan altın nanoçubuklar, küresel altın nanopartikül ve Fe_3O_4/Au nanopartikül yüzeyine farklı derişimlerde (0.5-3.0 μM) tiyollu oligonükleotitler immobilize edilerek nanoproplar hazırlanmıştır. Prob oligonükleotit derişimine bağlı olarak dört farklı altın nanopartikülün plasmon dalga boylarındaki kaymalar incelenmiştir. 4.8 ve 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuk, küresel altın nanopartikül ve Fe_3O_4/Au nanopartikül yüzeyine 2.0 μM derişiminde prob oligonükleotit immobilizasyonu sonucu sırasıyla 32 nm, 46 nm, 5 nm ve 8 nm'lik dalga boyu kaymaları ölçülmüştür. Altın nanoçubukların küresel altın nanopartiküllerden daha büyük dalga boyu kayması gösterdiği görülmüştür. Daha sonra 2.0 μM derişiminde prob oligonükleotit immobilize edilmiş bu dört farklı nanopartikül problelerinin farklı derişimlerde (1.0-3.0 μM) hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu gerçekleştirilerek dalga boyu kaymaları incelenmiştir. Ayrıca nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin eşleniği olmayan

oligonükleotit ile etkileştirilerek dalga boylarındaki kaymalar incelenerek sistemin hassasiyeti araştırılmıştır. Hazırlanan altın nanoprobun eşleniği olmayan oligonükleotit ile etkileşimi sonucu çok küçük dalga boyları kaymaları göstermiş olup sistemin hassas olduğu görülmüştür. İki farklı hedefin aynı anda tayin edilebilmesi amacıyla yüzeyinde farklı probun takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar (“nanoarrayler”) hazırlanmıştır. Karışım içindeki her bir nanoprobun kendine özgü plasmon pikini gösterdiği görülmüştür. Nanoprobunlardan birinin hedefini içeren belli derişimde oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek hedefin probunu taşıyan nanopartiküldeki hibridizasyon sonucu plasmon dalga boyundaki kayma incelenmiştir. Karışım içindeki nanoprobunların hedef oligonükleotit ile hibridizasyonu sonucu ilgili nanoprobun plasmon dalga boyunda kayma oluşturduğu görülmüştür. Bu şekilde mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmuştur.

SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında, temizlenmiş cam slaytlar MPTS çözeltisiyle silanize edilip tiyol uç grubundan dört tip altın nanopartikülün kimyasal olarak immobilizasyonu sağlanmıştır. Altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlara farklı derişimlerde (0.25-2.0 µM) GOR oligonükleotit problemleri gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum prob derişimi belirlenmiştir. Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış cam slaytlara daha sonra farklı derişimlerde (0.25-2.0 µM) GOR probun hedefi olan oligonükleotitler gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle hibridizasyon sonucundaki kalınlık değişimi incelenmiştir. Ayrıca nanopartikül immobilize edilmiş cam slayt üzerindeki nanopartikül problemlerine hedef olmayan oligonükleotit çözeltisi gönderilerek sistemin seçiciliği araştırılmıştır. Herhangi bir delta değişimi gözlenmeyerek prob oligonükleotitlerin hedef olmayan oligonükleotitler ile hibridize olmadığı sistemin hassas olduğu belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Altın Nanopartikül, Altın Nanoçubuk, Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül (Fe_3O_4/Au), Süspansiyon fazda DNA Array’leri, SPR destekli Elipsometre.

Danışman: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü

PRODUCTION OF NANOPARTICLES AND THEIR APPLICATION IN NANOMEDICINE

Filiz SAYAR

ABSTRACT

The aim of the presented study is to produce three different nanoparticle and their applications in nanomedicine. Thesis work divided into two main group that synthesis, characterization of gold nanoparticles in different sizes and shapes (nanosphere and nanorods) and their applications in nanomedicine. In first part; three different nanoparticles which are spherical and rod shaped gold nanoparticles and gold nanorods, gold coated magnetic nanoparticles ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ -core/shell) synthesis, characterization were carried out. Different sized spherical gold nanoparticles were synthesized by sodium citrate reduction of $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. The effect of amount of sodium citrate on particle size, size distribution and optical properties was investigated by varying the mole rate of sodium citrate/ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$. between 1 and 4.5. It was seen that as the mole ratio of sodium citrate/ $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ increases particles size decreases and spherical gold nanoparticles of average diameters between 13 and 66 nm were synthesized. It was seen that as particle size increases, red-shift occurs.

Synthesis of $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanoparticles with core/shell structure was carried out in two stages that first, production of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles showing magnetic property; next, coating these by reduction of Au^{3+} with sodium citrate in the presence of Fe_3O_4 . The effect of gold salt amount on gold shell thickness that was composed by gold salt around magnetit nanoparticle was investigated. As a result of coating Fe_3O_4 nanoparticles that have average particle diameter of 40 nm and 90 nm by gold, gold coated magnetic ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanoparticles which have diameters of 87 nm and 175 nm were obtained respectively. Magnetic properties of the nanoparticles were investigated by Vibrating Sample Magnetometry (VSM). Magnetic nanoparticles exhibited a superparamagnetic behaviour and the saturation magnetization of magnetite nanoparticles and gold coated magnetic ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanoparticles were measured as 24 emu/g and 0.003 emu/g by VSM, respectively. As a result of coating magnetite nanoparticles by gold, it was seen that magnetic properties decrease.

Gold nanorods were produced in aqueous solution by using a seed-mediated method. By producing different aspect ratio gold nanorods, the effects of aspect ratio on optical properties of gold nanorods were investigated. The parameters such as the amount of AgNO_3 , the amount of core solution, the amount of ascorbic acid, kind of surfactant and concentration, reaction temperature, using different core solutions and aging time of core solution effect on aspect ratio thereby effect on solution colour and optical properties were investigated. Gold nanorods showed transverse plasmon absorption band and longitudinal plasmon absorption band in two different wavelength that radial and axial. As a result of all these studies, gold nanorods were produced which shows having different aspect ratio, different colour and optical properties. Gold nanorods which longitudinal plasmon wavelength interval was between 600-900 nm, aspect ratio interval was 2.0-5.0, rainbow coloured, having different optical properties were obtained.

In second part; the useability of gold nanoparticles with different size and shape in microemulsion phase nanoarray systems and in SPR supported ellipsometric biosensors by absorbing gold nanoparticles on glass surfaces was searched.

In studies of microemulsion phase nanoarray systems, gold nanoparticles in different sizes and shapes were functionalized with thiolated oligonucleotides belong to *M. Tuberculosis complex* and *M. Gordonae* pathogenic bacteria to construct gold nanoparticles bioprobes. Gold nanoparticles were functionalized with different concentration (0.5-3.0 μM) of thiolated oligonucleotides in belong to *M. Tuberculosis complex* and *M. Gordonae* pathogenic bacteria. We investigated the use of different gold nanorod bioprobes with different aspect ratios, conjugated to thiolated oligonucleotites, as novel optical labels based on changes in transverse and longitudinal surface plasmon resonance (LSPR) bands. Depended on probe concentration, red-shift in plasmon wavelength of four different gold nanoparticles was investigated. As a result of immobilizing prob oligonucleotide which has concentration of 2 μM to surface of gold nanorods having aspect ratio of 4.8 and 2.1, spherical gold nanoparticle and $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanoparticle; 57 nm, 46 nm, 5 nm and 8 nm, red-shift were measured, respectively. Gold nanorods showed bigger red-shift than spherical gold nanoparticles. Then, these four different nanoparticle probes were hibridized with different concentration (1.0-3.0 μM) of

target oligonucleotides. As a result of hybridization of target oligonucleotide with nanoprobe, red-shift in plasmon wavelength was investigated. Additionally; probe oligonucleotide, which is immobilized to surface of nanoparticle, was reacted with non-complementary oligonucleotide and by observing red-shift in plasmon wavelength; system's sensitivity was searched. By reacting prepared gold nanoprobe with non-complementary oligonucleotide, very small red-shift were seen and it was understood that system was sensitive. Lab-in-a-tube biosensors applications of these gold nanorods on changes in LSPR bands of aspect ratio-tunable nanoprobe were examined. By aiming two different target's determination, microemulsions which contains gold nanoparticle solutions that has two different shape or structure and different probes on its surface were prepared. These composed microemulsion solution's plasmon wavelength was determined by UV-Vis absorption spectrophotometer. It was seen that each nanoprobe in solution showed specific plasmon peak. By adding a certain concentration of oligonucleotide solution which containing one of the nanoprobe's target and as a result of hybridization at the nanoparticle that carrying target's probe, red-shift in plasmon wavelength was examined. As a result of hybridization of target oligonucleotide with nanoprobe in the solution, it was seen the fact that related nanoprobe composed red-shift in plasmon wavelength. In this manner, in microemulsion phase gold nanoparticle based DNA diagnostic kit and DNA arrays were formed.

In studies of SPR supported ellipsometric biosensor, cleaned glass slide surfaces was modified with MPTS molecules and then four different type nanoparticles were immobilized on these glass slide surfaces. Nanoparticles that immobilized to glass surface chemically and extended glass slides were used as carrying matrix in SPR system. By sending (0.25-2.0 μM) GOR oligonucleotide probes with different concentrations to prepared gold nanoparticles and extended glass slides and by SPR supported ellipsometric measurements, optimum probe concentration was determined. By sending oligonucleotides that was the target of (0.25-2.0 μM) GOR probe with different concentrations to glass slides that containing oligonucleotide; with SPR supported ellipsometric measurements thickness variation was examined after hybridization. Additionally; By sending non-target oligonucleotide solution to nanoparticle probes which takes place on the glass slide

that immobilized by nanoparticle, the system's selectivity was investigated. By not observing delta change, the system which probe oligonucleotites do not hibridize with non-target oligonucleotites was determined as sensitive.

Key Words: gold nanoparticles, gold nanorods, gold coated magnetic nanopartciles ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$), DNA arrays in suspension phase, SPR supported elipsometer.

Advisor: Prof. Dr. Erhan Bişkin, Hacettepe University, Department of Chemical Engineering

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübesinden yararlandığım; bu tezin planlanmasında ve gerçekleştirilmesinde, yol göstericiliği ve değerli katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Erhan Bişkin'e;

Çalışmamı yürütmemde desteklerini esirgemeyen değerli hocalarım Prof. Dr. Tülin Kutsal, Prof.Dr. Ayla Çalimli, Prof.Dr. A. Keşer Özden Pişkin'e;

Tez çalışmalarım ve diğer bilimsel çalışmalarımda yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarım Dr. Bora Garipcan, Dr. Mustafa Oğuzhan Çağlayan ve Dr. Gökhan Demirel'e;

Hayatımın büyük bir bölümünü geçirdiğim Biyomühendislik Anabilim dalı laboratuvarını yaşanır bir yer kılan sevgili arkadaşlarım, Tolga, Cafer, Ceyhun, Kadriye, Güldem, Sevil, Dilek, Emel, Asya, Halil, Hulusi, Sedat, Sinan, Nihan, Ayfer, İlyas, Gökhan, Burcu Çelen, Aybüke, Ilgın, Burcu Otman, Güneş, Zeynep ve Özlem'e;

Çalışmalarım boyunca bana destek olan diğer laboratuvarlarda çalışan arkadaşlarım, Soner Çakmak, Işıl Beşkardeş'e;

Tez çalışmam sırasında eğlendiğim, yorulduğum, üzüldüğüm, mutlu olduğum tüm zamanlarda hep yanımda olan Aybüke, Ilgın ve Tolga'ya;

Güzel günler geçirdiğim, iyi ve kötü günümde hep yanımda olup yardımlarını esirgemeyen Musa Akan, Onur Çınar ve Feride Bektaş'a;

Hayatımın her anında benden desteklerini esirgemeyen ve yanımda olan eşsiz kardeşlerim Burcu ve Zeliha'ya ve dünya tatlısı biricik yeğenlerim Zeynep ve Emirhan'a;

Hayatımı paylaştığım, her anımda yanımda olan, her sıkıntıda yardımına koşan, beni bu aşamalara getiren başarılarımı borçlu olduğum canımdan çok sevdiğim SEVGİLİ BABAM'a ve SEVGİLİ ANNEM'e;

Sonsuz Teşekkürlerimle.....

FİLİZ SAYAR

ARALIK 2010

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | |
|---|--------|
| ÖZ | i |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR..... | viii |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ | ix |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | xiv |
| ÇİZELGELER DİZİNİ..... | xxv |
| SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ | xxviii |
| 1. GİRİŞ..... | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 5 |
| 2.1. Metal Nanopartiküller..... | 9 |
| 2.2. Küresel Altın Nanopartiküller | 12 |
| 2.2.1. Altın Nanopartikül Probların Sentezi | 13 |
| 2.2.2. Altın Nanopartikül Probların Stabilizasyonu ve Fonksiyonelleştirilmesi... 15 | |
| 2.2.3. Altın Nanopartikül Problarının Kullanım Alanları | 17 |
| 2.2.3.1. Ağır Metal İyonlarının Belirlenmesi..... | 17 |
| 2.2.3.2. DNA Tayini..... | 18 |
| 2.2.3.3. Protein Analizi | 19 |
| 2.2.3.4. Enzimatik Aktivite Tayini | 21 |
| 2.2.3.5. Hücresel Analiz | 22 |
| 2.3. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller | 23 |

| | |
|---|----|
| 2.3.1. Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemleri ve Uygulama Alanları | 24 |
| 2.4. Altın Nanoçubuklar | 29 |
| 2.4.1. Altın Nanoçubukların Optik Özellikleri | 29 |
| 2.4.2. Altın Nanoçubuk Sentezi ve Oluşum Mekanizması..... | 31 |
| 2.4.2.1. Template Metot | 31 |
| 2.4.2.2. Elektrokimyasal Metot | 32 |
| 2.4.2.3. Çekirdek Geliştirme Metodu | 33 |
| 2.4.2.4. Diğer Altın Nanoçubuk Sentez Yöntemleri | 40 |
| 2.4.3. Altın Nanoçubukların Kullanım Alanları | 41 |
| 2.4.3.1. Tedavi Uygulamaları | 41 |
| 2.4.3.2. Hastalık Teşhis ve Tanı Uygulamaları | 43 |
| 2.5. Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri | 47 |
| 2.5.1. Yüzey Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPRBiyosensörleri. | 48 |
| 2.5.2. Süspansiyon Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri | 52 |
| 2.6. Yüzey Plasmon Rezonans (SPR) Biyosensörleri | 54 |
| 2.7. Elipsometrik Sensörler..... | 58 |
| 2.8. Array ve Array Platformlarının Oluşturulması | 59 |
| 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR | 62 |
| 3.1. Nanopartiküllerin Sentezi..... | 64 |
| 3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... | 64 |

| | |
|--|----|
| 3.1.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin Sentezi | 65 |
| 3.1.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin Sentezi | 66 |
| 3.1.4. Altın Nanoçubukların Sentezi | 68 |
| 3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 69 |
| 3.3. Nanopartiküllerin Nanotıp Uygulamaları | 72 |
| 3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar | 72 |
| 3.3.2. Mikroemülsiyon Fazda DNA Tanı Kiti veya Nanoarray Çalışmaları | 74 |
| 3.3.2.1. Süspansiyon Fazda Altın Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti | 75 |
| 3.3.2.2. Mikroemülsiyon Fazda Nanoarray Çalışmaları..... | 77 |
| 3.3.3. SPR Destekli Elipsometre Çalışmaları | 78 |
| 3.3.3.1. Cam Slayt Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İmmobilizasyonu | 78 |
| 3.3.3.2. Altın Nanopartikül Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması | 79 |
| 3.3.3.3. Altın Nanopartikül Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotit Dizisinin Hedef ile Hibridizasyonu | 79 |
| 4. SONUÇLAR ve TARTIŞMALAR..... | 82 |
| 4.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu | 86 |
| 4.1.1. Küresel Altın Nanopartiküllerin Sentezi | 86 |
| 4.1.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 91 |
| 4.1.2.1. Floresan Özellikleri..... | 91 |
| 4.1.2.2. FTIR Analizi..... | 93 |
| 4.1.2.3. X-Işınları Kırılması (X-RD) Analizi | 94 |

| | |
|--|-----|
| 4.1.2.4. Manyetometre İle Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi | 95 |
| 4.1.3. Altın Kaplı Manyetit (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin Sentezi | 96 |
| 4.1.4. Altın Kaplı Manyetit (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu | 100 |
| 4.1.4.1. Floresan Özellikleri..... | 100 |
| 4.1.4.2. FTIR Analizi..... | 103 |
| 4.1.4.3. X-Işını Kırılması Analizi | 106 |
| 4.1.4.4. Manyetometre İle Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi | 107 |
| 4.1.5. Altın Nanoçubukların Sentezi..... | 112 |
| 4.1.5.1. Farklı Çekirdek Çözeltilerinin Etkisi | 114 |
| 4.1.5.2. Farklı Sürede Bekletilmiş Çekirdek Çözeltilerinin Etkisi | 117 |
| 4.1.5.3. Sürfaktant Türü ve Derişimi..... | 122 |
| 4.1.5.4. $AgNO_3$ Miktarı | 129 |
| 4.1.5.5. Askorbik Asit Miktarı..... | 132 |
| 4.1.5.6. Çekirdek Çözelti Miktarı | 136 |
| 4.1.5.7. Reaksiyon Sıcaklığının Etkisi | 140 |
| 4.1.6. Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu | 144 |
| 4.1.6.1. Altın Nanoçubukların Floresan Özellikleri | 144 |
| 4.1.6.2. ATR Analizi | 148 |
| 4.1.6.3. X-Işınları Kırılması (X-RD) Analizi | 149 |
| 4.1.6.4. Manyetometre İle Manyetik Özelliklerinin Belirlenmesi | 151 |
| 4.2. Nanopartiküllerin Nanotıp Uygulamaları | 152 |

| | |
|--|-----|
| 4.2.1. Mikroemülsiyon Fazda DNA Tanı Kiti veya Nanoarray Çalışmaları | 154 |
| 4.2.1.1. Süspansiyon Fazda Uzunluk/Çap Oranı 4.8 Olan Altın Nanoçubuk Esaslı DNA Tanı Kiti..... | 155 |
| 4.2.1.2. Süspansiyon Fazda Uzunluk/çap Oranı 2.1 olan Altın Nanoçubuk Esaslı DNA Tanı Kiti..... | 164 |
| 4.2.1.3. Süspansiyon Fazda Küresel Altın Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti | 169 |
| 4.2.1.4. Süspansiyon Fazda Altın Kaplı Manyetik (Fe_3O_4/Au) Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti..... | 176 |
| 4.2.1.5. Mikroemülsiyon Fazda Nanoarray Çalışmaları..... | 182 |
| 4.2.2. SPR Destekli Elipsometre Çalışmaları | 208 |
| 4.2.2.1 Küresel Altın Nanopartiküllerin SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı | 209 |
| 4.2.2.2. Altın Nanoçubukların (A.R 3.5) SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı | 220 |
| 4.2.2.3 Altın Nanoçubukların (A.R 2.6) SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı | 228 |
| 4.2.2.4. Altın Kaplı Manyetik (Fe_3O_4/Au) Nanopartiküllerin SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı | 236 |
| 5. SONUÇLAR | 245 |
| 6. KAYNAKLAR..... | 262 |
| EKLER | 271 |
| ÖZGEÇMİŞ | 275 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| | |
|---|----|
| Şekil 2.1. Metal bir küredeki plasmon salınım | 10 |
| Şekil 2.2. Kolloidal altın nanoçubukların farklı iki yüzey plasmon bandı | 11 |
| Şekil 2.3. Altın nanopartikül problemleri oluşturma yöntemleri | 17 |
| Şekil 2.4. Aptamer konjuge edilmiş altın nanopartikül esaslı sensörler | 19 |
| Şekil 2.5. Altın nanopartiküllerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini birlikte kullanarak protein tayini | 20 |
| Şekil 2.6. Biyokatalitik dönüşümün altın nanopartiküller ile izlenmesi | 22 |
| Şekil 2.7. Endozom içindeki hücresel moleküllerin SERS spektrumu | 23 |
| Şekil 2.8. Su içinde oryante olmuş altın nanoçubukların farklı açılarda gösterdiği spektrum | 31 |
| Şekil 2.9. Altın nanoçubuk sentezleme yöntemleri. A) Template metot, B) Elektrokimyasal metot | 32 |
| Şekil 2.10. Altın nanoçubuk oluşumunda kullanılan C_n TAB yüzey aktif maddesinin oluşturduğu çift tabakalı fermuar (zipping) yapısı | 35 |
| Şekil 2.11. Çekirdek geliştirme metoduyla altın nanoçubuk sentezi | 37 |
| Şekil 2.12. Altın nanoçubuk oluşum mekanizması | 38 |
| Şekil 2.13. Nikel-altın nanoçubuk yapısıyla gen transfeksiyonu | 42 |
| Şekil 2.14. Nanoküre litografisi yöntemi | 49 |
| Şekil 2.15. Yüzey plazmon rezonansı oluşturmak için Kretschmann düzeneği | 56 |
| Şekil 2.16. Tipik SPR konfigürasyonu ve sensör modifikasyonu tiplerine örnekler | 57 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 2.17. Elipsometre temelli algılamanın şematik gösterimi | 58 |
| Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan görüntülemeli elipsometre (Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre) cihazı | 74 |
| Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan elipsometre akış hücresi..... | 74 |
| Şekil 4.1. Trisodyum sitrat/HAuCl ₄ mol oranına karşı ortalama partikül çapı değişimi | 88 |
| Şekil 4.2. Farklı sitrat/HAuCl ₄ mol oranında üretilen altın nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları | 89 |
| Şekil 4.3. A) 6 nolu küresel altın nanopartikülün AFM görüntüsü B) 1 nolu küresel altın nanopartikülün TEM görüntüsü (skala bar 20 nm'dir) | 90 |
| Şekil 4.4. Küresel altın nanopartiküllerin A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları | 92 |
| Şekil 4.5. Küresel altın nanopartikül FTIR spektrumu | 93 |
| Şekil 4.6. Küresel altın naopartiküllerin tipik bir X-RD spektrumu..... | 94 |
| Şekil 4.7. Küresel altın nanopartiküllerin mıknatıslık eğrileri..... | 95 |
| Şekil 4.8. Altın kaplı manyetit (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu..... | 97 |
| Şekil 4.9. Fe ₃ O ₄ /Au nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları | 99 |
| Şekil 4.10. Altın kaplı manyetit (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartikülün AFM görüntüsü (skala bar 50 nm'dir). | 100 |
| Şekil 4.11. Fe ₃ O ₄ nanopartikülün A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları..... | 101 |
| Şekil 4.12. Altın kaplı manyetik (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartiküllerin A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları..... | 102 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.13. FTIR spektrumları: (A) Manyetit nanopartikül (Fe_3O_4); B) Altın kaplı manyetik nanopartikül Fe_3O_4/Au | 105 |
| Şekil 4.14. X-RD spektrumları: (A) Manyetit nanopartikül (Fe_3O_4); B) Altın kaplı manyetik nanopartikül Fe_3O_4/Au | 106 |
| Şekil 4.15. Altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikülünün mıknatıslık eğrisi . | 108 |
| Şekil 4.16. Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri..... | 108 |
| Şekil 4.17. Fe_3O_4/Au nanopartikül süspansiyonunun A) çöktürülmeden önceki B) santrifüjleme ile çöktürülmesi C) çöktürüldükten sonraki manyetik özelliği | 110 |
| Şekil 4.18. Farklı boyda manyetit (Fe_3O_4) içeren altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri a) 90 nm manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül b) 40 nm manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül..... | 110 |
| Şekil 4.19. Altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu | 112 |
| Şekil 4.20. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu a) sitrat kaplı b) CTAB kaplı..... | 115 |
| Şekil 4.21. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların TEM görüntüleri a) sitrat kaplı b) CTAB kaplı (A için skala bar 50 nm, B için skala bar 20 nm)..... | 116 |
| Şekil 4.22. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 5 saat b) 10 saat c) 24 saat | 118 |
| Şekil 4.23. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) 5 saat B) 10 saat C) 24 saat. (Skala bar 20 nm'dir). | 120 |

- Şekil 4.24. Farklı surfaktant türleri ile elde edilen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) CTAC b) CTAB c) BDAC/CTAB122
- Şekil 4.25. Farklı surfaktant türleri ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) CTAC B) CTAB C) BDAC/CTAB. (A ve B için skala bar 20 nm, C için skala bar 50 nm'dir).124
- Şekil 4.26. Farklı CTAB miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 100 mM b) 200 mM c) 300 mM.126
- Şekil 4.27. Farklı surfaktant miktarları ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) 100 mM B) 200 mM C) 300 mM. (Skala bar 20 nm'dir)128
- Şekil 4.28. Farklı AgNO_3 miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 125 μl b) 250 μl c) 375 μl d) 500 μl129
- Şekil 4.29. Farklı miktarlarda AgNO_3 kullanılmış altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 125 μl b) 250 μl c) 375 μl d) 500 μl . (A, B ve D'de skala bar 50 nm, C'de 20 nm'dir).131
- Şekil 4.30. Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 135 μl b) 270 μl c) 540 μl d) 675 μl e) 810 μl133
- Şekil 4.31. Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 135 μl b) 270 μl c) 540 μl d) 675 μl e) 810 μl . (A, D ve E'de skala bar 50 nm, B ve C'de 20 nm'dir).135
- Şekil 4.32. Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 210 μl b) 420 μl c) 840 μl137
- Şekil 4.33. Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 210 μl b) 420 μl c) 840 μl .(A ve C'de skala ba 20 nm, B'de ise 50 nm'dir).139
- Şekil 4.34. Farklı sıcaklıklarda sentezlenen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu.140

| | |
|---|-----|
| Şekil 4.35. Farklı sıcaklıklarda sentezlenen nanoçubukların TEM görüntüleri a) 20°C b) 30 °C c) 50 °C. (Skala bar 20 nm'dir). | 142 |
| Şekil 4.36. Farklı dalga boyu aralıklarında oluşturulan altın nanoçubukların UV/Vis spektrumu ve çözelti renkleri | 143 |
| Şekil 4.37. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuğun a) emisyon b) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları | 145 |
| Şekil 4.38. Aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuğun a) emisyon b) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları | 146 |
| Şekil 4.39. Altın nanoçubukların tipik bir ATR spektrumu..... | 149 |
| Şekil 4.40. Altın nanoçubukların tipik bir X-RD spekturumu | 150 |
| Şekil 4.41. Altın nanoçubuklarının mıknatıslık eğrileri | 151 |
| Şekil 4.42. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 4.8) özellikleri..... | 156 |
| Şekil 4.43. Farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş altın nanoçubuk (A.R. 4.8) problelerinin UV/Vis absorpsiyon spekturumu | 157 |
| Şekil 4.44. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumları..... | 160 |
| Şekil 4.45. Altın nanoçubuk ve altın nanoçubuğun GOR prob, GOR hedef ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi | 162 |
| Şekil 4.46. Altın nanoçubuk yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehibridize edilmesi sonucu fluoresan spektrofotometresi..... | 163 |
| Şekil 4.47. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) özellikleri..... | 164 |
| Şekil 4.48. Farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) UV/Vis absorpsiyon spekturumu | 165 |

- Şekil 4.49. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları .168
- Şekil 4.50. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan küresel altın nanopartiküllerin özellikleri170
- Şekil 4.51. Farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş küresel altın nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spekturumu171
- Şekil 4.52. Altın nanopartikül probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.....173
- Şekil 4.53. Altın nanopartikül ve altın nanopartikül GOR prob, GOR hedef, MTB hedef ile etkileşimi ve altın nanopartikül yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehidridize edilmesi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi175
- Şekil 4.54. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerin özellikleri.....176
- Şekil 4.55. Farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spekturumu.177
- Şekil 4.56. Fe_3O_4/Au nanopartikül probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.....179
- Şekil 4.57. Fe_3O_4/Au nanopartikül ve Fe_3O_4/Au nanopartikül-MTB prob, MTB hedef, GOR hedef ile etkileşimi ve Fe_3O_4/Au nanopartikül yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehidridize edilmesi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi181
- Şekil 4.58. Farklı altın nanoçubuk prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spekturumu.....183
- Şekil 4.59. Farklı altın nanoçubuk prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spekturumu
a) altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu b) altın nanoçubuk (A.R. 2.1)

| | |
|---|-----|
| MTB probu c) altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu karışımı. | 184 |
| Şekil 4.60. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının GOR hedefi ile etkileşimi sonucu UV/Vis absorpsiyon spektrumu | 186 |
| Şekil 4.61. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının MTB hedefi ile etkileşimi sonucu UV/Vis absorpsiyon spektrumu | 187 |
| Şekil 4.62. a) GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoçubuk prob karışımının b) GOR hedef ile etkileşiminin c) MTB hedef ile etkileşiminin UV/Vis absorpsiyon spektrumları. | 189 |
| Şekil 4.63. a) Altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probunun b) Altın nanopartikül GOR probunun c) Altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu ile altın nanopartikül GOR probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu. | 191 |
| Şekil 4.64. a) GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoprob karışımının b) GOR hedef ile etkileşiminin c) MTB hedef ile etkileşiminin UV/Vis absorpsiyon spektrumları | 193 |
| Şekil 4.65. a) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probunun b) Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül MTB probunun c) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül MTB probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu | 195 |
| Şekil 4.66. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) Altın nanoçubuk (A.R.4.8)-GOR prob b) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım c) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım..... | 197 |
| Şekil 4.67. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül-GOR prob b) MTB | |

| | |
|--|-----|
| hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım c) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım..... | 200 |
| Şekil 4.68. a) Altın nanopartikül GOR probunun b) Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probunun c) Altın nanopartikül GOR probu ile Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu | 202 |
| Şekil 4.69. Nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu. a) Au nanopartikül-GOR prob b) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım c) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım kısım | 204 |
| Şekil 4.70. Nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu. a) Fe_3O_4/Au - MTB prob b) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik kısım c) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım. | 206 |
| Şekil 4.71. SPR destekli elipsometre sensöründe kullanılan küresel altın nanopartiküllerin özellikleri. | 210 |
| Şekil 4.72. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki küresel altın nanopartiküllerin delta değişimi | 211 |
| Şekil 4.73. Küresel altın nanopartiküller yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim..... | 213 |
| Şekil 4.74. Küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri..... | 214 |
| Şekil 4.75. GOR prob oligonükleotitinin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 216 |
| Şekil 4.76. Küresel altın nanopartiküller yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyona bağlı | |

| | |
|---|-----|
| delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 1 μ M. | 218 |
| Şekil 4.77. Küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitin GOR hedef oligonükleotiti ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta değişimleri. | 219 |
| Şekil 4.78. GOR hedef oligonükleotitin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 220 |
| Şekil 4.79. SPR destekli elipsometre sensörü çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 3.5) özellikleri..... | 221 |
| Şekil 4.80. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki altın nanoçubukların (A.R 3.5) kalınlık değişimi..... | 222 |
| Şekil 4.81. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişimi | 223 |
| Şekil 4.82. Altın nanoçubuk (A.R 3.5) yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri..... | 224 |
| Şekil 4.83. GOR prob oligonükleotitin altın nanoçubuk (AR 3.5) yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 225 |
| Şekil 4.84. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyonu sonucu delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 1 μ M | 226 |
| Şekil 4.85. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitin GOR hedef oligonükleotitleri ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta değişimleri. | 227 |
| Şekil 4.86. GOR hedef oligonükleotitin altın nanoçubuk (AR 3.5) yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 228 |

| | |
|--|-----|
| Şekil 4.87. SPR destekli elipsometre sensörü çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 2.6) özellikleri..... | 229 |
| Şekil 4.88. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki altın nanoçubukların (A.R 2.6) kalınlık değişimi..... | 230 |
| Şekil 4.89. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişimi | 231 |
| Şekil 4.90. Altın nanoçubuk (A.R 2.6) yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri. | 232 |
| Şekil 4.91 .GOR prob oligonükleotitinin altın nanoçubuk (AR 2.6) yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 233 |
| Şekil 4.92. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyonu sonucu delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 2µM | 234 |
| Şekil 4.93. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotitleri ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta değişimleri. | 235 |
| Şekil 4.94. GOR hedef oligonükleotitinin altın nanoçubuk (AR 2.6) yüzeyine bağlanma kinetiği..... | 236 |
| Şekil 4.95. SPR destekli elipsometre sensöründe kullanılan altın kaplı manyetik (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartiküllerin özellikleri. | 237 |
| Şekil 4.96. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki manyetik altın kaplı (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartiküllerin kalınlık değişimi..... | 238 |
| Şekil 4.97. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim | 239 |

- Şekil 4.98. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri240
- Şekil 4.99. GOR prob oligonükleotitinin manyetik altın kaplı nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) yüzeyine bağlanma kinetiği.241
- Şekil 4.100. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; $2\mu\text{M}$ 242
- Şekil 4.101. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotiti ile eğleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta değişimleri243
- Şekil 4.102. GOR hedef oligonükleotitinin manyetik altın kaplı nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) yüzeyine bağlanma kinetiği.244

ÇİZELGELER DİZİNİ

| | |
|--|-----|
| Çizelge 2.1. Nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları | 9 |
| Çizelge 4.1. Farklı trisodyum sitrat/HAuCl ₄ mol oranında üretilen küresel altın nanopartiküllerin özellikleri | 87 |
| Çizelge 4.2. Küresel altın nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler..... | 94 |
| Çizelge 4.3. Farklı HAuCl ₄ miktarında ve farklı ortalama partikül çapında manyetit (Fe ₃ O ₄) ile üretilen Fe ₃ O ₄ /Au nanopartiküllerin özellikleri | 98 |
| Çizelge 4.4. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler..... | 103 |
| Çizelge 4.5. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin (Fe ₃ O ₄ /Au) FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri | 104 |
| Çizelge 4.6. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların özellikleri..... | 116 |
| Çizelge 4.7. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanmış altın nanoçubukların özellikleri. | 121 |
| Çizelge 4.8. Farklı surfaktant türleri ile elde edilen altın nanoçubukların özellikleri..... | 125 |
| Çizelge 4.9. Farklı CTAB miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların özellikleri..... | 127 |
| Çizelge 4.10.Farklı miktarlarda AgNO ₃ kullanılmış altın nanoçubukların özellikleri. | 130 |
| Çizelge 4.11.Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların özellikleri..... | 134 |
| Çizelge 4.12.Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubukların özellikleri..... | 138 |
| Çizelge 4.13.Farklı sıcaklıklarda sentezlenen altın nanoçubukların özellikleri | 141 |
| Çizelge 4.14.Altın nanoçubukların ATR spektrumunda görülen karakteristik | |

| | |
|--|-----|
| pikleri..... | 148 |
| Çizelge 4.15.Oligonükleotit baz dizi | 154 |
| Çizelge 4.16. Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış altın nanoçubuğun (aspect ratio 4.8) eksenel yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri. | 158 |
| Çizelge 4.17.Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve dalga boylarındaki kayma değerleri. | 161 |
| Çizelge 4.18.Farklı derişimlerde MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) eksenel yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri..... | 166 |
| Çizelge 4.19.Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri | 169 |
| Çizelge 4.20.Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış küresel altın nanopartikülün radyal yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri. | 171 |
| Çizelge 4.21.Altın nanopartikül probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri..... | 174 |
| Çizelge 4.22.Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış altın kaplı manyetik (Fe ₃ O ₄ /Au) nanopartikülün radyal yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri. | 178 |
| Çizelge 4.23.Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri..... | 180 |
| Çizelge 4.24.Altın nanoçubuk problemlerinin ve farklı iki prob takılı altın nanoçubuk karışımının eksenel plasmon dalga boyları | 184 |
| Çizelge 4.25.İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının GOR hedefi ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyu ve red-shift | |

| | |
|---|-----|
| değerleri | 185 |
| Çizelge 4.26.İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının MTB hedefi ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri | 187 |
| Çizelge 4.27.GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoçubuk prob karışımının GOR ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri..... | 190 |
| Çizelge 4.28.Altın nanoçubuk ve nanopartikül problemlerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları..... | 191 |
| Çizelge 4.29.GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoprob karışımının GOR ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri | 194 |
| Çizelge 4.30.Altın nanoçubuk ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül problemlerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları. | 196 |
| Çizelge 4.31.Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri | 198 |
| Çizelge 4.32.Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri | 199 |
| Çizelge 4.33.Altın nanopartikül ve Fe ₃ O ₄ /Au nanopartikül problemlerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları | 202 |
| Çizelge 4.34.Nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri | 204 |
| Çizelge 4.35.Nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri | 205 |

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|------|------------------------------------|
| A.R. | : Uzunluk/çap oranı (aspect ratio) |
| DNA | : Deoksiribonükleik asit |
| MTB | : Mikobakterium Tüberkülozis |
| GOR | : Mikobakterium Gordonae |
| N.D | : Altın nanoçubuk (Gold nanorod) |
| SPR | : Yüzey Plasmon Rezonansı |
| EDTA | : Etilendiamintetraasetik asit |
| MPTS | : Merkaptotrimetoksisilan |
| AA | : Askorbik asit |

2. GENEL BİLGİLER

Yunanca'da cüce anlamına gelen "Nano" bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri olup, bir nanometre yaklaşık 2–3 atomun yan yana dizilmesiyle elde edilen uzunluktur. Nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre boyutları arasında olan nanoyapıların araştırılıp, teknolojilerin geliştirilmesidir. Atomik skalada yapılan bu araştırmalar sonucu oluşan gelişmeler insan sağlığında nanoteknolojiden kaynaklanan tekniklerin uygulanmasıyla Nanotıp (Nanomedicine) olarak adlandırılan yeni bir disiplin ortaya çıkarmıştır. Tıpta devrim yaratma potansiyeline sahip yeni bir alan olarak ifade edilmektedir. Bu alanın kalbi, nanometre boyutunda nanoyapıların oluşturulup bunların boyutuna bağlı olarak gösterdikleri çeşitli eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kullanılmasına dayanmaktadır.

Nanopartiküller, yüksek yüzey alanının yanında farklı optik, elektronik, manyetik ve floresan özelliklerinden dolayı birçok uygulama alanına sahip üstün malzemelerdir. Altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller, floresan özellik gösteren yarı iletken nanokristaller (Quantum Dots) ve manyetik nanopartiküller bunlara örnek gösterilebilir. Özellikle medikal alanda çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında kullanılmak üzere tasarlanan biyosensörlerde, tümör hücrelerinin erken teşhis edilmesinde bu nanopartiküllerin optik, floresan ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır.

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tanısı, çevresel kirliliklerin ve biyolojik ajanların belirlenmesi için yüksek seçicilik ve hassasiyette optik nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle Au ve Ag gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Au nanopartiküllerin kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir. Son yıllarda DNA hibridizasyonu, antijen antibadi etkileşimi gibi moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için Au film tabakası yerine Au nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektirik sabiti ve dolayısıyla

refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir Au nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Ayrıca Au ve Ag nanopartiküllerinin partikül boyuna ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermesi nedeniyle birden fazla analitin eş zamanlı tayininde yapıldığı SPR biyosensörleri de geliştirilmektedir.

Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanılarak kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu özelliklerinden dolayı birçok biyomedikal uygulamalarda kullanımı artmaktadır. Bu amaçla manyetik özellik taşıyan (manyetit (Fe_3O_4), maghemit (Fe_2O_3), kobalt (Co), nikel (Ni) gibi) inorganik maddeler ile yüklü sentetik (polistiren, polivinilalkol, poliakrilamid, poliakrilik asit gibi) ve doğal (kitosan, aljinat, dekstran gibi) polimerik partiküller üretilmekte ve bunları ticari olarak bulunabilmektedir. Son yıllarda manyetik çekirdeğin oksidasyonunu önleyerek inert bir yapı oluşturmak ve biyolojik çalışmalara uyumlu hale getirmek için altın, gümüş gibi metalik yapılarla kaplayarak manyetik özellik gösteren altın kaplı nanopartiküller oluşturulmuştur. Böylece birçok biyomedikal uygulamalar da hem altın kabuğun optik özelliğinden hem de manyetik çekirdeğin manyetik özelliğinden yararlanılmaktadır.

Manyetik nanopartiküller; hücre ayrılması ve saflaştırılması, kontrollü ilaç salımı, RNA-DNA saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Klinik teşhis ve tanılarda çok kullanılan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) tekniğinde manyetit (Fe_3O_4), maghemit (Fe_2O_3) gibi inorganik bir madde ve bunların dekstran gibi bir polimerle kaplanmasından oluşan süperparamanyetik nanopartiküller MRI'de sinyal şiddetini artırıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Bu nano yapıların bir tarafına tümör hücrelerinin çok tükettiği bilinen folik asit grupları diğer tarafına da kemoterapi de kullanılan zehir molekülleri bağlanarak nanoboyutta Truva Atı yapıları hazırlanabilmektedir. Tümör hücreleri, yüzeyinde folik asit taşıyan manyetik nanopartikülleri emerken beraberindeki zehir molekülünü de bırakarak sağlıklı hücreler fazla zarar görmeden sadece kanserli hücrelerin öldürülmesi sağlanabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi de kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelerde zarar görmektedir. Bu şekilde manyetik

nanopartiküllerin bu yan etkileri ortadan kaldırmasıyla kanser tedavisinde ümit verici sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca çağımızın hastalığı olan çeşitli kanser hastalıklarının erken teşhis edilmesinde de kanser hücrelerini tanıyabilen spesifik çeşitli biyomolekülleri (peptit, oligonükleotit, enzim ve antibodiler gibi) manyetik nanopartiküllerin yüzeyine immobilize ederek manyetik nanopropolar hazırlanabilmektedir. Bu problemlerin hücre içindeki hedef molekülleri tanıdığına, partiküllerin oraya birikmesi ile MRI sinyal şiddetinde artma olur. Bu teknikle çeşitli kanser hastalıklarının erken teşhis edilebileceği umut edilmektedir. Yüzeyinde kanser hücrelerine spesifik antibodiler içeren manyetik nanopartiküller, kanser hücrelerine yönlendirilerek uygulanan dalgalı manyetik alan etkisiyle bir ısı oluşturulmaktadır. Manyetik ısıtma (Hyperthermia) olarak adlandırılan bu yöntemle de kanser hücreleri öldürülebilmektedir.

Son zamanlarda eşsiz optik ve kimyasal özellikleri nedeniyle bütün ilgiyi üzerine çeken bu nanoyapılardan biri de yarı iletken maddelerden oluşan kuantum noktacıları (Quantum Dot) olarak adlandırılan nanokristallerdir. Mordan koyu kırmızıya kadar gökkuşağının bütün renklerinde ışımaya yapan bu nanokristaller geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kuantum noktacılarının nanoboyutta olmaları, yüksek fotostabiliteye sahip olmaları ve boylarına bağlı olarak ayarlanabilir bir emisyon özelliği göstermeleri gibi özellikler kuantum noktalarının biyolojik, biyomedikal ve biyoanalitik görüntüleme uygulamalarında ideal bir prop olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

“Quantum Dot”lar, periyodik cetveldeki II-VI (CdSe, CdTe, CdS, and ZnSe), III-V (InP ve InAs) ve IV-VI (PbS, PbSe) cı grup elementlerinden sentezlenen yarı iletken maddelerden oluşan monodispers inorganik nanokristallerdir. Bu partiküller yaklaşık 10 -50 atom içeren 2-10 nm boyundaki renkli kristallerdir. Ayrıca bunlar ‘yapay atomlar’ olarak da adlandırılmaktadırlar. Çekirdek ve çekirdek-kabuk yapısında olmak üzere iki tip Qdot yapısı vardır. Çekirdek CdS, CdSe, CdTe gibi maddelerden oluşabilmektedir. Çekirdeği oluşturan madde nanokristalin hangi renkte ışık yayacağını belirlemektedir. Çekirdek/kabuk yapısındaki “Qdot”ların çekirdeği ZnS gibi inorganik bir kabuk tarafından korunmaktadır. Kabuk olarak kullanılacak madde çekirdekte kullanılan maddenin enerji band boşluğundan daha büyük bir band boşluğuna sahip maddeden oluşmaktadır. Kabuğu oluşturan

madde nanokristali stabilize eder, kuantum verimini yani ışığın floresan şiddetini artırır, ışık degradasyonunu azaltır. Bu nanokristaller uygulama alanına göre çeşitli polimerlerle kaplanarak oligonükleotitler, peptidler ve antibadiler gibi biyolojik moleküllerle fonksiyonlandırılarak değişik Qdot problemleri hazırlanabilmektedir.

“Qdot”lar, geniş uyarılma ve dar emisyon spektrumuna sahiptirler. Qdotların çekirdeğinin bileşimi ve boyu değiştirilerek geniş bir aralıkta emisyon spektrumu ayarlanabilmektedir. Dolayısıyla farklı boy ve bileşimdeki nanokristaller tek bir ışık kaynağı altında uyarılarak farklı renklerde ışık yaymaları sağlanabilmektedir. Ayrıca Qdotlar peptitler, antibodiler, nükleik asitler gibi biyolojik moleküllere kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bu özelliklerinden yararlanarak çoklu Qdot problemleri hazırlanarak birden fazla molekül eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Qdotların organik boyalara göre kuantum verimleri (QY) daha iyi yani daha parlak ışık yaymaktadır ve fotokimyasal kararlılığı (photochemical stability) daha yüksektir. Bu özelliklerinden dolayı Qdotlar özellikle uzun süreli ve yüksek duyarlılıkta görüntüleme ve çoklu etiketleme gibi birçok biyolojik uygulamalarda floresan etiket olarak kullanılmaktadırlar. Çoklu analizlerde kullanılacak her bir boyanın tipine bağlı olarak farklı bir ışık kaynağı gerektirmesinden çoklu analizler için uygun değildirler. Her bir boyanın geniş bir emisyon spektrumu vardır. Dolayısıyla farklı organik boyaların emisyon spektrumlarının birbirini kapatmasından dolayı hassas değildirler. Ayrıca organik boyalar uzun süreli floresan özellik göstermezler. Organik boyaların etiket olarak kullanıldığı sistemlerdeki bu tür dezavantajları ortadan kaldıran eşsiz optik ve kimyasal özelliklere sahip QDot’lar çoklu analizler için ideal etiketlerdir.

Yapılan son çalışmalarda hem manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinden hemde Qdot’ların optik özelliklerinden faydalanmak amacıyla magnetofluoresans nanopartiküller (magnetofluorescent nanoparticle) olarak adlandırılan nano hibrid yapılar oluşturulmuştur. Manyetik özellik gösteren bir çekirdek ve bunun etrafında Qdot nanokristalleriyle kaplandığı çekirdek/kabuk yapısındaki bu nano yapıların kanser hücrelerinin belirlenip ayrılması gibi birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Görüldüğü gibi boyut olarak gözle görülmeyecek kadar çok küçük olmalarına karşın işlevleri açısından büyük işler başaran bu nanopartiküllerin biyomedikal alanda daha birçok gelişmeler sağlayacağı bir kaçınılmazdır. Çizelge 2.1’de nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları gösterilmiştir.

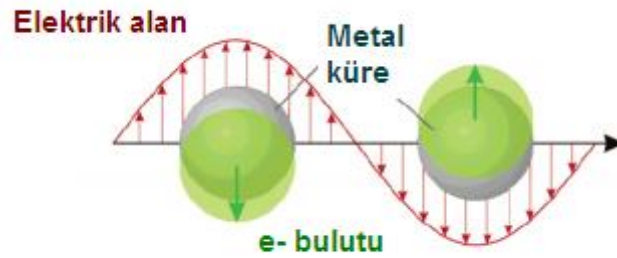
Çizelge 2.1 Nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları (Chen, 2008).

| Nanopartiküller | Örnek | Medikal Uygulamalar |
|------------------------|----------------------------------|----------------------------|
| Metal Nanopartikül | Altın Nanopartikül | Hastalık tanı ve teşhisi |
| | Altın Nanoçubuk | Biyosensör |
| | Altın Nanokabuk | Moleküler görüntüleme |
| | Kuantum Kristalleri | İlaç salımı |
| Manyetik Nanopartikül | Süperparamanyetik demir oksitler | MRI |
| Polimerik Nanopartikül | PLGA | İlaç salımı |
| | PLA-PGA | Protein salımı |
| | | Gen ekspresyon vektörü |

2.1. Metal Nanopartiküller

Metal nanopartiküller, serbest elektronlarının elektromanyetik alanla uyarılmasıyla oluşturdukları lokalize yüzey plasmon rezonansları nedeniyle görünür ve yakın infrared dalga boylarında güçlü optik uyarılma göstermektedirler. Şekil 2.1’de metal bir küredeki plasmon salınımı gösterilmektedir. 1908 yılında küresel altın kolloidleri için Mie tarafından teorik olarak açıklanmıştır. Daniel ve arkadaşları tarafından bu partiküllerin özellikleri ve kullanım alanları, kimyasal modifikasyonu ve sentez yöntemleri özetlenmiştir (Daniel, 2004). Elghanian ve arkadaşları oligonükleotitle fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller, eşleniği olan oligonükleotitle karıştırıldığında renk değişimi ile 10 fmo’l’a kadar tek zincirli oligonükleotit dizilimi belirlemiştir (Elghanian, 1997). Storhoff ve arkadaşları tek bazı farklı olan oligonükleotit dizilimi ısıtarak (melting temperature) yöntemiyle tayin etmişler [Storhoff, 1998]]. Nanopartikül yüzeyine analit molekülü

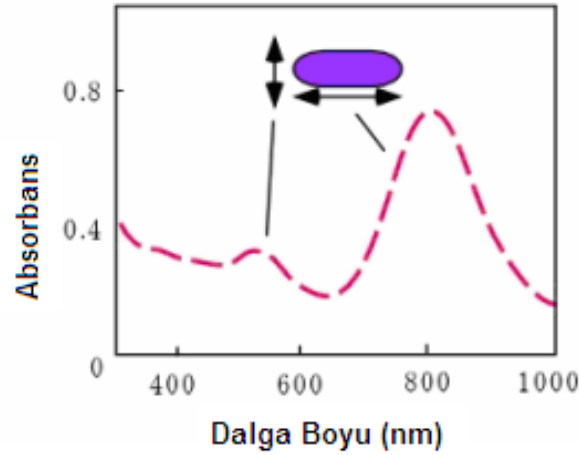
bağlandığında, nanopartiküllerin çevresindeki ortamın dielektrik özelliklerinin değişmesiyle plasmon rezonans dalga boylarında kayma gözlenmektedir. Englebienne, Heves ve arkadaşları nanopartiküllerin bu özelliklerinden yararlanarak partikül yüzeyine bir analit molekülün bağlandığını belirlemişlerdir. Bu basit teknolojiyle 10 nM derişimine kadar etiket içermeyen analitlerin tayin edilebileceği belirtilmiştir (Englebienne, 1998). Ayrıca metal nanopartiküller, mikroskopik etiket olarak kullanılabilir. Altın ve gümüş nanopartikülleri büyük ışık saçılması yapıları ve diğer yarı iletken nanopartiküller ve floroporlar gibi renk solması gibi özellikler göstermemeleri nedeniyle optik görüntüleme uygulamalarında kullanılmaya başlamıştır. Altın nanopartiküllerin en önemli özelliği şekil ve boyutuna bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleridir. Bu özellikleri şekil ve boyutuyla ayarlanabildiği için en önemli biyomedikal uygulamaları dokuların görüntülenebilmesi, tümör bölgesinde altın kabuklu partiküllerin NIR lazer ile uyararak tümörün parçalanması olan fototermal kanser terapisi uygulamalarıdır. Böylece ayarlanabilen plasmon rezonant spektra gösteren altın nanokabuk, nanokafes, nanoçubuk ve nanopartiküller sentezlenerek değişik biyolojik örneklerle fonksiyonlandırılarak kanser tanı ve tedavisinde kullanılabilir.



Şekil 2.1. Metal bir küredeki plasmon salınımı

Altın nanoçubuklar, Şekil 2.2 'de gösterildiği gibi iki farklı plasmon rezonansı göstermektedir. "Transverse" plasmon (TP) nanoçubuğun çapı boyunca uyarılmasına bağlı olarak gösterdiği küresel altın kolloidlerin plasmon rezonansına benzer rezonanstır. Diğer "longitudinal" plasmon (LP) denilen nanoçubuğun uzunluğu boyunca uyarılması sonucu oluşan plasmon rezonansıdır. Nanoçubukların uzunluk/çap oranı denilen "aspect ratio" değeri değiştikçe

plasmon rezonans pikleride değişmektedir. Böylece farklı uzunluk ve çap oranındaki altın nanoçubuklarla görünürden yakın infrarede kadar plasmon rezonans gösteren partiküller elde edilmektedir. Altın nanoçubukların uzunluğu boyuncaki plasmon rezonansı yüksek polaritasyona sahiptir ve diğer altın nanopartiküllerden daha dar bir çizgi genişliğine sahiptir. Bu zellikleri altın nanoçubukların kullanıldığı birçok uygulamada avantajlar sağlamaktadır. Keskin, polarize olmuş NIR rezonansları çoklu biyolojik sensör ve biyomedikal uygulamalarında kullanılabirliğini sağlamaktadır. Ayrıca biyosensör uygulamalarında altın nanoçubuklar aynı boydaki küresel altın nanopartiküllere göre ortamın dielektrik sabitinin değişimini daha yüksek hassasiyette göstermektedir. Altın nanoubuklarından polarize saçılma ile mikroskopik görüntüleme uygulamalarında moleküler skalada oryantasyon bilgileri sağlanabilmektedir. Fototermal terapilerde kk boyuttaki altın nanoçubuklar ile doku içine penetre olmasında ve damarsal tümörlere girmesinde kolaylık sağlanabilmektedir.



şekil 2.2. Kolloidal altın nanoçubukların farklı iki yüzey plasmon bandı. Görünür bölge:520-530nm, enine (Transverse) yüzey plasmon bandı, Yakın İnfrared: 700-1500 nm, boyuna (Longitudinal) yüzey plasmon bandı.

Altın nanopartikülleri çeşitli proteinlerle fonksiyonlandırılarak biyobilimlerde araç olarak kullanılmaktadır. En genel yöntem Fres tarafından geliştirilmiş sodyum sitrat yöntemiyle kolloidal altın nanopartikül sentezidir. Tetrakloraurat denilen altın tuzunun trisodyum sitrat ile kontrollü indirgenmesi yöntemidir. Sitrat sadece

indirgeme ajanı olarak değil ayrıca koruyucu bir grup olarakta fonksiyon göstermektedir. Altın nanopartikül çevresinde negatif yük oluşturarak elektrostatik olarak partiküllerin birbirini çekmesini engelleyerek çökmesini engellemektedir. Ayrıca sitrat tabakası tiyol gibi aurofilik moleküllerle kolayca yer değiştirebilmektedir. Örneğin 10-40 nm boyunda koloidal altınların yüzeyine antibadi molekülleri adsorplanarak histolojide doku örneklerinin farklı bölgelerini biyospesifik etiketliyerek daha sonra elektron mikroskopi ile analizi yapılmaktadır (Liao, 2005).

2.2. Küresel Altın Nanopartiküller

Nanoteknoloji kimya, biyoloji, fizik ve tıp alanlarının birleşimiyle oluşan, analitik ve biyolojik bilimlerde ultrasensitif dedeksiyon ve görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi için giderek artan bir öneme sahip modern bilimin yeni bir dalı olmaktadır. Özellikle fonksiyonelleştirilmiş altın nanopartiküllerin ultrasensitif dedeksiyon ve görüntüleme yöntemleri ile biyoloji ve farmakoloji alanında kullanımı biyotanıma da araştırmacılar için çekici hale gelmektedir; çünkü altın nanopartiküller benzersiz optik özelliklere (örneğin yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve rezonans ışık saçılması gibi), yüzey kaplama çeşitliliğine ve yüksek biyoyumluluğa sahiptir (Daniel, 2004; Niazov, 2004).

Genellikle küçük metal nanopartiküllerin optik özellikleri, elektromanyetik radyasyon olayı ile rezonansa giren yüzey elektronlarının toplu salınımında “Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)” veya “Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR)” olarak da bilinen plazmon rezonansına sahiptir (Myroshnychenko, 2008). Altın için, bu salınım rezonans frekansı yığın yapının dielektrik sabiti tarafından kontrol edilmekte ve elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde yer almaktadır; çünkü nanopartiküller yüksek yüzey alanı hacim oranına sahiptir. Plazmon frekansının lokal çevre ile kendi ara yüzünün dielektrik (refraktif indeksine) sabitine duyarlı hassasiyeti vardır. Bu partiküllerin çevresindeki herhangi bir değişim (yüzey modifikasyonu, kümelenme, ortam refraktif indeksi gibi.) dispersiyonların kalorimetrik değişimine yol açmaktadır. Altın nanopartiküllerin bağlanması (ya da kümelenmesi) plazmonların birleşmesi nedeniyle, sık sık belirgin renk değişiklikleri eşliğinde meydana gelmektedir.

Kalorimetrik sensörlerde kullanılan altın nanopartiküller önemli uygulamalara sahiptir ve yaygın olarak incelenmektedir (Burda, 2005).

Sadece plazmon tarafında ışığın kuvvetli emilimi değil, bunun yanı sıra onların Rayleigh (elastik) saçılmasında önem taşımaktadır. Emilimle karşılaştırıldığında büyük oranda giden ışık saçılmakta ve partiküllerin giderek büyüdüğü gözlenmiştir (Murphy, 2008); çünkü altın nanopartiküllerinden saçılan ışığın plazmon bandları elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile uyum içindedir. Herbir nanopartikülün pozisyonu optik yolla görüntüleme uygulamaları için hazırlanabilmektedir. Altın nanopartiküllerin uyarlanabilen fiziksel özellikleri elektronların ayarlanabilir optik özellikler sunan kollektif salınımlarını etkilemektedir. Bu birçok sayıdaki biyo dedeksiyon uygulamaları içinde uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Altın nanopartiküllerin çok yönlü yüzey kimyası çeşitli biyofonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilmektedir. Amfilik polimerler, silanoller, şekerler, nükleik asitler ve proteinler örnek gösterilmektedir. Ayrıca tiyol gruplarına altın yüzeyinin güçlü bir afinitesi vardır.

Son yıllarda bu çalışmaların bazıları kendi içinde malzemelerin veya alt sınıf nano malzemelerin biyolojik uygulamalarına odaklanarak genel bir bakışla tekrar gözden geçirilmiştir. Burada iyonlar, küçük moleküller, DNA ve protein dedeksiyonu ve hücre analizler, bazı teknik sorunların vurgulanması ve seçilen bir dizi yeni uygulamalar için küresel altın nanopartikül problemlerinin ve altın nanopartikül testlerin hazırlanmasına odaklanılmıştır. Ayrıca görünür bölgede ayarlanabilir absorpsiyon ve NIR (700-1300nm)'a sahip küresel olmayan nanopartiküller, altın çubuklar (AuNRs) ve altın nanokabuklar (AuNS, nano ölçekte üzeri altın kaplı silika ve manyetik nanoküreler) çalışılmıştır (Wang, 2009).

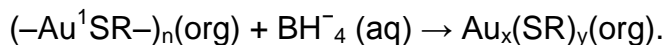
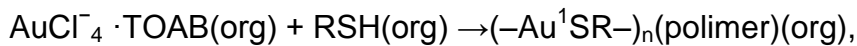
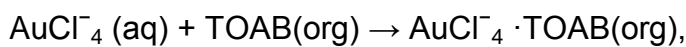
2.2.1. Altın Nanopartikül Problemlerinin Sentezi

Altın nanopartiküller çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ancak monodispersite gerekli olduğunda pratik sınırlamalar görülmektedir. Altın nanopartiküller için bir nm den bir kaç mikrometreye kadar çok sayıda hazırlama yöntemi literatürde yer almaktadır. 10nm'den 150 nm'ye kadar altın hidrosoller elde etmek için saptanan en yaygın uygulanan prosedür altın(III) tuz çeşitlerinin

sitratle indirgenmesi klasik Turkevich-Frens varyasyonlarıdır (Turkevich, 1951; Frens, 1973). Altın nanopartikülün boyutu (10nm ile 140nm arasında) indirgeyici/stabilizör ajan (trisodyum sitrat) ve altın (III) tuz türevleri (hidrojen/sodyum tetraklorat(III)) arasındaki oranla kontrol edilebilmektedir. Bu metot kolaylıkla diğer istenilen ligandlarla (örneğin tiyollenmiş DNA) partikül yüzeylerindeki kabaca kaplanmış sitratların yer değiştirmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Wang, 2009).

Çoğu hidrofobik ve çap boyutları 1 ile 8 nm arasında olan altın nanopartiküller, altın (III) tuz türevlerinin sodyum borhidrat NaBH_4 ile organik bir çözücü içinde ya iki fazlı sıvı/sıvı sistemleri ya da uygun tek fazlı çözücü kullanarak tiyol ligantların varlığında indirgenerek Brust-Schiffirin metoduyla hazırlanmaktadır (Brust,1994). Brust- Schiffirin metodunda tetraklorat (III), tetraoktilamonyum bromid (TOAB) faz transfer ajanı kullanılarak toluene transfer edilir ve dodekanetiyol (DDT) varlığında NaBH_4 tarafından indirgenmektedir. Daha büyük tiyol/altın mol oranları, daha küçük ortalama çekirdek büyüklüğü vermektedir. Hızlı indirgen eklemesi ve çözeltinin soğutulması daha küçük ve tek boyutlu dağılmış partiküller üretimini sağlamaktadır. Brust-Schiffirin metodunu takiben, çok çeşitli fonksiyonelleştirilmiş tiyol ligantlı altın nanopartiküller (AuNP) sentezlenmiştir. Hussain ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiş 5 nm'nin altında örneğin alkil tiyoeter sonlu fonksiyonelleştirilmiş poli(metakrilik asit) gibi tiyoeter ya da tiyol fonksiyonel polimer ligandları kullanarak yüksek oranda tek boyutlu dağılmış altın nanopartiküllerin sulu ortamda tek aşamalı bir yöntemle hazırlanmasını sağlamışlardır (Hussain, 2005). Bu yaklaşımla, partikül boyutu ve partikül dağılımı polimer yapısının, derişiminin ve yoğunluğunun çok küçük değişimleriyle kontrol edilmektedir. Sistematik olarak polimerin altına oranı değiştirilerek nanopartiküllerin boyutları ayarlanabilmektedir ve floresan olmayandan floresan nanopartiküllere geçiş çekirdek çapı 1.7 ile 1.1 nm arasında gözlemlenmektedir.

Brust- Schiffirin prosesi:

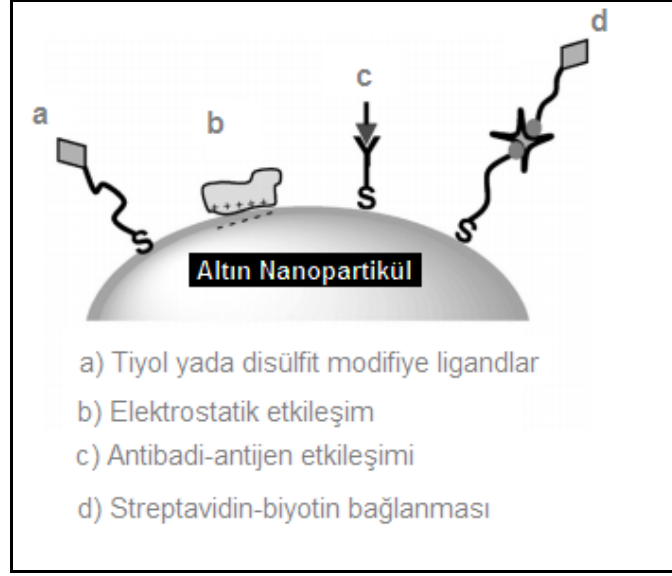


2.2.2. Altın Nanopartikül Problemlerin Stabilizasyonu ve Fonksiyonelleştirilmesi

İleri altın nanopartikül uygulamaları için moleküler tanıma bölgelerinin (örneğin fonksiyonel grupların) nanopartiküllere kararlı bir şekilde yapısı bozulmadan bağlanarak prob nanopartiküller hazırlanmaktadır. Bu aşamada moleküler tanıma bölgeleri aktif halde olup partikül yüzeyine aktif bölgelerinden bağlanmamalıdır. Ayrıca problemler birbirlerine ya da sistemdeki hiç birşeyle non-spesifik olarak etkileşmemelidir. Farklı moleküler tanıma molekülleri takılmış nanopartikül problemleri kullanılarak biyoanalitik çalışmalarda eş zamanlı birden fazla tayin gerçekleştirilebilmektedir. Ancak bu çalışmalarda karşılaşılan problemler araştırılmakta olup altın nanopartiküllerin stabilizasyonu ve fonksiyonlaştırılması çalışmaları halen devam etmektedir. Elektrostatik etkileşim, spesifik tanıma (antibadi-antijen, biyotin-avidin gibi) ve kovalent bağlama (Au-S kovalent) gibi üç tip yöntem yaygın olarak kullanılarak altın nanopartikül problemler hazırlanmaktadır (Şekil 2.3). Ligand moleküllerinin altın nanopartikül yüzeyine elektrostatik etkileşim ya da fiziksel adsorpsiyon yöntemleri ile immobilizasyonu daha basit, az zaman almaktadır. Kovalent immobilizasyon yöntemi elektrostatik etkileşim yöntemine göre daha zor ve karmaşık bir süreçtir. Ancak elektrostatik etkileşimle immobilizasyonda bağlanma yeterince kuvvetli olmadığı için bazı biyolojik çalışmaların daha ileri safhalarında inkübasyon koşulları ve yıkama aşamalarında yeterli bağlanma sağlanamamaktadır. Proteinleri oksidasyondan korumak için küçük yüksüz ve iki tiyol grubu içeren ditiyotretol molekülü, DNA hibridizasyon çalışmalarında ise yüksek tuz derişimi içeren tampon çözeltilerinin kullanıldığı şiddetli deneysel koşulları gerektiren bazı biyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Bu şekildeki biyolojik çalışmalarda bu tarz tampon çözeltisi ile uzun süre inkübasyonda altın nanopartikül problemler ve analitler arasında spesifik olmayan güçlü etkileşimler tayinin seçiciliğini azaltmaktadır.

Elektrostatik etkileşim ya da fiziksel adsorpsiyonla immobilizasyon teknikleri karşılaştırıldığında kovalent bağlanma tekniğinin daha kompleks olmasına karşın ligandların altın nanopartikül yüzeyine kovalent bağlanması daha iyi kararlılık ve sağlamlık göstermektedir. Örneğin; yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve kaynama sıcaklığı gibi koşullarda da kararlılık devam etmektedir. Ayrıca tiyol, fosfin ve amin grupları içeren moleküller tarafından olan saldırılara bir ölçüde engel

olabilmektedir. Yüksek kararlılıkta testler gerektiren birçok uygulama alanında kovalent olarak immobilizasyon tekniği tercih edilmelidir. Ligandların altın nanopartikül yüzeyine immobilizasyonunda en çok altın-tiyol (Au-S) kovalent bağ oluşumu tekniği kullanılmaktadır. Partikül yüzeyindeki altın atomları ile ligand arasında altın-tiyol kovalent bağının oluşturulması için tiyol, disülfid, tiyolester gibi sülfür içeren ya da sülfür takılmış ligandlar kullanılmaktadır. Altın nanopartikül yüzeyine alkantiyolatlar, glutatyon, tiyopronin, tiyollü poli etilen glikol, tiyol ya da disülfitle modifiye edilmiş DNA, peptit gibi değişik moleküller takılabilmektedir. Alkil bazlı tek tabaka protein denaturasyonuna neden olmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak içinde özellikle nanopartikül-protein ara yüzeyinde bir tetra(etilen glikol) uzatma kolu kullanılmaktadır. Son zamanlarda aptamer-altın nanopartikül problemlerine dayalı biyosensör uygulamalarına olan ilgi artmaktadır. Aptamer, tanınacak hedef analitlere yüksek afinite ve seçicilikte bağlanabilen tek zincirli DNA veya RNA molekülüdür. Aptamerler, SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) adı verilen ligandların in vitro olarak eksponansiyel zenginleştirilmesi yöntemiyle oluşturulmaktadır. Aptamerle fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller proteinler, metal iyonları ve küçük organik bileşikler gibi birçok analitin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Zhou ve arkadaşları altın nanopartikül ve aptamer ile pseudo sandaviç yapısı oluşturarak adenosin gibi küçük molekülleri SPR spektroskopisi yöntemiyle tayin etmişlerdir (Wang, 2008). Oligonükleotit ve proteinlere spesifik yüksek afinite gösteren biyolojik moleküller ile nanopartikülleri fonksiyonlandırmak en çok uygulanan yöntemlerden biridir. Örneğin, streptavidinle fonksiyonlandırılmış altın nanopartikülleri biyotinli proteinler ya da oligonükleotitlerin, protein A ile fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller değişik immunoglobulinlerin değişik Fc kısımlarının, karbonhidrat modifiye edilmiş partiküller ise yüksek afinite gösterdikleri proteinlerin tayin edilmesinde kullanılmaktadır. Bu moleküller arasındaki yüksek bağlanma sabiti nedeniyle büyük avantajlar sağlamaktadır (Wang, 2009).



Şekil 2.3. Altın nanopartikül problrarı oluşturma yöntemleri

2.2.3. Altın Nanopartikül Problrarının Kullanım Alanları

Altın nanopartikül problrarı analitik ve biyolojik bilimlerde daha çok kimyasal sensör ve görüntüleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Mirkin ve arkadaşları nanopartiküllerin agregasyonu sonucu renk değiştirmeleri özelliğinden yararlanarak tek zincirli oligonükleotit takılı altın nanopartikülün eşlenik oligonükleotit ile etkileşimini oluşturan renk değişiminden belirlemişlerdir. Mirkin tipi renk değişimine bağlı tanı sistemleri altın nanopartiküllere geniş bir uygulama alanı açmıştır. Daha sonra metal iyonları, küçük organik bileşikler, proteinler, nükleik asitler ve hücreler gibi birçok hedef molekölü tayin edebilen çeşitli altın nanopartikül esaslı tanı sistemleri geliştirilmiştir (Mirkin, 1996).

2.2.3.1. Ağır Metal Katyonlarının Belirlenmesi

Pb^{2+} , Cr^{2+} ve Hg^{2+} gibi ağır metal iyonları çevre ve insan sağlığı için büyük tehlike oluşturan maddelerdir. Lu ve grubu, altın nanopartikülleri DNAz enzimi ile modifiye ederek ağır metal katyonlarını yerinde, eş zamanlı, herhangi bir etiket gerektirmeyen hızlı ve basit bir şekilde tayin edecek kalorimetrik sensör geliştirmişlerdir. Hg^{2+} iyonları timin-timin bazının yanlış eşleşmesini indüklemektedir. Liu ve Mirkin grubu ortamdaki Hg^{2+} iyonlarının timin- Hg^{2+} -timin baz çifti oluşturmaya dayanan duyarlı ve seçici herhangi bir enzim gerektirmeyen

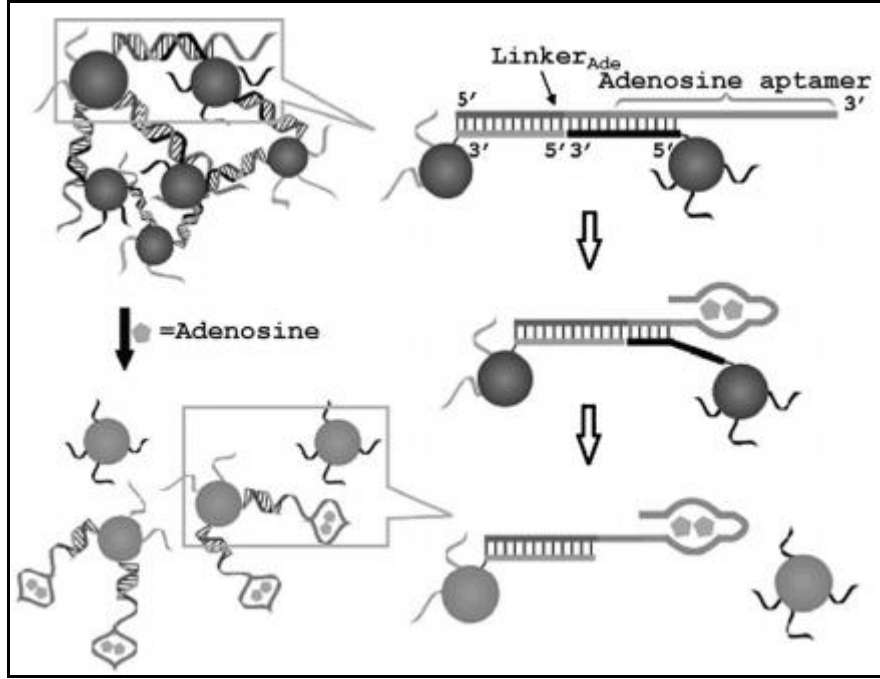
sıcaklık kontrollü kalorimetrik bir sensör oluşturmuşlardır. Hg^{2+} iyonlarının derişimi DNA-altın nanopartikül agregatının bozulma sıcaklığında çözelti rengindeki değişimle belirlenmiştir (Wang, 2009).

2.2.3.2. DNA Tayini

DNA tayini için altın-nanopartikül esaslı kalorimetrik metotlar geniş çaplı kullanılmış ve literatürde çok fazla yer almaktadır. Au nanopartikül esaslı DNA tayini için yeni teknikler geliştirilmeye başlanmıştır. Mirkin ve arkadaşları, çift sarmal genomik DNA'yı tayin edebilmek için biyo barkod tanı sistemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemle biyolojik silah ajanları doğru ve hızlı bir şekilde tayin edilebileceği belirtilmiştir (Mirkin, 2007). Fan ve arkadaşları "chronocoulometry" DNA sensörü (CDS) tasarlayarak sandaviç stratejisi izlenerek hedef DNA'yı tayin etmişlerdir. Altın elektrod yüzeyine prob DNA immobilize edilip hedef DNA ile hibridizasyonunu izlemek için haberci DNA altın nanopartikül ile etiketlenmiştir. Hibridizasyon sonucu altın nanopartiküller elektrod yüzeyine yakınlaşmıştır. "Chronocoulometry" elektrod yüzeyindeki DNA dizilimine elektrostatik olarak bağlanmıştır (Fan, 2007).

Dong ve arkadaşları, DNA hibridizasyonunu yüksek hassasiyette elektriksel yöntemle tek duvarlı karbon nanotüp (single-walled carbon-nanotube) yapısı ile haberci DNA'ya konjuge edilmiş altın nanopartiküller ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemle femtomolar gibi çok küçük miktarlara kadar tayin gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Dong, 2008).

Hedef molekölü yüksek hassasiyet ve seçicilikte tayin etmek için aptamer konjuge edilmiş altın nanopartikül esaslı sensörler de geliştirilmiştir. Liu ve arkadaşları, adenosine yüksek affinite gösteren aptameri kullanarak iki tip DNA ile fonksiyonlandırılmış altın nanopartikülleri ile etkileştirilmiştir (Şekil 2.4). Aptamer ve altın nanopartikül yüzeyindeki DNA dizilimi hibridize olup daha sonra adenosin molekölü ilave edilerek aptamerin adenosine olan yüksek affinitesiyle yapı değiştirerek altın nanopartikül yapısı ortamdaki ayrılarak renk mordan kırmızıya geçmiştir (Lui, 2007).



Şekil 2.4. Aptamer konjuge edilmiş altın nanopartikül esaslı sensörler.

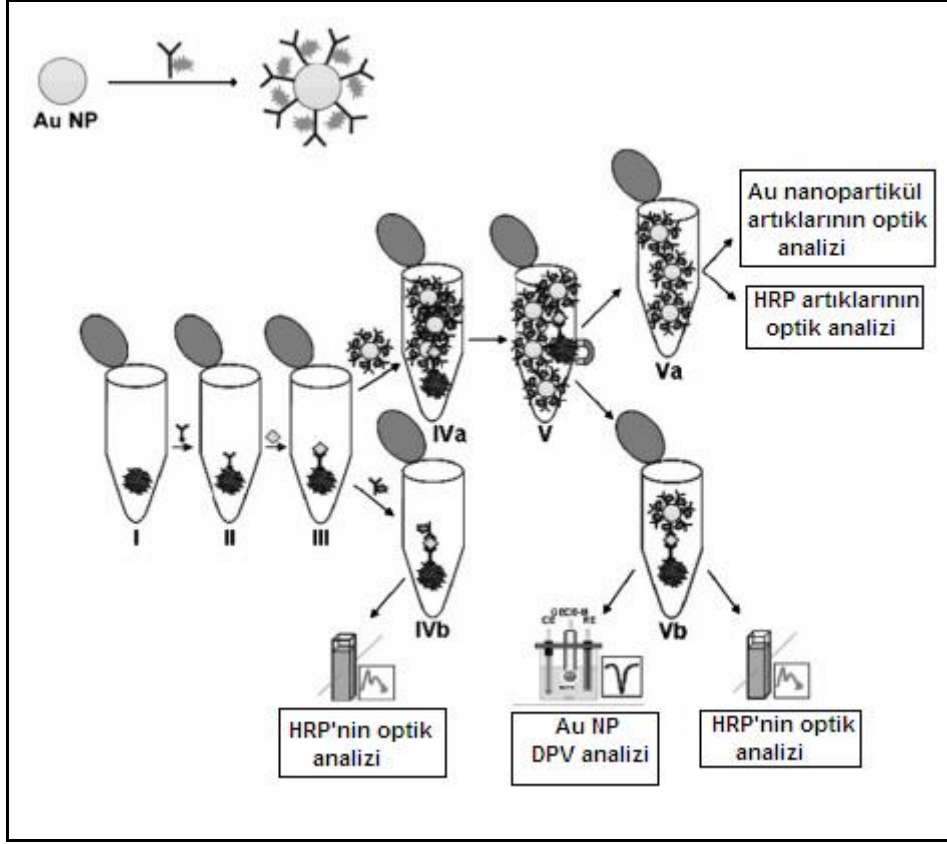
2.2.3.3. Protein Analizi

Biyolojik örneklerdeki proteinlerin görüntülenmesi için antibadi konjuge edilmiş altın nanopartikülleri ışık ve elektron mikroskopunda çok kullanılmaktadır. Altın-protein yapıları biyoanalitik tanı ve teşhis, immunohistokimyasal uygulamalarda prob olarak kullanılmaktadır.

Maier ve arkadaşları, optik rezonans artırmalı absorpsiyon esaslı alerji yapan maddeleri tayin etmek için immunoçip biyosensörleri geliştirmişlerdir. Bu yöntemle sandaviç yapı oluşturarak herhangi bir okuma cihazı gerektirmeden, hızlı ve basit bir şekilde çıplak gözle immunokimyasal bağlanma gözlemlenmiştir (Maier, 2008).

Ambrosi ve arkadaşları, altın nanopartiküllerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini birlikte kullanarak protein tayini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.5). Anti-insan IgG peroksidaz (HRP) altın nanopartikülleri ile etiketlemişlerdir. Antijen-antibadi bağlanması sonucu manyetik altın nanopartikülleri sandaviç yapı oluşturarak altın

nanopartikülün hem optik hem de elektrokimyasal özelliğinden faydalanarak karakterizasyon yapılarak protein tayini gerçekleştirilmiştir (Ambrosi, 2007).



Şekil 2.5. Altın nanopartiküllerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini birlikte kullanarak protein tayini.

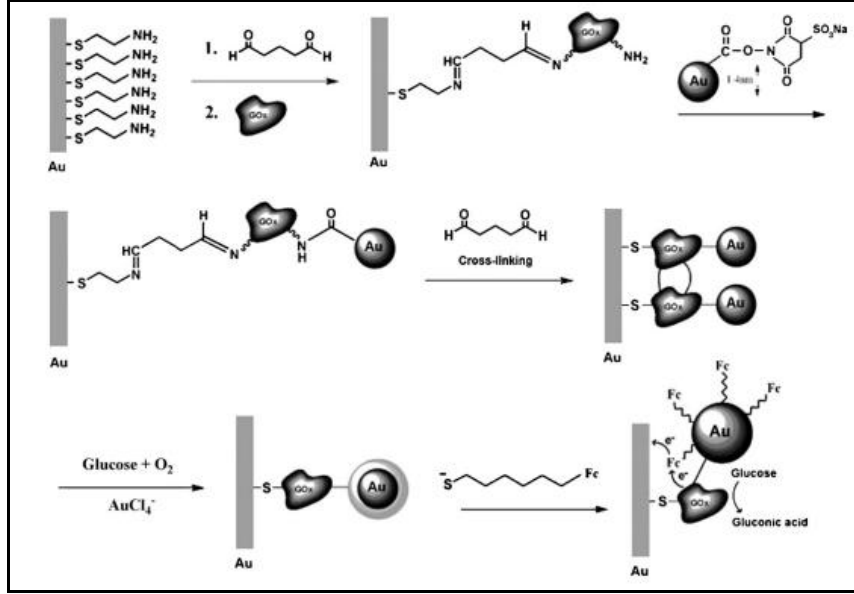
Karbonhidrat-protein etkileşimi canlı organizmalardaki biyolojik prosesler hakkında önemli bilgilerin yanı sıra biyomedikal önemli ajanların geliştirilmesini sağlamaktadır. Russell ve arkadaşları, tiyol modifiye edilmiş basit şekerleri altın nanopartikül yüzeyine takarak bu şekildeki glikonanopartikülleri lektin ve konkavalin A gibi proteinlere bağlanan karbonhidratları belirlemek için kalorimetrik probolar olarak kullanmışlardır (Russell, 2007).

Dong ve arkadaşları, trombine yüksek affinite gösteren aptamer altın nanopartiküllere konjuge edilerek kalorimetrik sensör geliştirmişlerdir. İnsan plazması gibi kompleks biyolojik örneklerdeki hedef molekül yüksek seçicilik ve hassasiyetle bu eknikle tayin edilebileceği bildirilmiştir (Dong, 2008).

2.2.3.4. Enzimatik Aktivite Tayini

Enzimatik aktivitenin ve kinetik parametrelerin yüksek hassasiyette belirlenmesi yeni farmasötik ve medikal teşhis ve tanı cihazlarının geliştirilmesinde önemli bir parametredir. Enzim bağlı immunolojik tanı sistemi olan ELİSA yönteminde iyi kalitede antibadi üretilmesi gerekmekte ve uzun zaman kaybedilmektedir. Araştırmacılar bu dezavantajları ortadan kaldırmak için altın nanopartiküllerin optik ve elektronik özelliklerini içeren yeni yöntemler geliştirilmesine yönelmişlerdir.

Genellikle enzim aktivitesini tayin etmek için radyoaktif ya da floresan etiketler kullanılmaktadır. Mirkin ve arkadaşları, enzimatik aktivitenin incelenmesi ve izlenmesinde altın nanopartiküllerin kalorimetrik indikatör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Mirkin, 2007). Willner ve arkadaşları, altın elektrod yüzeyine glikoz molekülü glikoz molekülüne de altın çekirdek partikül takmışlardır. Glikoz molekülün okside olması sonucu glukonik asit ve H_2O_2 molekülü oluşmaktadır. H_2O_2 molekülü de $AuCl_4^-$ molekülü için indirgeyici bir ajandır. Elektrod yüzeyindeki glikozun oksidasyonu sonucu oluşan H_2O_2 altın çekirdek moleküllerini indirgeyerek altın yüzeyine daha fazla altın metalinin çökmesiyle altın çekirdek yapı büyümeye başlamıştır. H_2O_2 miktarı glikoz derişimi ile kontrol edilmektedir. H_2O_2 miktarı da altın nanopartikülün büyümesini kontrol etmektedir. Şekil 2.6'da gösterildiği gibi biyokatalitik dönüşüm optik ve elektrokimyasal olarak altın nanopartikülün gelişimi ile izlenmiştir (Willner, 2008).



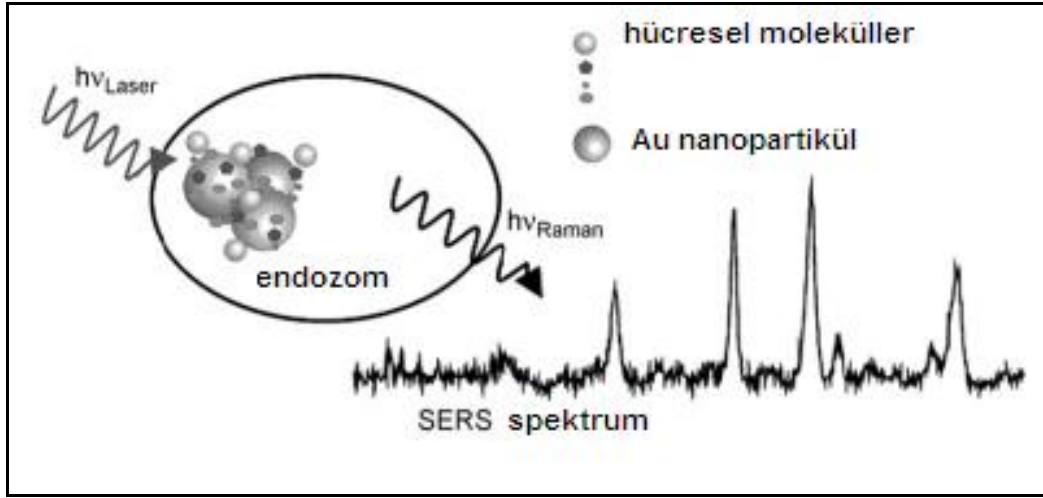
Şekil 2.6. Biyokatalitik dönüşümün altın nanopartiküller ile izlenmesi.

2.2.3.5. Hücresel Analiz

Altın nanopartiküllerin eşsiz optik özellikleri, kolay sentezlenip fonksiyonlandırılabilmesi ve biyouyumlu olması gibi avantajları nedeniyle hücre içi teşhis ve tanı uygulamalarında çok kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinin erken ve doğru teşhisi eskiden pahalı cihazlarla uzun sürede tayin edilmekteydi. Tan ve arkadaşları, kanser hücreleri direk olarak kalorimetrik yöntemle belirlemiştir. Kanser hücrelerine yüksek affinite gösteren aptamerler ile altın nanopartikülleri fonksiyonlandırılıp, hedef hücre ile örnek etkileşimi sonucu çok farklı bir renk değişimi olurken diğer hücreler de herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemiştir. Bu yöntemle herhangi bir cihaza gerek kalmadan sadece absorbans ölçümü ve çıplak gözle yüksek hassasiyette teşhis yapılmıştır (Tan, 2008).

Son zamanlarda hücresel analiz için altın yapılar içeren SERS optik sensörleri geliştirilmiştir. Hücresel SERS sinyalleri hücresel yapının moleküler bileşimi ve lokal pH gibi diğer kimyasal özellikleri hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2.7). Kneipp ve arkadaşları, canlı epitelyum ve makrofaj hücrelerdeki endozomdan SERS spektrumlarını ölçmüş ve hücrelerdeki altın nanopartiküllerin özelliklerini incelemiştir. Farklı hücre hatlarındaki nanoyapılardan farklı SERS spektrumları

elde edilerek o hücre içindeki ilgili molekülün fiziksel özelliği tanımlanmıştır (Kneipp, 2005; Kneipp, 2006 Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Endozom içindeki hücresel moleküllerin SERS spektrumu.

2.3. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller

Manyetik demir oksit nanopartikülleri biyotıp alanında çok kullanılan bir malzeme haline gelmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin yüksek manyetik momente sahip olmaları, toksik olmamaları ve kolay sentezlenebilmeleri gibi avantajları nedeniyle protein ve enzim immobilizasyonu, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), DNA belirlenmesi ve hibridizasyonu, biyolojik tanı, hedefli ilaç salımı ve gen terapisi gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanılarak kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu özelliklerinin yanı sıra fiziksel ortamlarda kararlılığını koruması ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere yüzeyine biyolojik bir molekül takılabilmesi için polisitiren, polietilen glikol, polivinil alkol ve kitosan gibi değişik doğal ve sentetik polimerler ile fonksiyonlandırılarak kompozit yapıları oluşturulmaktadır. Son yıllarda bu partiküllere yeni özellikler kazandırmak, inert bir yapı oluşturmak, manyetik çekirdeğin oksidasyonunu önleyerek manyetik özelliğini kaybetmeyecek inert bir dış kabuk oluşturmak için yeni arayışlar içine girilmiştir. Bunun sonucunda altın, gümüş gibi metalik yapılarla kaplı manyetik nanopartiküller ortaya çıkmıştır. İlk olarak 2001 yılında Cui ve arkadaşları bu yeni kompozit partikülleri sentezlemişlerdir (Cui, 2005).

Altın hem insan hem hayvan uygulamaları için toksik olmaması, biyouyumlu olması, kimyasal kararlı olması ve yüzey plasmon özelliğinden dolayı UV-görünür bölgede bir absorpsiyon bandı göstermesi gibi özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen kabuk malzemesi olmuştur. Ayrıca enzim, protein, DNA gibi biyolojik moleküller altın yüzeyine kovalent olarak daha güçlü bağlanabilmektedir. DNA ya da antibiyo gibi biyolojik moleküller manyetik-Au nanopartiküllerine direkt olarak bağlanamazlar. Geleneksel bağlanma yöntemleri temel olarak ikiye ayrılır. Birincisi biyotininlenmiş DNA kullanılarak avidinle aktive edilmiş manyetik-Au nanopartiküllerine bağlanma sağlanır. Diğer yöntem ise altının tiyole olan afinitesinden faydalanarak tiyol modifiye edilmiş DNA gibi biyolojik moleküllerin kullanılmasıdır. Bu yöntem diğerine göre daha az zaman ve emek gerektirmektedir. Böylece altın kabuğunun biyolojik uygulamalara uygun olması, gösterdiği optik özelliği, manyetik çekirdek partikülün manyetik özelliği nedeniyle hem altının hem de manyetitin özelliklerinin birlikte kullanılabilmesi çok fonksiyonlu partiküller ortaya çıkmıştır (Sun, 2010).

2.3.1. Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemleri ve Uygulama Alanları

Altın kaplı manyetik nanopartikül üretimi manyetik çekirdek ve altın kabuk olmak üzere iki ana prosesten oluşmaktadır. Altın kaplı manyetik nanopartikül sentez yöntemleri ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi manyetit partikülleri ve bunun etrafını kaplıyacak altını içeren sabit reaktörler şeklindeki ters misel yöntemidir. Ters misel yönteminde verim düşük, üretim zordur. İkinci yöntem ise hem magnetite nanopartiküllerin hemde kaplama işleminin sulu fazda gerçekleştirilmesidir. Demir tuzlarının alkalik bir ortamda ikili çöktürülmesiyle oluşturulan manyetit nanopartiküllerinin kloraurik asit ile indirgenerek altın kaplamanın oluşturulmasıdır. Bu su fazlı metot basit, hızlı ve üretilen partiküller su içinde dağıtılabilmektedir. Bu yöntemde partikül boyu, altın kabuk kalınlığı çok zor kontrol edilebilmektedir. Ayrıca altın ile kaplanmış partiküller ile kaplanmamış manyetit nanopartiküller aynı örnek içinde bulunup birbirinden ayrılması problem oluşturmaktadır. Diğer bir üçüncü yöntemde manyetit sentezi ve altın kaplamanın organik fazda yapılmasıdır. Demir (III) oleatın ısı bozulmasıyla oluşan manyetit nanopartiküllere kaplayıcı bir ajan varlığında altın asetatın indirgenmesiyle kaplama gerçekleştirilmiştir. Organik metot da partikül boyu ve altın kabuk kalınlığı

kontrol edilebilirken manyetik özellikleri az olup sulu çözelti fazına geçtiklerinde çökme göstermektedirler. Ayrıca kullanılan çözücüler çevre dostu olmayıp büyük ölçekte sentez de problem oluşturmaktadır. Partikül boyutunu kontrol edip bulunduğu sulu ortamda kararlılığını sağlamak için manyetik özellikteki çekirdeğin organik fazda altın kaplama işleminin sulu ortamda yapıldığı sentez yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde partikül boyutu çok iyi kontrol edilirken tamamen kaplama işlemi bir derecede başarılı olup kararlılığının sağlanması tam olarak keşfedilememiştir.

Manyetit nanopartikül yüzeyini tamamen kaplamayacak şekilde altın nanopartiküllerin bağlandığı altın-manyetit kompozitleri oluşturulmuştur. Bu kompozitler, protein ayırma, optik görüntüleme ya da kataliz gibi tam kaplama gerektirmeyen uygulamalar için kullanışlı yapılardır. Bu tarz kompozitler amin ya da tiyol grupları gibi fonksiyonel molekülleri taşıyan manyetit nanopartikül yüzeyine altın nanopartiküllerin kovalent ya da gama ışınları uyarılmasıyla bağlanarak hazırlanmaktadır. Bu yöntemle kompozit yapıların kararlılığını sağlayabilecek derecede manyetit yüzeyine bağlanan altın nanopartikülü kontrol edememektedir. Tamamen altın nanopartikül ile kaplanmamış kompozitler manyetit çekirdeğin bozulması ya da okside olması nedeniyle çok kısıtlı çevrelerde kullanılabilir. Özellikle partiküllerin bir araya gelip aglomerasyon oluşturduğu kan damarlarının tıkanması gibi istenmeyen durumların meydana geldiği in vivo uygulamalarda partikül aglomerasyon kararlılığı çok önemlidir. Demir oksit kararlılığını etkileyen partikül boyu, yüzey fonksiyonallitesi, pH ve iyonik güç gibi parametreler bilinmekte olup, Au-Fe₃O₄ kompozitler için aglomerasyon kararlılığının detayları henüz bilinmemektedir.

Goon ve arkadaşları 50-150 nm aralığında manyetit-altın kompozitleri sentezlemişlerdir. İkili çöktürme yöntemiyle hazırlanan manyetit nanopartiküllerin yüzeyini biyouyumlu polietilenimin ile kaplayarak 2 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin bu yüzeye bağlanmasını gerçekleştirmişlerdir. PEI ile partiküllerin aglomerasyona karşı kararlılığını sağlarken altın nanopartiküllerin manyetit yüzeyine bağlanmasıyla manyetit çekirdeğin kimyasal saldırılarına karşı koruyucu bir tabaka oluşturmuştur (Goon, 2008).

Pham ve arkadaşları sitrat indirgeme ajanını kullanarak 15-40 nm boyutunda altın kaplı manyetik nanopartiküller sentezlemişlerdir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının güçlü bir alkalın çözeltisi ile ikili çöktürülmesi sonucu oluşturulan manyetit çekirdeği sitrat ile stabilize edilip altın tuzunun ilave edilmesiyle kaplama gerçekleştirilmiştir. Sentezledikleri bu partikülleri IgG proteinini biyolojik ayırma işleminde kullanmışlardır (Pham, 2008).

Wang ve arkadaşları, yetişkin bir sıçanın omiriliğinden izole edilmiş sinir kök hücrelerine manyetik altın kaplı nanopartikülleri yükleyerek manyetik rezonans görüntüleme kontrast artırıcı olarak kullanılabilmesini araştırmışlardır. 20 hücreye bu partiküller ile etiketledikten sonra sıçanların omiriliğine yerleştirilerek 48 saat ve bir ay sonra MRI ile izlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda altın kaplı manyetik nanopartiküllerin güçlü kontrast artırıcı özellik gösterdiklerini ve nakledilen hücrelerin uzun dönem in vivo izlenmesi için güzel MRI etiketleri olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Wang, 2006).

Liu ve arkadaşları, polyol prosesi ile eş boyutlu altın kaplı manyetik nanokristalleri sentezlemişlerdir. Bu nanokristallerin hücre ayırması ve saflaştırılması gibi biyomedikal uygulamalar da kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Yüzeyi karboksil gruplarıyla fonksiyonlandırılmış Fe_3O_4 -Au nanokristallerine karbodimid aktivasyonu ile FITC'li streptavidin immobilize etmişlerdir. Hücre karışımları içinden biyotinli anti CD^{4+} antibadisi bağlanmış hücrelere yüksek seçicilik ve verimde bağlanarak hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Bu şekilde sıçan dalağından izole edilmiş CD^{4+} T lenfositlerine bu partiküllerin bağlanabilirliği test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu partiküllerin bütün dalak hücrelerinden CD^{4+} T lenfositlere yüksek seçicilikte bağlandığını göstermiştir. Böylece bu nanokristallerin, hücre ayırma işlemleri için kullanışlı araçlar olabileceği ayrıca çeşitli hastalıkların tanısı, izlenmesi ve tedavisini içeren biyomedikal uygulamalarda kullanılacak potansiyel malzemeler olabileceği belirtilmiştir (Liu, 2008).

Pita ve arkadaşları, kobalt ferit nanopartiküllerini sentezleyip, altın tuzunun tekrarlamalı indirgenmesiyle eş boyutlu suda dağılılabir 21-29 nm aralığında altın kaplı manyetik nanopartikülleri elde etmişlerdir. Tiyol modifiye edilmiş peptid nükleik asit oligomerleri ile bu partiküller fonksiyonlandırılarak çözeltideki hedef DNA molekülü ile hibridizasyonu Rodamin 6G floresan etiketi ile incelenmiştir. Tek

nükleotit mutasyonunda araştırılarak çok zaman alan DNA genotipleme çalışmaları için biyosensör çalışmalarında bu partiküllerin kullanılabilceği bildirilmiştir (Pita, 2008).

Mandal ve arkadaşları, 13 nm boyutunda misel çözeltisinde Fe_3O_4 nanopartiküllerini sentezleyip stabilitesini korumak ve okside olmasını önlemek için altın, gümüş gibi metallerle kaplamışlardır. Fe_3O_4 nanopartiküllerini toksik olmayan glukoz indirgeme ajanı ile kaplayarak $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-Au_{\text{ kabuk}}$ ve $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-Ag_{\text{ kabuk}}$ yapısında partiküller elde etmişlerdir. Çeşitli yöntemlerle karakterize edilerek manyetik özellikleri incelenmiştir. Bu partiküllerin MRI ve DNA sensörü gibi uygulamalarda kullanılabilceği belirtilmiştir (Mandal, 2005).

Pradhan ve arkadaşları, sonokimyasal metot denilen ultrasonik ses dalgalarıyla altın-manyetit nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Belli derişimde tetrakloraurat altın tuzu çözeltisinden 20 dakika argon gazı geçirilip, metanol, dietilenglikol ya da oleik asit ilave edilip metanol içinde dağıtılmış manyetit nanopartiküllerini ekleyerek argon gazı geçirilmiştir. Bu karışımı su soğutmalı ceket içeren reaktör içinde belli bir süre sonike ederek altın-manyetit nanokompozitleri elde etmişlerdir. Bu yeni partiküllerin biyomedikal, elektronik, optoelektronik, magnetoptik ve sensör uygulamalarda kullanılabilceğini belirtmişlerdir (Pradhan, 2008).

Jeong ve arkadaşları, maghemit (Fe_2O_3) nanopartiküllerini sentezleyerek etrafında altın kabuk oluşturmak için altın tuzunu hidroksilamin ile indirgemişlerdir. Altın kaplı bu manyetik partiküllerin yüzeyine karboksil içeren alkil tiyol grubu olan merkaptohexzadekaniok asit (MHA) immobilize ederek pozitif yüklü hekza-argin esteraz (Arg_6 -esterase) enzimi ile etiketlemişlerdir. Esteraz enzimi takılmış bu altın kaplı manyetik partikülleri ile p-nitrofenol butirat olan renkli substratının kopma (dissociation) hızı izlenerek enzim aktivitesi incelenmiştir. Enzim immobilize partiküller substrat çözeltisiyle etkileştirilip UV-görünür bölge spektrumu ile p-nitrofenol butirat ürününün kopma hızı izlenmiştir. Enzim immobilize partiküller manyetik olarak ayrılıp tekrar yeni bir substrat çözeltisi ile etkileştirilerek tekrar tekrar bu partiküllerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda her bir manyetik ayırmadan sonra enzim immobilize edilmiş altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hiçbir enzim aktivitesinde kayıp olmadan tekrar tekrar kullanılabilceğini gözlemlemişlerdir (Jeong, 2006).

Polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen hem amino hem imin gurpları içeren katyonik polimerlerle de elektrostatik olarak manyetik-altın nanopartikülleri kaplanabilmektedir. Sun ve arkadaşları, PEI modifiye edilmiş Fe_3O_4 -Au nanopartikülleri sentezleyerek bunlarla memeli hücrelerinden genomik DNA'nın yüksek verim ve saflıkta ekstraksiyonu ve DNA'nın serbest bırakılmasını başarmışlardır (Sun, 2010).

Cui ve arkadaşları, altın kaplı manyetik nanopartikülleri sentezleyerek IgG ve IgM antibadilerini partikül yüzeyine immobilize etmişlerdir. Kan içindeki HBV antijenini belirlemek için bunları katı faz substrat olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda bunları immunolojik ve affinite esaslı tayinler için yeni bir substrat olabileceklerini belirtmişlerdir (Cui, 2005).

Manyetik altın kaplı nanopartiküller in vivo gen ve ilaç salımı uygulamalarında taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Jafari ve arkadaşları, ters misel yöntemiyle sentezledikleri manyetik-altın nanopartikülleri ilaç salımı ve MRI için biyouyumlu poligliserol ile kaplamışlardır. MTT ile hücre toksitesi ve manyetik özellikleri incelenerek biyomedikal uygulamalar için uygun taşıyıcı olabilecekleri bildirilmiştir (Jafari, 2010).

Silva ve arkadaşları, mikroemülsiyon yöntemi ile 9nm boyunda demir oksit nanopartikülleri sentezleyip indirgeme ajanı olarak glikozu kullanarak altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Yeni bir altın çekirdek oluşumundan kaçınarak altın kabuğun oluşumunu kontrol ederek çeşitli yöntemlerle karakterize ederek kaplama sonucunda manyetik özelliğinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (Silva, 2010).

Süperparamanyetik demir nanopartikülleri (SPION), hücre etiketleme ve ayırma, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç salımı ve manyetik hypertermia gibi biyomedikal uygulamalarda çok kullanılmaktadır. Bu partikülleri altın ile kaplayarak ve biyolojik moleküller ile fonksiyonlandırarak oluşturulan çok fonksiyonlu bu yapılar birçok biyomedikal uygulama için çeşitli fırsatlar sunmaktadır. Suda dağılan altın kaplı demir oksit nanopartikülleri genellikle manyetik çekirdek yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidrosilamin ya da sitrat ile tekrarlı indirgenmesiyle elde edilmektedir. Lu ve arkadaşları sitratla Au^{3+} iyonlarını manyetik nanopartikül çekirdekleri

yüzeyinde indirgeyerek altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Bu partiküllerin manyetik özelliklerini inceleyerek saf altın nanopartikül herhangi bir manyetik özellik göstermezken, altın kaplı manyetik partiküllerin süperparamanyetik özellik gösterdiğini belirterek bu partiküllerin manyetik ayırma ve saflaştırma gerektiren biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Lu, 2006).

Küresel şekilde altın kaplı manyetik nanopartiküllerin yanı sıra elipsoid şekilde altın kaplı manyetik nanopartiküllerde oluşturulmaktadır. Bu yeni şekildeki partiküllerin hem nanoçubuk hem de nanokabuğun optik özellikleri çok ilgi çekicidir. Bu yapılar hem aksenel hem de radyal plasmon göstermektedir. Kabuk kalınlığı değişirken aksenel plasmon sabit kalırken radyal plasmon kabuk kalınlığı arttıkça azalmaktadır. Bu nanopirinç (nanorice) yapıların çevreye yüksek duyarlı plasmon özellikleri, kimyasal ve biyolojik proseslerde ortam değişikliklerini lokal olarak izlemek için büyük potansiyel taşımaktadırlar. Bu eşsiz optik özellikteki yeni nano yapıların yüzey artırılmış spektroskopiler ya da SPR sensörleri gibi nanosensör uygulamalarında önemli bir yere sahip olacakları düşünülmektedir. Wang ve arkadaşları, çubuk şeklinde maghemit (Fe_2O_3) nanopartikülleri sentezleyerek aminopropiltrimetoksilan (APTMS) ile fonksiyonlandırarak altın kolloidlerin yapıya bağlanması sağlanmıştır. Bu şekildeki çekirdek partiküllerine altının otokatalitik kaplanması ile kabuk yapısı oluşturulup pirinç şeklinde "nanorice" denilen kompozit partiküller elde edilmiştir (Wang, 2006).

2.4. Altın Nanoçubuklar

Altın nanopartiküllerin sentezi ve özellikleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Çubuk şeklindeki nanopartiküllere olan ilgi akımı Mie-Gans teorisinden dolayı eşsiz optik özelliklerinden dolayı oluşmuştur.

2.4.1. Altın Nanoçubukların Optik Özellikleri

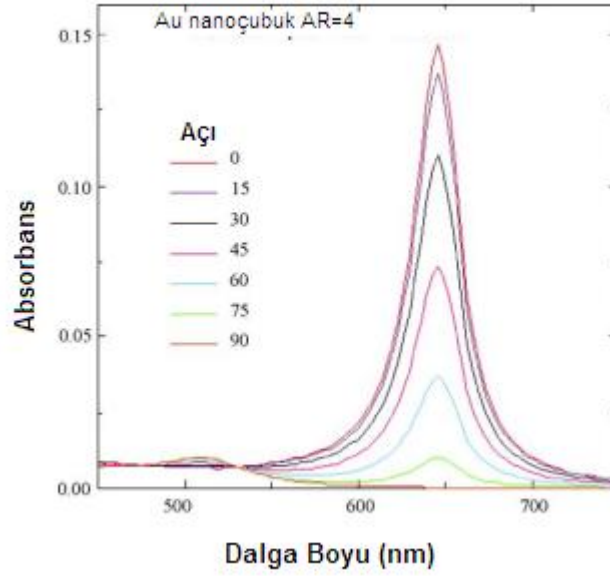
Küçük partiküllerin elektronik, kristalografik, mekanik ve katalitik özellikleri bulk materyallerinden farklıdır. Küçük elipsoid partiküllerin uzunluk/çap (aspect ratio, L/D) oranlarının değişmesiyle plasmon mod piklerinin nasıl değiştiği Gans' eşitliği ile ispatlanmıştır.

Altın nanoçubuklar değişik refraktif indeksine sahip farklı çözücüler içinde renklerini değiştirmektedir. Bu da altın nanoçubukların çevrelerindeki dielektrik özelliklerine oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Uzunluk/çap oranlarına bağlı olarak renklerinde de değişme göstermektedirler. Partiküllerin bu optik özellikleri boy ve şekline göre değişmektedir. Bu optik özellikleri, metal iletken elektronları ile elektromanyetik ışımaya bileşenlerinden elektrik alanla arasındaki etkileşime bağlıdır. Özellikle altın, gümüş, kurşun gibi metaller güçlü absorpsiyon bandları görünür bölge spektrumunda gösterirler ve parlak renk verirler. Bulk halindeki meteryallerde bu özelliği göstermezler.

Altın nanoçubukların etrafı bir kabukla kaplandığında ise kabuğun refraktif indeksine göre bir değişim gösterir. İnce absorpsiyon yapmayan bir kabuğun etkisi, aynı refraktif indeksteki ortam içinde bulunan partiküllerdeki spektral kayma aynı olur. Kabuk katmanı partikülün bulunduğu ortamın refraktif indeksinden farklı ise hem aksel hemde radyal moddaki yüzey plazmonunda kaymaya neden olur. Örneğin antibadi takılmış bir altın nano çubuk antijen bulunan bir ortamda, eğer antijenin refraktif indeksi sudan daha büyükse plazmon modunda bir kaymaya neden olacaktır (Perez-Juste, 2005).

Oryantasyon Etkisi

Nanoçubukların hem aksel hem de radyal yöndeki lokalize plazmon rezonansları birbirinden ayrılır. Bunlar polarize ışık ile altın nano çubukların uzun akseline paralel ve dikey elektrik alanının osilasyonu ile seçici olarak uyarılmaktadır. Işık çubuğun uzun akseline paralel (0°) de polarize edildiğinde sadece aksel yüzey plazmonu uyarılarak 645 nm 'de bant göstermektedir. Tam tersi, ışık uzun akseline dik polarize edildiğinde (90°) yüzey plasmon uzun band tamamen uzaklaşarak sadece radyal mod uyarılmaktadır. Aradaki açılarda ise her iki modun dağılımı ortaya çıkmaktadır. Şekil 2.8'de su içinde oryante olmuş altın nanoçubukların farklı açılarda gösterdiği spektrum gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Su içinde oryante olmuş altın nanoçubukların farklı açılarda gösterdiği spektrum.

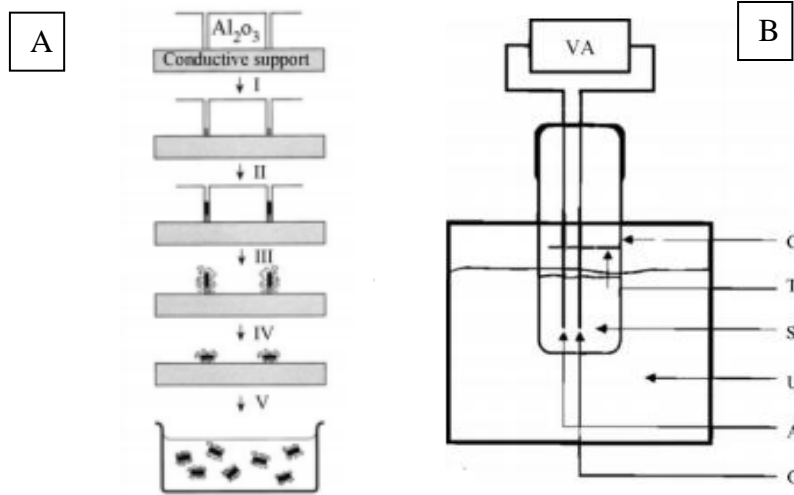
2.4.2. Altın Nanoçubuk Sentezi ve Oluşum Mekanizması

2.4.2.1. Template Metot

İlk olarak bu metot Martin ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu metot, nano gözenekli polikarbonat ya da alümina template membranlarının gözeneklerinde altının elektrokimyasal yüklenmesi (deposition) yöntemine dayanmaktadır. Martin ve arkadaşları Au/alümina kompozitlerinin optikçe şeffaf olduğunu ve ayrıca hazırlanan nanosilindirlerin uzunluk/çap oranlarını değiştirerek kompozit membranlarının renklerini değiştirebilmişlerdir. Başlangıçta elektrokimyasal metotla bir polikarbonat membran üzerine altının depozite edilmesiyle mikroskopik elektrotlar hazırlamak için template metot kullanılmıştır. Daha sonraları bu metot nanokompozitleri sentezlemek için değil ayrıca templatede sentezlenmiş altın nanoçubukları su içinde dağıtmak içinde uygulanmıştır. Ayrıca polimer stabilizasyonu ile membranı çözen organik çözücüler içinde de çubukların süspansiyon edilmesini sağlamıştır (Martin, 1996).

Bu metot kısaca şöyledir; başlangıçta az miktarda Ag ya da Cu alümina destek membranı üzerine püskürtülerek elektrodeposition için iletken bir film

oluşturulmaktadır. Daha sonra bu yüzey üzerinde Au nanopartiküllerin elektrokimyasal olarak büyümesi için kullanılmaktadır. Altın alüminanın nano gözenekleri içinde elektrodepozite edilmektedir. Diğer adımda polivinil pirolidon gibi polimerik bir stabilizör varlığında alimüna membran ve bakır ya da gümüş gibi filmi seçici çözme işlemi yapılmaktadır. Son adımda da oluşturulan nanoçubuklar su ya da organik faz içinde sonikasyonla dağıtılmaktadır. Bu şekilde sentezlenen altın nanopartiküllerin çapı alimüna membranın gözenek çapı ile bağlantılıdır. Böylece istenilen farklı çaptaki altın nanoçubukları kullanılan template'in gözenek çapı kontrol edilerek hazırlanabilmektedir. Nanoçubukların uzunluğu ise, membran gözeneği içine deposite edilen altın miktarı ile ayarlanabilmektedir. Benzer teknikle değişik membranlar kullanılarak değişik altın nanotüpler, nanokompozitler geliştirilmiştir. Template metodundaki temel limitasyon verimdir. Tek tabaka çubuk yapının hazırlanması zor ve bunun sonucunda çok az miligram miktarda çubuk elde edilmektedir.



Şekil 2.9. Altın nanoçubuk sentezleme yöntemleri. A) Template metot, B) Elektrokimyasal metot

2.4.2.2. Elektrokimyasal Metot

İlk olarak Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaklaşımı, organik çözücü sistemlerinde ters miseller içinde geçiş metal kürelerinin elektrokimyasal sentezine dayanmaktadır (Wang, 1999). Bu metot yüksek verimde altın nanoçubukların sentezini sağlamaktadır. Bu sentez basit iki elektrot tipi

elektrokimyasal bir hücrede gerçekleştirilmektedir. Bir altın plaka anot olarak, platin plaka ise katot olarak aynı boyutlarda kullanılmaktadır. Her iki elektrotta katyonik yüzey aktif madde (surfaktant) olan, C₁₆TAB (hekzadesiltrimetilamonyumbromide) ve az miktarda nanoçubuk oluşumunu sağlayan kosurfaktant olarak kullanılan hidrofobik katyonik surfaktant olan tetradodesil amonyum bromid (TC₁₂AB) içeren çözelti içine daldırılır. C₁₆TAB ayrıca oluşan nanopartiküller içinde stabilizör olarakta davranmaktadır. Bu karışımı içeren elektrostatik hücrede 36 °C'de ultrasonik banyo içine daldırılır. Elektrolizden önce, gerekli miktarda aseton ve sikloheksan elektrolitik çözelti içine ilave edilir. Aseton, C₁₆TAB miselleri içindeki silindirik şekli sağlayan kosurfaktanttır. Misel yapısını oluşturmasını bollaştırmak için kullanılmaktadır. Sikloheksan ise C₁₆TAB miseller içindeki çubuk şeklindeki yapının uzatılmasını artırmak için kullanılmaktadır. Kontrollü akım elektrolizi 3 mA akım ile 30 dk'da proses gerçekleştirilmektedir. Bu sentez boyunca, bulk altın metal anodu tüketilerek AuBr₄⁻ iyonu oluşturulmaktadır. Bu anyonlar katyonik surfaktantlarla kompleks oluşturarak indirgenmenin olduğu katota göçerler. Yalnız hala çekirdeklenmenin katot üzerinde mi miseller içinde mi olduğu bilinmemektedir. Sonikasyon işlemide, oluşan çubukları yüzeyden uzaklaştırmak ya da katot yüzeyinde çubukların kırılmaması için yapılmaktadır. Altın nanoçubukların uzunluk/çap oranlarını kontrol etmek içinde Pt elektrodun arkasında elektrolitik çözeltinin içine bir gümüş plaka daldırılmaktadır. Gümüş plaka tarafından oluşturulan gümüş iyonları ile anot tarafından oluşturulan altın iyonları arasında redoks reaksiyonu olmaktadır. Şekil 2.9'da elektrokimyasal metot şematik olarak gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları gümüş iyonlarının derişimi ve bunların salınım hızının nanoçubukların uzunluğunu belirlediğini bulmuşlardır. Gümüş iyonlarının mekanizmadaki rolü henüz bilinmemektedir.

2.4.2.3. Çekirdek Geliştirme Metodu (Seed Growth Method)

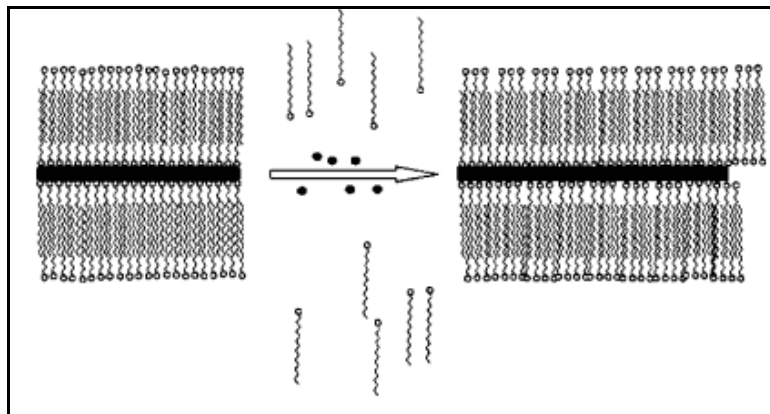
Monodispers kolloit partiküllerin, çekirdek geliştirilmesi yöntemi 1920'lere dayanmaktadır. Birçok araştırmacı tarafından monodispers metal nanopartiküllerin sentezlenmesinde bu yöntemi kullanmıştır. Çekirdek geliştirme metodu ile altın nanoçubuk sentezleme yöntemi Şekil 2.11'de gösterilmektedir. Natan ve arkadaşları küresel altın nanopartikül çözeltisi içindeki altın kolloid yüzeyinde hidroksilamin gibi zayıf bir indirgeyici ajanla Au³⁺ 'ün indirgenmesine

dayanmaktadır (Natan, 1998). Frens metoduyla monodispers 20 ve 100 nm boyuntunda oluşturulan altın nanopartikülleri kullanarak sodyum sitratı indirgeyici ajan olarak kullanarak altın nanoçubukları sentezlemişlerdir. Bu araştırmacılar, hidroksilaminle yapılan altın nanoçubuk oluşumunun çok az olduğunu belirtmişlerdir. Jana ve arkadaşları, 12 nm boyunda sitratla stabilize edilmiş altın nanopartikülleri değişik indirgeme ajanları ve koşullarını kullanarak çekirdek geliştirme yöntemiyle altın nanoçubuk oluşumunu çalışmışlardır. Çekirdeklerin varlığında ek bir çekirdeklenmenin olduğunu belirtmişlerdir. Ek bir çekirdeklenmeden indirgeme ajanının metal çekirdek ve metal tuzu çözeltisine ekleme hızı, indirgeme ajanının kimyasal indirgeme potansiyeli gibi kritik parametrelerin kontrol edilmesiyle kaçınılabileceğini ifade edilmiştir (Jana, 2001). Adım adım partikül büyütme metodu büyük çekirdek/altın tuzu oranında başarılı geliştirme adımları boyunca devam ettirilebilmektedir. Murphy ve arkadaşları 5-40 nm boyutunda küresel uniform boyda altın nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Birincil çekirdek denilen 3.5 nm çapında altın çekirdekleri sitrat varlığında altın tuzunun borohidrit ile indirgenmesiyle hazırlamışlardır. Geliştirme adımında, surfaktant çözeltisi ortamında gerçekleştirmişlerdir. İkinci çekirdeklenmeyi geliştirme adımında geliştirme (büyütme) koşullarını kontrol ederek engellemişlerdir. Bunun içinde, çekirdek yok iken misellerin varlığında altın tuzunu indirgemeyen zayıf indirgeme ajanı olan askorbik asidi kullanarak yapmışlardır (Murphy, 2001). İstenilen uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar surfaktant çözeltisi ortamındaki büyütme koşulları kontrol edilerek sentezlenebilmektedir. Gümüş nitratin (AgNO_3) eklenmesi sadece altın nanoçubukların verimi ve uzunluk/çap oranını etkilemesinin yanı sıra altın nanoçubuk oluşum mekanizmasını ve buna bağlı olarak kristal yapısını da etkilemektedir. Böylece AgNO_3 , altın nanoçubukların kristal yapısı, morfolojisi ve optik özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır.

a) AgNO_3 Kullanmadan Altın Nanoçubuk Sentezi

Murphy ve arkadaşları, sitrat varlığında sodyum borohidrit ile indirgenerek 3.5 nm boyunda altın nanoçekirdekleri kullanarak yüksek uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. Bu yöntemde C_{16}TAB ve askorbik asit derişimini optimize ederek, 2 ve 3 adımda çekirdeklenme prosesi uygulayarak büyütme koşullarını çok dikkatli kontrol etmişlerdir. Bu yöntemle yaklaşık %4 gibi bir

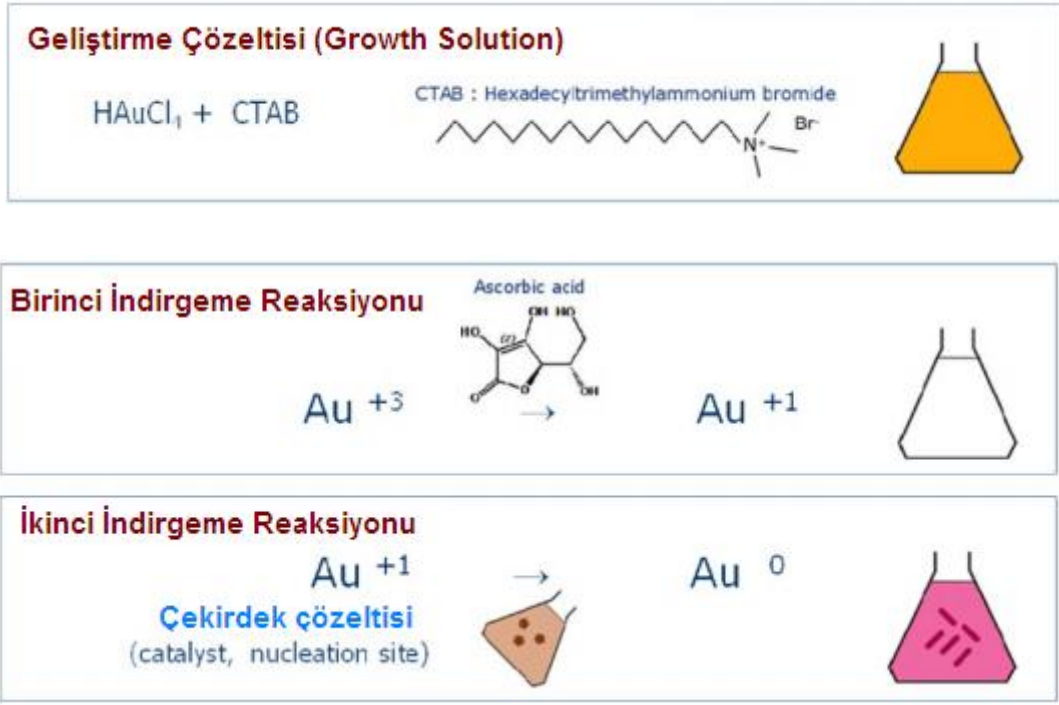
verimde altın nanoçubuk elde etmişlerdir. Uzun altın nanoçubukları küresel ve fazla olan yüzey aktif maddeden santrifüjle ayrılmıştır. Daha sonra aynı grup sadece pH kontrolü ile monodispers büyük uzunluk/çap oranında altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirmişlerdir. Büyütme çözeltisinin pH'ını 2.8' den 3.5 ve 5.6'ya çekerek 18.8 ve 20.2 uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar elde etmişlerdir. Çubuk şeklinde nanopartiküllerin, surfaktant çözeltisi ortamında oluşum mekanizması henüz tam açıklanamamıştır. Fikirlerden birine göre $C_{16}TAB$ molekülü altın nanoçubukların üzerine çift katlı yağ molekülü şeklinde absorplanmaktadır. Tetrametil amonyum baş grupları altın yüzeyinde ilk tek tabakayı oluşturmaktadır. Murphy ve arkadaşları $C_{16}TAB$ nın baş gruplarının altın nanoçubuğun pentahedral çift taraflı kristalografik yüzeylerine bağlandığını savunmaktadırlar. Altın nanoçubuklar $C_{16}TAB$ moleküllerinin çubuk geliştirilmesi sırasında farklı kristal yüzeylerine absorplanmasıyla misel bir yapı meydana getirilmesiyle oluşturulmaktadır. C_nTAB 'deki hidrokarbon uzunluğu nanoçubuğun sadece uzunluğunu değil ayrıca verimini de etkilemektedir. Kısa zincir uzunluğu kısa çubuklar oluştururken uzun zincir uzunluğu yüksek verimde uzun çubuklar oluşturmaktadır. $C_{16}TAB$ 'in farklı kristal yüzeylerine çift katlı tercihli absorpsiyonu incelendiğinde, yüzey aktif madde kuyruklarının fermuar şeklinde (zipping) yapı oluşturmasıyla kararlı çift katlı tabaka ile uzun nanoçubuk oluşumuna öncü olmaktadır (Şekil 2.10). (Murphy, 2001; Murphy 2003).



Şekil 2.10. Altın nanoçubuk oluşumunda kullanılan C_nTAB yüzey aktif maddesinin oluşturduğu çift tabakalı fermuar (zipping) yapısı.

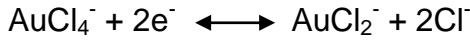
Perez-Juste ve arkadaşları sıcaklık ve $C_{16}TAB$ derişimi azaltıldığında uzunluk/çap oranı 1 ve 6 arasında küçük uzunluk/çap oranında ve %50 verimle altın nanoçubuk sentezleneceğini belirtmişlerdir. Uzunluk/çap oranının kontrol edilmesi, monodispersite ve verimi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar, çekirdeğin kararlılığı, sıcaklık, surfaktantın yapısı ve derişimidir. $C_{16}TAB$ ile kaplı çekirdeklerden sitratla stabilize edilmiş çekirdeklerden daha çok verimle altın nanoçubuk sentezlendiği belirtilmiştir. Az miktarda çekirdek eklendiğinde uzunluk/çap oranı yüksek altın nanoçubuklar elde edilmiştir. Bu da eksenel plasmon bandında kaymaya neden olmaktadır. Uzunluk/çap oranı arttıkça eksenel plasmon dalga bandında kayma göstermektedir. Perez ve arkadaşları surfaktant çözeltisinde altın nanoçubuk sentezinde bir elektrik alanı uygulamışlar ve katyonik misellere altın tuz iyonlarının bağlanmasıyla ilgili mekanizmayla bir takım sonuçlar almışlardır (Perez-Juste, 2004). Bunlar:

- Çekirdeklerin koloidal stabiliteleri arttıkça oluşan çubuk verimi artmıştır.
- Br^- iyonlarının C_nTA^+ varlığında Cl^- iyonlarına göre daha iyi çubuk oluşumunu desteklediğidir. Surfaktant kuyruğunun (C_n) uzunluğunun artması çubukların uzunluk/çap oranını ve çubuk oluşum verimini artırmaktadır. $NaCl$, NaS_3 ya da $NaBr$ eklenmesi çubukların uzunluk/çap oranını azaltmaktadır. İyonik gücün artırılması çubuk oluşum verimini azaltmaktadır.
- Optimum koşullarda çekirdek/ $HAuCl_4$ oranı ile uzunluk/çap oranı kontrol edilebilmektedir. Çekirdek/ $HAuCl_4$ oranı arttıkça uzunluk/çap oranı azalmaktadır.
- $AuCl_4^-$ ve $AuCl_2^-$ iyonları $C_{16}TAB$ 'e absorplanmaktadır. $C_{16}TAB/HAuCl_4$ optimum derişim oranı çok dar bir pencerededir. $C_{16}TAB/HAuCl_4$ oranı 10:1'den küçükse çökme olur. Sıcaklığın artırılmasından kaçınılmalı yoksa yüksek sıcaklıklarda çubuk oluşum verimi azalmaktadır.

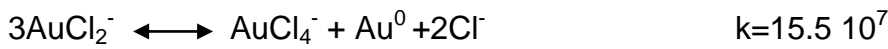


Şekil 2.11. Çekirdek geliştirme metoduyla altın nanoçubuk sentezi.

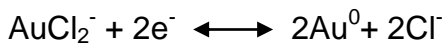
C_{16}TAB varlığında, askorbik asit Au^{III} 'yü Au^{I} 'e indirgemektedir.



Kolloidal altın oluşmamakta $\text{AuCl}_2^- \text{-C}_{16}\text{TAB}$ 'e parçalanmaktadır. C_{16}TAB varlığında kolloidal altına HAuCl_4 eklenerek $\text{AuCl}_2^- \text{-C}_{16}\text{TAB}$ oluşmaktadır.



Au^{I} 'e indirgenmesiyle elektronca zengin altın çekirdeklerinin yüzeyine elektron transferi olmaktadır.

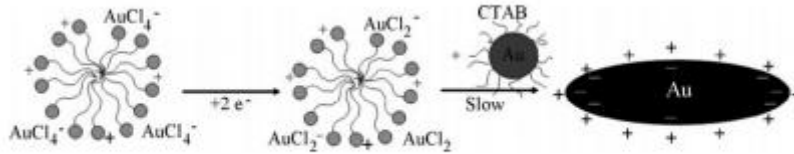


C_{16}TAB varlığında indirgeme reaksiyonu aşağıdaki gibi olur.



Tipik mikroelektrot tipi çöktürme boyunca, elektronlar altın nanopartiküllere transfer olunur. AuCl_2^- iyonları elektronları alarak uygun absorpsiyon bölgelerine absorplanır. Tipik küresel altın nanopartiküllerin oluşturulması bu şekildedir.

C_{16}TAB içeren çözeltide altın çekirdekleri C_{16}TAB ile kapsülenererek altın iyonları C_{16}TAB 'e bağlanır. Altın nanoçubuk oluşum hızı, AuCl_2^- ile yüklü katyonik misellerle katyonik altın çekirdek partiküllerinin çarpışma frekansı ile belirlenmektedir. Bu etkileşim miseller ile altın nanoçubuklar arasındaki elektriksel çift tabakanın etkileşimi ile kontrol edilmektedir. Reaksiyon hızı misellerin çarpışma hızıyla kontrol edilir. Misellerin uç kısımlarının yan bölgelerinden daha hızlı çarpışmasıyla çubuk oluşmaktadır. Şekil 2.12'de altın nanoçubuk oluşum mekanizması gösterilmektedir. Monodispers altın nanoçubukları küçük boyuttaki küresel partiküllerden santrifüjle ayrılmaktadır. Aynı boyuttaki çubuk ve kürelerin birbirinden ayrılmasında santrifüjleme işlemi kullanışlı değildir. Boyut seçici çöktürme ya da ekstraksiyon metotları farklı boydaki küresel karışımları ayırmak için kullanılırken çubukların büyük boyutları için kullanılmamaktadır. Nano gözenekli filtrelerle şekil ayrımı yapılmasında da çubukların kısa eksenlerinin küresel olanlarla yaklaşık aynı boyutta olduğu için kullanışlı bir yöntem değildir. Wang ve arkadaşları boyut kromatografi yöntemiyle çubukları kürelerden ayırmışlardır.



Şekil 2.12. Altın nanoçubuk oluşum mekanizması.

b) AgNO_3 Kullanarak Altın Nanoçubuk Sentezi

AgNO_3 varlığında altın nanosenteziyle elektrokimyasal ya da diğer metotlara göre şekli daha iyi kontrol edilebilmekte ve ayrıca çubuk oluşum verimi artmaktadır. Ag^+ iyonlarının metal nanopariküllerin şekillerini modifiye etme mekanizması henüz anlaşılammıştır. Hipoteze göre Ag^+ iyonları partikül yüzeyine AgBr şeklinde

absorplanıp AgBr ile pasifize edilmiş kristal yüzeylerinin gelişmesi engellenmektedir. Askorbik asit indirgeme gücünü çok düşük pH'larda azalmaktadır. Nikoobakht ve El Sayed yeni bir çekirdek geliştirme metodu geliştirerek daha önceki metottaki bazı sınırlamaları ve zorlukları ortadan kaldırmıştır. Sitrat kaplı çekirdekler yerine C₁₆TAB kaplı çekirdekleri kullanarak silindirik olmayan ya da farklı şekilsiz partiküllerin oluşumunu engellemişlerdir. %99 verimle uzunluk/çap oranı 1.5 ile 5 arasında altın nanoçubuklar elde etmişlerdir. Her iki tip çekirdekle oluşturulan altın nanoçubukların farklı kristal yapısına sahip olduğunu görmüşlerdir. Çubuk geliştirme çözeltisindeki gümüş iyonlarının miktarının artırılmasıyla istenilen uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar elde edilmiştir. Gümüş derişiminin artırılmasıyla aksenel plasmon bandında kayma oluşturulmuştur. Ancak kritik bir gümüş derişiminin üzerinde altın nanoçubukların uzunluk/çap oranının tekrar azaldığı görülmüştür. Altın nanoçubukların uzunluk/çap oranının Ag iyonları ile kontrol edilebildiği gibi ayrıca sabit derişimdeki Ag⁺ varlığında nanoçubuk geliştirme çözeltisine çekirdek çözeltisi miktarının artırılmasıyla da kontrol edilebilmektedir. Altın iyon derişimi (Au³⁺) ≈6.10⁻⁴ M'a çıkartıldığında daha büyük uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklar elde edilmektedir. Askorbik asit derişimi oluşturulan çubuğun yapısının (morfolojisi) yanında verim ve uzunluk/çap oranını da etkilemektedir. Askorbik asit miktarı arttıkça uzunluğun ve verimin azaldığı görülmüştür. Bu etki çok fazla miktardaki indirgeme ajanlarının varlığında çekirdeklerin çok hızlı bir substrat gibi davranmasından kaynaklanmaktadır. Tek bileşenli C₁₆TAB gibi bir surfaktant kullanılarak gümüş iyonları ya da altın çekirdek derişiminin artırılmasıyla aksenel plasmon bandı 825 nm'ye kadar uzunluk/çap oranı 4.5 kadar olan altın nanoçubuklar sentezlenmektedir. Nikoobakht ve El Sayed uzunluk/çap oranı 5'in üzerinde olan altın nanoçubuk sentezlemek için BDAC (Benzildimetil amonyumklorit) / C₁₆TAB karışımı olan ikili surfaktant sistemi kullanmışlardır. BDAC/ C₁₆TAB oranı 16'dan 2'ye kadar değiştirilerek uzunluk/çap oranı 5 ve 8'e kadar altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. İlk gelişme adımı 1 saat içinde olurken ikinci geliştirme adımı 1 haftadan fazla zaman almıştır. Surfaktant oranı arttıkça çok miktarda küresel nanopartikülleri oluşumunu azaltarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk gelişme adımından sonra farklı miktarlarda gelişme çözeltisi aşama aşama eklenerek nanoçubuğun boyu uzatılmıştır (Nikoobakht, 2003; El Sayed, 2003).

Altın nanoçubuk oluşumundaki gümüş nitratin etkisinin mekanizması henüz açıklanamamıştır. İki farklı mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi, surfaktant derişimi ve çözeltilinin iyonik gücüne bağılı belli bir boyutta surfaktant bir kalıp oluşturmaktadır. Altın ve gümüş iyonları içeren geliştirme çözeltilisine askorbik eklendiğinde altın iyonları indirgenmektedir; çünkü gümüş iyonları sadece bazik pH'larda indirgenmektedir. Nikoobakht ve El Sayed C₁₆TAB surfaktantının baş gruplarına gümüş iyonlarının yerleşmesiyle Ag-Br çifti oluşturup bromid iyonlarının yük yoğunluğu azalmaktadır. Böylece altın yüzeyindeki birbirine komşu baş gruplar birbirini iterek C₁₆TAB misel yapıları uzayacaktır. Bu sadece C₁₆TAB monomerlerinin yan yüzeylere uç yüzeylerine göre daha fazla afinite göstermesinde olabilmektedir. HRTEM görüntüleri altın nanoçubukların dört yüzeyinin olduğunu göstermektedir. BDAC:C₁₆TAB surfaktant karışımı kullanıldığında C₁₆TAB monomerleri yan yüzeylere BDAC monomerlerinin uç yüzeylere yüksek afinite göstermesiyle Ag-Cl çiftinin Ag-Br çiftine göre daha zayıf bağlanmasıyla eksenel yönde gelişme hızı daha büyük olmaktadır.

İkinci mekanizmaya göre, C₁₆TAB monomerlerinin rijit yapısı nedeniyle tek yönlü gelişme olduğudur. Gümüş iyonlarının olmadığıda uzun çubukların zipping mekanizmasıyla oluşumuna benzer bir mekanizma göstermektedir. Askorbik asit ilave edildiğinde gümüş iyonları indirgenmeyerek Ag-Br yapısı oluşturmaktadır. Ag-Br yapısının altın nanokristaller yüzeyine adsorplanmasıyla altın indirgenmesini yavaşlatarak altın nanoçubukların tek kristal oluşumunu sağlamaktadır.

2.4.2.4. Diğer Altın Nanoçubuk Sentez Yöntemleri

Diğer metotlarla elde edilen altın nanoçubuk yöntemlerinde az verimde, tekrarlanabilirliği az olan ve yeterli verimde uzun nanoçubuk elde edilememesi gibi kısıtlamalarla karşılaşmıştır.

Yang ve arkadaşları, fotokimyasal metotla altın nanoçubuk sentezlemişlerdir. Elektrokimyasal yöntemine benzer bir çubuk geliştirme çözeltilisi hazırlanarak farklı miktarlarda gümüş nitrat eklenerek herhangi bir indirgeme ajanı kullanmadan gerçekleştirilmiştir. Altın nanoçubuk oluşumu UV ışık ile indüklenmektedir. Gümüş iyonu artırıldığında uzunluk/çap oranı artmış, gümüş iyonu olmadığıda küresel partikül oluşturulmuştur (Yang, 2002). Yamada ve arkadaşları mika yüzeyi

üzerinde gümüş nitrat içermeden çekirdek geliştirme yöntemini kullanmışlardır. Mika yüzeyine küresel çekirdek nanopartikülleri yerleştirilerek C₁₆TAB içeren geliştirme çözeltisine daldırılmıştır. Yaklaşık %15 oranında nanoçubuk geliştirilmiştir. Wei ve arkadaşları aynı metodu cam yüzeyler için modifiye etmişlerdir. Çekirdek yüzeyine takılmış uzatma kolunun ve altın tuz derişiminin oluşturulan altın nanoyapılara etkisi incelenmiştir (Yamada, 2003).

2.4.3. Altın Nanoçubukların Kullanım Alanları

Altın nanoçubukları temel olarak hastalık tayini ve teşhisi, hastalık tedavisi olmak üzere iki farklı alanda kullanımı bulunmaktadır.

2.4.3.1. Tedavi Uygulamaları

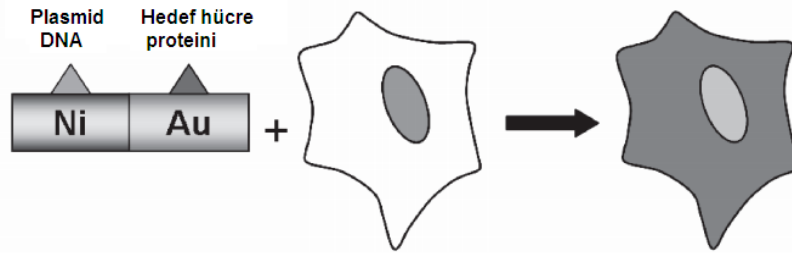
Altın nanoçubukların gen transferi ve fototermal terapi olmak üzere iki tedavi uygulamasıda bulunmaktadır.

Gen Transferi

Gen terapisi, plasmid DNA'nın hedef hücreye taşınıp etkili bir şekilde salınmasına bağlıdır. Gen transferinde genellikle taşıyıcı sistemler önemli hücresel bariyerlerle karşılaşmaktadır. Son zamanlarda biyolojik aktiviteyi tetiklemek için foton ışınlanması uygulayarak nano taşıyıcı sistemlerin iyi kontrol edilme ile ilgili çalışmalar başlamıştır. Bu şekilde taşıyıcı sadece geni hücreye transfer etmeyip aynı zamanda gen ekspresyonunu da başlatmaya yardım etmelidir. Yakın kızılaltı ışını (NIR) iyi bir tedavi ajanıdır. Dokuların en derin kısımlarına kadar nüfuz etmekte ve UV-görünür ışını ile karşılaştırıldığında daha az zarar vermektedir. Örneğin, yeşil floresan protein geni (EGFP) konjuge edilmiş altın nanoçubukları hem in vivo hem de in vitro olarak gen ekspresyonunu izlemek ve görüntülemek için kullanılmıştır. NIR ışınının etkisini UV-görünür spektroskopisi, elektroforez ve TEM ile karakterize etmişlerdir. EGFP-altın nanoçubuk yapısının laser uygulamadan önce ve sonraki optik ve yapısal özellikleri incelenmiştir. EGFR-altın nanoçubuk konjugatı femto saniye NIR ışınına maruz bırakıldığında altın nanoçubukların boyutu ve şekli değişerek DNA'yı Hela hücrelerine gönderip aynı dozda NIR ışınına maruz bırakılmış hücrelerde bu dozda herhangi bir öldürücülük gözlenmezken GFP ekspresyonunun laser gönderilen yerde başladığı gözlenmiştir.

Altın nanoçubuklarla gen transfeksiyonunun verimi hücreye hedef ligandlar kullanarak artırılabilirliği bildirilmiştir (Megan, 2007).

Salem ve arkadaşları, gözenekli-alumina membranında elektrodepozisyon yöntemiyle altın-nikel nanoçubukları sentezleyerek gen transfeksiyonunu incelemiştirlerdir. Nanoçubuğun nikel segmentinde karboksil uç grubu oluşturularak plasmid DNA nikel kısmına bağlanmıştır. Hedef hücreye yönlendirmek için hedef hücreye spesifik transferin proteinini nanoçubuğun altın segmentine bağlanmıştır. Bu nanoçubuk yapısı kullanılarak insan embriyonik böbrek memeli hücre hattına (HEK293) yeşil floresan proteini (GFP) ile etiketli genlerin in vitro transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Altın-nikel nanoçubuğun hücre stoplazmasına girişi TEM ile incelenerek hücreye girmeden önce plasmidin salımı gözlemlenmiştir. Şematik olarak Şekil 2.13’de gösterilmiştir (Salem, 2003).



Şekil 2.13. Nikel-altın nanoçubuk yapısıyla gen transfeksiyonu.

Fototermal Terapi

Genellikle cerrahi müdahale kullanılmadan termal terapi ya da “hyperthermia” olarak adlandırılan ısı etkisi ile tümör hücrelerinin parçalanması yöntemidir. Hedef bölgede sıcaklığın artırılmasında, infrared lambaları, ultrasonik ses dalgaları, radyo frekansı göstermelerine karşın, nanokabuk ya da nanoçubuklara göre ısıtılma verimlerinin daha düşük olması ve orta görünür bölge dalga boylarında rezonans oluşturmaları nedeniyle doku örneklerinde fototermal terapi uygulamalarında çok fazla kullanılamamaktadır. Altın nanoçubuklarla bu limitasyonlar aşılarak ışık enerjisi termal enerjiye verimli bir şekilde dönüştürülmektedir. Altın nanoçubukların aksenel plasmon rezonans dalga boyunun NIR dalga boyunda olması nedeniyle doku uygulamaları bu aralığa girmektedir. Ayrıca dar plasmon absorpsiyon band genişliği göstermektedir. Bu

özelliklerin hepsi fototermal terapi sırasında sağlıklı hücrelerin zarar görmesini azaltmaktadır. İn vitro çalışmalarda altın nanoçubuklar hedef moleküle spesifik molekül ile fonksiyonlandırılıp hedef hücre ile etkileştirilip daha sonra uyarılmıştır.

Huff ve arkadaşları, folik asit ligandlarını altın nanoçubuklarına konjuge etmişlerdir. Folik asit konjuge altın nanoçubukları, ağız epitel türevli tümör hücre hatları olan KB kanser hücrelerine yüksek seçicilikte bağlanmaktadır. Laser ışınlanması sonucu hücre membranlarında fototermal hasar oluşmuştur (Huff, 2007).

Huang ve arkadaşları, bifonksiyonel altın nanoçubukları kullanarak kanser hücrelerini fototermal olarak tahrip etmişlerdir. Anti-EGFR ile altın nanoçubukları konjuge edip bu antibadiye spesifik kanserli olmayan epitelyum hücre hattı (HaCaT) ve iki kanserli ağız epitelyum hücre hatları [HOC313, HSC3] ile inkübe etmişlerdir. Laser ışınlanması sonucu kanser hücreleri normal hücreleri öldürmek için gerekli lazer akısının yarısı kadar bir akı ile tahrip edilmiştir (Huang, 2006). Bu yöntemle sadece kanser hücreleri tahrip edilmemektedir. Pissuwan ve arkadaşları, makrofaj hücre hatlarına spesifik bağlanan CD11b antibadisini altın nanoçubuklara konjuge ederek laser ışınlanması ile bunları tahrip etmişlerdir. (Pissuwan, 2007). Ayrıca aynı grup, patojenik parazit olan *Toxoplasma gondii* 'e spesifik bağlanan antibadi konjuge edilmiş altın nanoçubuklarını kullanarak laser uygulamasından sonra %80 oranında organizmanın "tachyzoites"i tahrip edilmiştir.

2.4.3.2. Hastalık Teşhis ve Tanı Uygulamaları

Altın nanopartiküllerinin güçlü ışık absorpsiyonu ve saçılımı nedeniyle biyomedikal tanı sistemlerindeki görüntülemeye etiket ve kontrast ajanı (contrast agent) olarak kullanılmaktadır. Özellikle altın nanoçubukların optik absorpsiyon verimleri aynı hacimde küresel altın nanopartiküllerine göre 20 kat daha fazla olması ve ışık saçılma sabitinin nanoküre ve nanokabuklara göre oldukça büyük olması nedeniyle biyomedikal tanı ve teşhis uygulamalarında altın nanoçubuklar daha çok kullanılmaya başlanmıştır.

Görüntülemeye Hastalık Tayin ve Teşhis Belirteci Olarak Kullanımı

Kanser hücreleri, farklı biyolojik özellik gösteren heterojen hücre topluluğundan oluşmaktadır. Hücre yüzey işaretçilerine spesifik olarak bağlanabilen antibadiler

floresan bir molekülle etiketlenerek flow sitometre (flow cytometry) ile hücrelerin immunofenotipleri belirlenerek kanser tanı ve teşhisi konulabilmektedir. Bu yöntem de kullanılan floresan moleküllerin geniş bir absorpsiyon bandı göstermesi 300-700 nm gibi dar bir dalga boyunda uyarılması nedeniyle spektral bandların üst üste çakışması nedeniyle çoklu tanı yöntemlerinde kullanılamamaktadır. Maksimum 7 hücre tipi incelenebilmektedir. Bunlara alternatif olarak kuantum kristalleri (Qdot) olarak adlandırılan yapılar boyutuna bağlı olarak eşsiz floresan özellik göstermeleri nedeniyle çoklu tanı sistemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Bunlarında in vivo çalışmalarda toksik olmaları nedeniyle toksik olmayan kimyasal floroporlardan daha parlak ışık saçan, kısa sürede rengini kaybetmeyen, 10^{-16} M gibi çok küçük derişimlerde bile tayin yapabilen, 600-2000 nm aralığı gibi geniş bir aralıkta optik sinyal verebilen altın nanoçubuk esaslı moleküler problar geliştirilmiştir. Altın nanoçubuklarla yaklaşık 30 moleküler prob oluşturularak çoklu tanı sistemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Farklı hücre işaretçilerine affinite gösteren antibadi takılmış altın nanoçubuklarını kullanarak hücrelerin farklı immunofenotip profilleri basit ve eş zamanlı olarak teşhis edilebilmektedir (Pissuwan, 2008).

Kanser gibi hastalıkların teşhis ve tanısında optik görüntüleme teknolojileri çok tercih edilmektedir. Bu teknolojilerde hastalığın hücresele özelliklerini görüntülemek için etiket bir molekül ya da nanopartiküller kullanılmaktadır. Organik boyaların fotokimyasal yapılarının zamanla bozulması (photodecomposition), kuantum kristallerinin in vivo ve in vitro uygulamalarda özellikle insan sağlığı uygulamalarında çok toksik olması nedeniyle altın nanoçubukların biyouyumlu olması, fotokimyasal bozunma göstermemeleri, optik ve elektron mikroskobunda görünebilmeleri nedeniyle hastalık teşhis ve tanısı uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Huang ve arkadaşları, altın nanoçubukları monoklonal anti-epidermal büyüme faktör reseptör antibadisi (anti-EGFR) ile fonksiyonlandırarak anti-EGFR-altın nanoçubuk konjugatları oluşturmuşlardır. EGFR kanserli epitel tümör hücrelerini "over-express" ettiği bilinmektedir. Hazırlanan bu konjugatları normal ve kanserli hücre hatları ile inkübe etmişlerdir. Kanser hücreleri yüzeyine bağlanan altın nanoçubuk-anti EGFR konjugatlarının saçtığı kırmızı ışık ile karanlık mod mikroskobu altında kanser hücreleri tayin edilmiştir (Huang, 2007). Ayrıca bu

konjugatları Raman spektroskopisinde kanser hücrelerini belirlemek içinde kullanmışlardır (Huang, 2006).

Altın nanoçubukları fotolüminisans ajanı olarakta kullanılmaktadır. Özellikle doku derinliklerinde yer alan kanser hücrelerini belirlemek için iki-foton luminans görüntüleme (two-photon luminescence) parlak kontrast ajanı olarak Durr ve arkadaşları kullanmışlardır (Durr, 2007).

Altın nanoçubuklar kullanılarak hücre ve derin dokuların görüntülenmesi için optoakustik ya da fotoakustik tomografi gibi yeni teknikler geliştirilmiştir. Li ve arkadaşları boy/çap oranı 3.7 ve 5.9 olan iki altın nanoçubuk karışımını optoakustik görüntüleme yöntemiyle kanser hücrelerini erken teşhis etmek için kullanmışlardır. Kısa altın nanoçubuğa anti-HER2, uzun olanına anti CXCR4 antibadisi konjuge ederek belli bir dalga boyundaki laser ışınları aynı örnek içinde iki farklı bölgedeki altın nanoçubuğun aksenel plasmon rezonansı ile görüntülenme sağlanmıştır (Li, 2007).

Kim ve arkadaşları, poliakrilik asit modifiye altın nanoçubuklarını hücreye spesifik antibadiler takarak bu konjugatların uyarılmış hücrelere bağlanması sonucu oluşan optoakustik görüntü yoğunluğu uyarılmamış hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Altın nanoçubukların, iltihaplı tepkilerin erken aşamalarında in vitro teşhis edilmesinde mükemmel kontrast ajanı olarak kullanılabilineceği bildirilmiştir (Kim, 2007).

Biyosensör Uygulamaları

Altın nanoçubuklar, boyut ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleri, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerle yüzeyi kolayca modifiye edilebilmesi nedeniyle daha çok sensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

Geçmiş yıllarda biyolojik tanı sistemleri, etiketleme ve sensör sistemlerinde floresan özellik gösteren boyalara olan ilgi büyüktü. Bu geleneksel metota alternatif nanopartikül barkot etiketler, rezonant Rayleigh saçılması, nanopartikül agregasyonu, lokal refraktif indeks değişimleri ve yük transfer etkileşimleri gibi nanopartikül esaslı biyosensör teknikleri geliştirilmiştir.

Metal nanopartiküllerin ışık absorpsiyonu ve saçılımı sonucu oluşturdukları çok güzel renkler araştırmacıların ilgisini bu yeni oluşumlara yönlendirmiştir. Metal nanopartiküller bileşimi, boyu, şekli, ortamın dielektriği ve gözlenen metal süspansiyonunun rengi gibi materyal özelliklerine bağlı olarak farklı optik özellikler göstermektedir. Pratik olarak nanoyapıların plasmonik özelliği ayarlanabilen nanopartikülleri oluşturmak için çok fazla yöntem bulunmaktadır. En sık kullanılan metot metal tuzlarının indirgenmesidir. Partikül boyutu, kullanılan reaktantların derişimi ve kullanılan indirgeme ajanlarının indirgeme gücü ile kontrol edilebilmektedir. Altın ve gümüş nanopartikülleri beyaz ışık altında uyarıldığında boyut, bileşim ve şekline bağlı olarak farklı renkte ışık saçmaktadır. Örneğin 80 nm boyutundaki gümüş nanopartikül süspansiyonu mavi, aynı boyutta altın nanopartikül süspansiyonu ise sarı, 60 nm boyutundaki altın nanopartikül süspansiyonu yeşil, 200 nm boyutundaki altın nanopartikül süspansiyonu kırmızı ışık saçmaktadır.

Altın nanoçubuklarla moleküler tanı sistemleri için geliştirilen biyosensörler literatürde oldukça fazla yer almaktadır. İnsan IgG 'sine affinite gösteren protein altın nanoçubuğa konjuge edilerek insan IgG'si immobilize edilmiş membran ile inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası membran üzerinde mavi-gri spot oluşturulmuştur (Alekseeva, 2005).

Li ve arkadaşları, altın nanoçubukların floresan özelliklerini inceleyerek büyük boy/çap oranına sahip altın nanoçubukların yüksek floresan yoğunluğu gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklerinden yararlanarak DNA analizi için optik biyosensör uygulamaları ve floresan prob mikroarray teknikleri geliştirmişlerdir (Li, 2005).

Oyelere ve arkadaşları, altın nanoçubukları Raman esaslı hücreiçi biyosensör uygulamasında kullanmışlardır. Altın nanoçubuklarına simian virüs çekirdek sekans peptidini immobilize ederek altın nanoçubuk-peptit konjugatı oluşturmuşlardır. Bu konjugatları normal ve kanser hücreleri ile inkübe ederek Raman sinyalleri ölçülmüştür. Normal ve kanser hücrelerinden alınan Raman spektrumlarındaki farklılıklar incelenerek kanser teşhisi gerçekleştirilmiştir (Oyelere, 2007).

Altın nanoçubukların biyosensör uygulamaları bölüm 2.5'deki lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) biyosensörleri kısmında ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

2.5. Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Biyosensör, analite özgün olarak bağlanan bir biyolojik eleman ve bu bağlanma sonucu gerçekleşen cevabı, fiziksel ve gözlemlenebilir sinyale çeviren bir sinyal çeviriciden oluşur. Sinyal çeviricisine göre elektrokimyasal, termal ve optik olmak üzere birçok sensör bulunmaktadır. Bu metotların her birinin kendine göre güçlü ve zayıf olduğu yönleri bulunmaktadır. Optik çeviricilerin birçok uygulama için bazı avantajları vardır. Optik biyosensörlerin en önemli avantajları, duyarlı olmaları ve biyomoleküler etkileşimlerinin eş zamanlı gözlemlenebilmesidir. Optik sensör teknikleri kemilüminisans, floresen, ışık absorpsiyonu ve saçılması, reflektans, yüzey plasmon rezonans ve raman saçılımı gibi çevirici (transducer) mekanizmalarını kullanarak tayin yapmaktadır. Son 20 yıldır yüksek seçicilik ve duyarlılıkta hastalıkların tayini ve görüntülenmesi, ilaç araştırmaları, çevre kirliliği ve biyolojik ajanların teşhisi gibi birçok uygulama için optik nanobiyosensörler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar, optik biyosensörleri geliştirmek için metal nanopartiküllerin olağanüstü optik özelliklerine dayanan alternatif stratejiler araştırmaya başlamışlardır.

Lokalize yüzey plasmon rezonansına (LSPR) dayalı optik sensörler altın, gümüş gibi metalik nanopartiküllere dayalı sensördür. Nanopartikül esaslı bu sensörler kimyasal ve biyolojik hedef moleküllerin miktarını etkili bir şekilde ölçülebilmektedir. Bu sensörlerin temeli, metal nanopartikül yüzeyindeki biyolojik ya da kimyasal molekülün ortamda bulunan hedef molekülüne bağlanması sonucu ortamın dielektrik sabitinin değişimine bağlı olarak yüksek hassasiyette yüzey plasmon rezonans dalga boyundaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır.

Lokalize yüzey plasmon rezonansı (LSPR) partikül boyuna, şekline, partiküller arası uzaklık, materyalin dielektrik özelliği ve nanopartikülün etrafındaki ortamın dielektrik özelliğine bağlıdır. Nanopartiküllerin maksimum absorbans yaptığı yüzey plasmon dalga boyu UV- görünür bölge spektroskopisi ile ölçülmektedir. Partiküllerin yüzey plasmon rezonansları buldukları çevreye bağlı olarak değişmektedir. Bu nanopartiküllerin yüzeyindeki molekül hedef molekülüne

bağlandıktan sonra ortamın dielektrik sabitinin değişmesiyle yüzey plasmon rezonansında değişime neden olmaktadır. Bu değişim ölçülerek tayin gerçekleştirilmektedir.

LSPR nanosensörleri, yüksek seçicilik ve duyarlılıkta, herhangi bir etiket gerektirmeyen, basit, ucuz, hızlı ve çoklu tayin yapılabilen diğer sensörlere göre birçok avantajları olan bir sensördür. Ayrıca basit, ucuz, küçük ve taşınabilir sistemlerdir (Zhao, 2006).

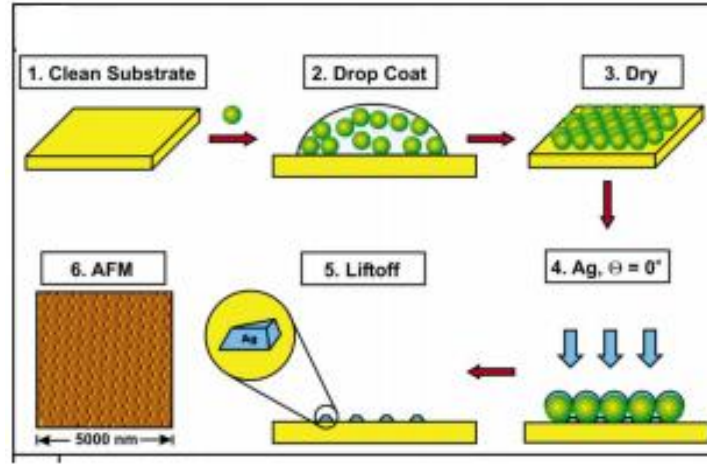
Lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) sensörleri, yüzey ve süspansiyon esaslı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.5.1. Yüzey Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Yüzey esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans sensörlerinde ilk olarak nanopartiküller oluşturularak çeşitli yöntemlerle bir substrat yüzeyi üzerine yerleştirilmektedir. Substrat üzerine immobilize edilmiş nanopartiküller hedef molekülü tanıyan prob molekül ile kimyasal olarak modifiye edilmektedir. Son olarak bu şekilde hazırlanan sensör yüzeyi hedef molekülleri ile etkileştirildiğinde prob molekülün hedef moleküle bağlanması sonucu ortamın refraktif indeksinin değişmesiyle nanopartiküllerin yüzey plasmon rezonans dalga boylarında bir kayma gerçekleşmektedir. Bu dalga boyundaki kayma UV-görünür bölge spektroskopisi ile görüntülenmektedir.

Yüzey esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans sensörlerinde substrat yüzeyine nanopartiküllerin yerleştirilmesinde partikül boyu, şekli ve partiküller arası boşluğun iyi kontrol edildiği nanoküre litografisi (Nanosphere Litografisi, NSL) yöntemi sık kullanılmaktadır. Nanolitografi yönteminde önce eş boyutlu belli çaptaki nanoküreler ile substrat yüzeyinde tek tabaka iki boyutlu kolloidal bir maske oluşturulur. Substrat yüzeyine nanokürelerin yüklenmesi için spin kaplama, damla kaplama (drop coating) ve termoelektrik soğutmalı açı kaplama (thermoelectrically-cooled angle coating) gibi yöntemler uygulanır. Mika, cam gibi negatif yüklü yüzey üzerine karboksilat ya da sulfat gibi negatif yüklü fonksiyonel grup modifiye edilmiş nanoküreler kullanılarak nanokürenin bulunduğu çözücü buharlaştırılıp nanoküreler kapiler kuvvetle bir araya gelerek substrat üzerinde bir arada hegzagonal güzel bir şekil oluştururlar. Bu nanoküre maskesinin üzerine

metal termal buharlaştırma, elektron demeti yükleme (electron-beam deposition) ya da laser sinyali yükleme (pulsed laser deposition) yöntemiyle yüklenir. Metal yüklemenden sonra nanoküre maskesi genellikle sonike edilerek substrat yüzeyinden ayrılır. Böylece şekil, boyut ve partiküller arası boşluk kontrol edilerek istenilen yapıda yüzeyi metal nanopartikül ile desenlendirilmiş yüzeyler oluşturulur. Çözelti esaslı sisteme göre bu yöntemle daha iyi optik özellikler kontrol edilebilmekte ayrıca tekrar aynı desende üretim yapılabilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Nanoküre litografisi yöntemi.

Nanoküre litografi yöntemiyle cam substrat üzerine genişliği 100 nm yüksekliği 51 nm olan Ag üçgen prizma nanopartiküller oluşturulmuştur. Ag nanopartiküllerin LSPR λ_{\max} 561.4 nm ölçülmüştür. Ag nanopartikül yüzeyi kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturacak alkanetiyol-merkaptoundekanik asit ile fonksiyonlandırıldıktan sonra LSPR λ_{\max} 598.6 nm ölçülerek 38 nm'lik bir kayma gerçekleşmiştir. Ag nanopartikül yüzeyindeki karboksil fonksiyonel gruplarından biyotin molekülü kovalent olarak bağlanmış ve LSPR λ_{\max} 609.6 nm ölçülerek 11 nm'lik bir kayma oluşmuş daha sonra hedef molekül olan streptavidinle etkileşimi sonucu LSPR λ_{\max} 636.6 nm ölçülerek 27 nm'lik bir kayma oluşmuştur. Bu şekilde dalga boyu kaymasına dayanan nanopartikül esaslı sensörler literatürde çok sayıda yer almaya başlamıştır (Haes, 2004).

Haes ve arkadaşları, nanoküre litografi yöntemiyle basit ve ucuz bir yöntemle boyut ve şekil kontrollü array sistemi oluşturmuşlardır. Cam substrat yüzeyi

üzerine eş boyutlu polistiren nanoküreleri çöktürüp, nanoküre maskesi üzerine ısı ya da ışık saçılması yöntemiyle metal yükleme yapıp daha sonra polistiren nanoküreler uzaklaştırılarak iki boyutlu eş büyüklükte üçgen prizma yapısında nanopartiküllerden oluşan cam substrat yüzeyinde array yapıları oluşturmuşlardır. Aynı yöntemle Ag üçgen prizma nanopartikülleri oluşturarak dinitrofenil molekülünü partikül yüzeyine kimyasal olarak bağlayıp anti difenil içeren çözelti ile etkileştirmişlerdir. Bağlanma sonucu oluşan dalga boyundaki kaymayı tayin ederek bağlanma katsayısını belirlemişlerdir (Haes, 2004).

Haes ve arkadaşları Alzheimer hastalığını gösteren amiloid türevli olan ADDL (Amyloid-derived diffusible ligand) molekülünü LSPR sensörü ile tayin etmişlerdir. Cam substrat üzerine yerleştirilmiş gümüş üçgen prizma nanopartikülü 11-merkaptoundekanoik asitle fonksiyonlandırılıp karbodimid reaksiyonu ile anti ADDL antibadisini kovalent olarak partikül yüzeyine bağlamıştır. Anti ADDL molekülü ile modifiye edilmiş Ag nanopartiküllerin yüzey plasmon rezonansını ölçüp ADDL antibadisini içeren çözelti ile 30 dakika inkübe ettikten sonra yüzey plasmon rezonansındaki değişimi ölçmüştür. Tekrar anti ADDL molekülü ile etkileştirerek sandaviç yapıyı oluşturmuştur. Bu şekilde hem insan beyni ekstraktı hemde sentetik ADDL molekülü ile çalışmaları gerçekleştirerek kısa sürede yüksek hassasiyetle Alzheimer hastalığının LSPR biyosensörü ile tayin edilebileceğini belirtmiştir (Haes, 2005).

LSPR sensörü ile birden fazla hedef molekül aynı anda ucuz, basit küçük bir çip üzerinde, kısa sürede daha az analit hacmi ile tayin edilebilmektedir. Yonzon ve arkadaşları, LSPR karbonhidrat sensörü geliştirmişlerdir. 35 nm ve 75 nm yüksekliğine sahip iki Ag üçgen prizma nanopartikülü tek bir cam substrat yüzeyinde oluşturduktan sonra 75 nm yüksekliğine sahip Ag partikülü 5 mM mannoz ile modifiye etmişlerdir. Konkovalin A ile inkübe ettikten sonra dalga boyunda 5nm'lik kayma oluşmuştur. 35 nm yüksekliğindeki Ag partikülleri 5 mM galaktoz ile modifiye edilip konkovalin A ile inkibasyonu sonunda dalga boyunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Konkovalin A mannoza spesifik olduğu için sadece mannoz takılı partikülün dalga boyunda değişim olmuştur. Yonzon ve arkadaşları bu çalışmaya dayanarak LSPR sensörünün hassasiyetinin yüksek olduğunu ve bir substrat üzerinde birden fazla hedef molekülün tayin edilebileceğini vurgulamışlardır (Yonzon, 2004).

Nath ve arkadaşları, 12-48 nm aralığında küresel altın nanopartikül sentezleyerek etiket gerektirmeyen çip formatında nanoSPR biyosensörü geliştirmişlerdir. Substrat olarak cam kullanıp bunları uygun yöntemler ile temizledikten sonra aminopropiltrioksilan (APTES) ile muamele ederek aminle fonksiyonlandırılmış sensör çipi üzerinde 39 nm boyundaki altın nanopartikül süspansiyonu 24 saat inkübe edilmiştir. Partikül yüzeyinde de karboksil grubu oluşturmak için merkaptopropiyonik asit (MPA) ile etkileştirilmiştir. Yüzeydeki karboksil gruplarına karbodiimid reaksiyonu ile amin uçlu biyotin takılarak streptavidin tayininde kullanılmak üzere lokalize yüzey plasmon değişimi ölçümüne dayanan metal nanopartiküllerin optik özelliğinden faydalanarak nanoSPR biyosensörü geliştirilmiştir (Nath, 2004).

Altın nanoçubukların lokalize yüzey plasmon özelliklerinden yararlanarak hastalık teşhisi ve ilaç araştırmaları gibi uygulamalar için geliştirilen çeşitli biyosensör sistemleri oluşturulmuştur. Chen ve arkadaşları elektrokimyasal yöntemle altın nanoçubukları sentezlemişlerdir. Cam slayt yüzeyini merkaptopropiltrimetoksilan (MPTMS) ile muamele edip tiyol uçlu substrat hazırlamışlardır. Bu cam slayt yüzeyine altın nanoçubukları immobilize edip nanoçubuk yüzeyinde sistamin tek tabakası oluşturmuşlardır. Karbodiimid reaksiyonu ile biyotin bağlayarak biyotin-streptavidin etkileşimini ortamın refraktif indeksinin değişimine bağlı olarak SPR spektrumundaki pik kaymasını UV-görünür spektrofotometresi ile incelemişlerdir. Bu şekilde herhangi bir örnek hazırlamaksızın kan içindeki çok düşük derişimdeki analitlerin birkaç dakika gibi kısa bir sürede tayin edilebileceği biyosensörlerin oluşturulabileceği bildirilmiştir (Chen, 2007).

Huang ve arkadaşları, etiket gerektirmeyen altın nanoçubukların lokalize yüzey plazmon rezonansına dayalı optik biyosensör geliştirmişlerdir. Çekirdek geliştirme yöntemiyle sentezledikleri altın nanoçubukları tiyol uçlu cam slayt üzerine immobilize ederek yüzeyine keçi IgG antibadisi takarak lokalize yüzey plasmon rezonansındaki pik kayması ile antijen-antibadi etkileşimini tayin etmişlerdir. Proteomiks ve in vitro tanı ve teşhis uygulamalarında LSPR sensörlerin kullanılabilceği belirtilmiştir (Huang, 2009).

Haes ve arkadaşları ayrıca nanoküre litografi yöntemiyle hazırladığı Ag üçgen prizma partiküllerini çözelti faza alarak çözelti faz Ag üçgen prizma nanopartikülleri

hazırlamışlardır. Nanoküre litografi yöntemiyle cam yüzey üzerinde oluşturulan nanopartiküller alkantiyol etanol çözeltisi ile 48-96 saat inkübe edilmiştir. Alkantiyol molekülleri nanopartikül yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturmuştur. Daha sonra nanopartiküller etanol çözeltisinde 3 dakika sonike edilerek substrat yüzeyinden koparılıp çözelti faza alınmıştır. Çözeltiye alkantiyol ilave edilerek nanopartiküllerden dimer yapıları oluşturulmuştur. Her aşamada yüzey plasmon rezonans spektrumları incelenerek çözelti içinde dimer yapısı oluşturan nanopartiküllerin LSPR spektrumlarında önemli bir değişim gözlenmiştir. Haes ve arkadaşları, çözelti fazdaki bu dimer yapılar ile sandaviç yapıda biyolojik hedeflerin tayin edilebileceğini ve canlı sistemlerde nanobiyosensörlerin geliştirilebileceğini belirtmişlerdir (Haes, 2004).

2.5.2. Süspansiyon Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Süspansiyon esaslı array sistemi basit fakat henüz güçlü bir yöntem değildir. Biyosensör çalışmasında en çok çalışılan moleküller sulu fazda biyolojik moleküllerdir. Analit molekül ile hedef molekülün birbirine bağlanmasını hassas ve spesifik bir şekilde belirleyecek sistemler gerekmektedir.

Aggregasyon esaslı tayin yöntemleri klinik çalışmalarda çok kullanılmaktadır. Lateks çökme testi (LAT) olarak bilinen test ilk olarak 1956 yılında geliştirilmiştir (Singer, 1956). Lateks çökme testi ve buna benzer testlerde lateks mikroküreler biyomoleküler spesifik antibadiler ile fonksiyonlandırılıp mikroküre proplar hazırlanır. Kan ya da üre gibi hedef antijeni içeren çözelti ile bu mikroküre proplar etkileştirilerek antibadi-antijen etkileşimi sonucu lateks kürelerinde gözle görünen çökme izlenerek tayin gerçekleştirilir. Lateks çökme testi etkili ve 15 dakika ile 1 saat gibi kısa sürede tayin gerçekleştirilebilen hızlı bir yöntemdir. Dedektör olarak insan gözlemi ve yüksek derişimde analit gerektirmesi nedeniyle çok hassas bir yöntem değildir.

Süspansiyon esaslı LSPR sensörlerinin yüzey esaslı LSPR sensörlerinden farkı herhangi bir substrat kullanmadan süspansiyon içinde tayinin gerçekleştirilmesidir. Süspansiyon esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) sensörleri ile tanı, partiküller arası etkileşim sonucu ortamın refraktif indeksinin değişimine bağlı

olarak lokal yüzey plazmon rezonansındaki değişimle gerçekleştirilmektedir. Lokal yüzey plasmon rezonansındaki değişim de UV-görünür bölge ve rezonant Rayleigh saçılım spektroskopisi ile incelenmektedir.

Son zamanlarda, altın nanopartikül esaslı UV-görünür bölge tekniği ile DNA tayin edilmektedir. Altın yüzeyine takılan oligonükleotit dizisinin eşlenik DNA dizisi ile hibridizasyonu sonucu absorbanans spektrumunda dolayısıyla çözelti renginde renk değişimi oluşmaktadır. Kalorimetrik tayin yöntemi olarak bilinen bu yöntemle hedef oligonükleotit femtomol gibi düşük derişimlere kadar tayin edilebileceği bildirilmiştir. Nanopartiküllerin aggregasyonuna dayanan tayin yöntemlerinin geleneksel floresan esaslı yöntemlere göre 100 kat daha hassas olduğu da belirtilmiştir (Taton, 2000).

Resonant Rayleigh ışık saçılmasına dayalı tayin kalorimetrik tekniğe göre daha kuvvetli olmasına karşın henüz çok fazla bu konu ile ilgili yayın bulunmamaktadır. 60 nm boyutundaki altın nanopartiküllerinden bir kısmına insan anti-IgG ile bir kısımda insan IgG 'si takılarak antijen ve antibadi yüklü bu iki altın nanopartikülü bir test tüpü içinde karıştırılıp dijital kamera ile görüntülenmiştir. Altın yüzeyindeki proteinler eşlenik proteini ile etkileşimi sonucu partiküller bir araya gelmiş ve lokalize yüzey plasmon rezonansında "red-shift" olarak adlandırılan kırmızıya kaymaya neden olmaktadır. Başta yeşil renk olan çözelti rengi antijen-antibadi etkileşimi sonucu bir araya gelen altın nanopartiküller nedeniyle 15 dakika içinde turuncuya dönmüştür. Bu renk değişimi ile antijen-antibadi etkileşimi tayin edilmiştir. Bu tarz tayin yöntemlerinin dezavantajları, nanopartikül agglomerasyonunun analit-hedef molekül arası etkileşim sonucu olup olmadığının net olarak bilinmemesi, tersinir olması ve nicelleştirmenin zor olmasıdır. Bu dezavantajları nedeniyle daha çok bir substrat yüzeyine nanopartiküllerin yerleştirilmesiyle yüzeyde gerçekleşen bağlanma sonucu oluşan lokalize plasmon rezonansındaki kaymaya dayanan biyosensörler geliştirilmiştir (Roll, 2003).

Wang ve arkadaşları, iki farklı boy/çap oranına sahip amin fonksiyonel uç grup taşıyan altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. Nanoçubuklardan birine anti-Ecoli diğerine anti-S. Typhimurium immobilize ederek E-coli ve S. Typhimurium patojenlerini tayin etmek için nanoçubuk problemleri hazırlamışlardır. Bu iki tip nanoçubuk karışımını E-coli ve S. Typhimurium bakteri karışımı ile karıştırarak

UV-görünür bölge spektroskopisi ile plasmon rezonans dalga boyundaki kayma incelenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda her iki tip nanoçubuk probun ilgili spesifik antibadiye bağlanması sonucu eksenel plasmon dalga boyunda kayma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu yöntem ile basit, hızlı, ucuz, 30 dakika gibi kısa bir sürede, ekstra kompleks bir cihaza gerek kalmadan birden fazla patojenin eş zamanlı tayin edilebileceğini belirtmişlerdir (Wang, 2008).

Yu ve arkadaşları, çekirdek geliştirme yöntemiyle farklı boy/çap oranına sahip üç altın nanoçubuk sentezlemişlerdir. Her bir nanoçubuğa üç farklı antibadi (monoklonal insan IgG, monoklonal sıçan IgG, monoklonal koyun IgG) immobilize ederek üç farklı nanoçubuk problemleri hazırlamışlardır. Her üç farklı probu üç farklı hedefin bulunduğu antibadi karışımı ile inkübe ederek her bir nanoçubuk probun ilgili hedef molekülüne bağlanması sonucu eksenel plasmon piklerindeki dalga boyu kaymalarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda, altın nanoçubukların boyuna bağlı olarak gösterdikleri farklı optik özelliklerinden faydalanarak basit, hassas ve bir deney tüpü içinde birden fazla biyolojik hedefin tayin edilebileceği bir test tüpü içinde laboratuvar (lab-in-a-tube) tabir edilen biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Yu, 2006).

Pan ve arkadaşları, çekirdek geliştirme yöntemiyle boy/çap oranı 3 ve 8 olan altın nanoçubuklar oluşturmuşlardır. Yüzeyine sığır serum albumin (BSA) immobilize ederek triptofan ile altın nanoçubuk-albumin etkileşimi sonucu floresan özelliği incelenmiştir. Altın nanoçubuk derişimi arttıkça floresan yoğunluğunun arttığını gözlemlemişlerdir. BSA'nin altın nanoçubuğa bağlanma sabiti ve bağlanma kapasitesini triptofana floresan özelliğini artırarak incelemişlerdir (Pan, 2007).

2.6. Yüzey Plasmon Rezonans (SPR) Biyosensörü

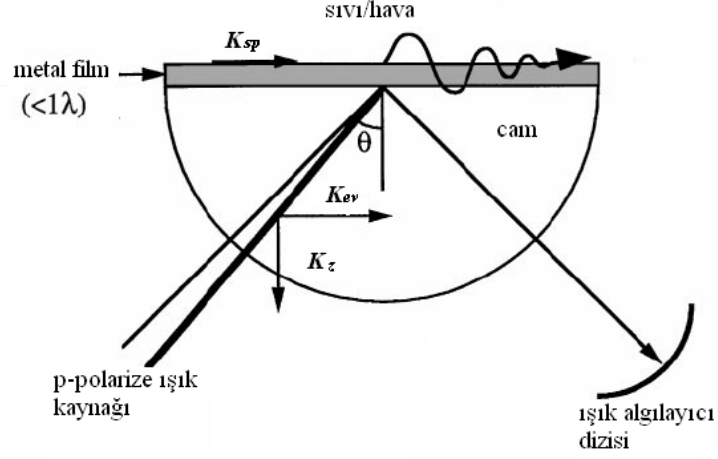
SPR, sensör yüzeyinde antijen-antibadi ya da nükleik asit eşleşmeleri gibi çeşitli nedenlerden oluşan ve SPR yüzeyinde biriken biyolojik filmler nedeniyle kırılma indisindeki ("refractive index", RI) küçük değişiklikleri belirleyebilen ve çok sıkça kullanılan bir analitik ölçüm cihazıdır. SPR etiketsiz çalışan bir yöntem olduğu için tayin edilecek biyomolekülün herhangi bir etikete ihtiyacı olmamaktadır. 30 yılı aşkın bir süredir kullanıldığından, SPR ile ilgili pek çok farklı çalışma ve geliştirme yapılmıştır. Tüm çalışmalar sonucunda günümüzde SPR, kimyasal ve biyolojik

etkileşimlerin incelenmesinde kullanılan etiketsiz bir karakterizasyon ve tayin metodu olarak kabul edilmekte ve kullanılmaktadır (Duman, 2007).

SPR Teorisi

Yüzey plazmonu, biri metal (iletken) ve diğeri de dielektrik (yalıtkan) olan iki ortamın ara yüzeyi boyunca yayılan ve düzlem boyunca ilerleyen yük yoğunluğudur. Metal serbest elektron modeline uygun olarak serbest elektron davranışı göstereceğinden kullanılan metalin türü çok önemlidir. Yüzey plazmonu yaratmak için uygun metaller arasında gümüş, altın, bakır, alüminyum, platin gibi metaller mevcuttur ve altın ile gümüş literatürde sıkça rastlanılan metallerdir. Gümüş, keskin bir SPR eğrisi verdiği için, altın ise daha kararlı olduğu için tercih edilir. Yüzey plazmonunun uyarılması için Otto (1968) ve Kretchmann (1971) tarafından iki farklı optik düzen geliştirilmiştir. Ancak, Kretchmann tarafından geliştirilen, azaltılmış tam yansımaya ("attenuated total reflection", ATR) düzeni, çoğu SPR cihazının tasarımında kullanılan bir yapıdır.

SPR cihazının temeli olan Kretchmann düzeninde, (Şekil 2.15.) optik olarak daha yoğun olan bir ortamdan (örneğin cam) gelen ışığın, optik olarak daha az yoğun bir ortam (örneğin hava veya ince altın film) ile daha yoğun ortam ara yüzeyinden geçemeyerek yoğun ortama geri yansımaya ile ortaya çıkan "içten tam yansımaya" prensibi kullanılır. Gelen ışık tamamen yansımaya karşın, bu ışığın manyetik bileşeni, yaklaşık bir dalga boyu mesafe ile daha az yoğun olan ortam içerisine nüfuz eder.



Şekil 2.15. Yüzey plazmon rezonansı oluşturmak için Kretschmann düzeneği.

SPR, bu iç yüzeye geçiş yapan manyetik alanın, SPR yüzeyinde kullanılan metaldeki serbest elektronları uyarması sonucu ışık şiddetindeki değişimi ölçen bir cihazdır. Tam yansıma sonucu elde edilen sönümlü dalganın dalga vektörü Eşitlik 2.1.' deki gibi verilir.

$$K_{ev} = \frac{\omega_o}{c} \eta_g \sin \theta \quad (2.1.)$$

Burada, K_{ev} ; sönümlü dalganın dalga vektörü, ω_o ; gelen ışığın frekansı, c ; ışığın boşluktaki hızı, η_g ; optik olarak yoğun ortamın (örneğin cam) kırma indisi, θ ; ışığın geliş açısıdır.

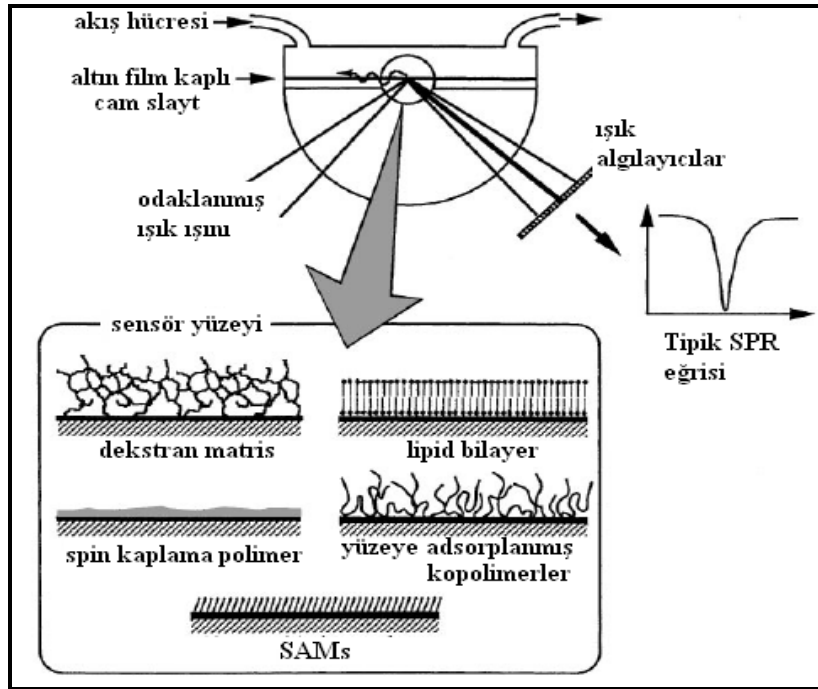
Yüzey plazmonunun dalga vektörü ise eşitlik 2.2.' deki gibi ifade edilir:

$$K_{sp} = \frac{\omega_o}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad (2.2.)$$

Burada, K_{sp} ; yüzey plazmon dalgasının dalga vektörü, ω_o ; gelen ışığın frekansı, c ; ışığın boşluktaki hızı, η_s ; dielektrik ortamın (örneğin çözelti) kırma indisi, ϵ_m ; metal filmin dielektrik sabitidir.

Gelen ışık ile metal filmde-serbest salınım yapan elektronlar (plazmonlar) belirli bir geliş açısında $K_{ev} = K_{sp}$ olacak şekilde rezonansa girer ve bu rezonans yüzey plazmon rezonansı olarak adlandırılır. Eşitlik 2.2.'den görüleceği gibi K_{sp} , metal filmin üst tarafındaki dielektrik ortamın kırma indisine bağlıdır. Bu nedenle, metal yüzeyi ile temasta olan biyolojik ortamın kırma indisinin herhangi bir etkileşim ile değişmesi sonucu, yüzey plazmon rezonansında bir değişiklik gözlenir.

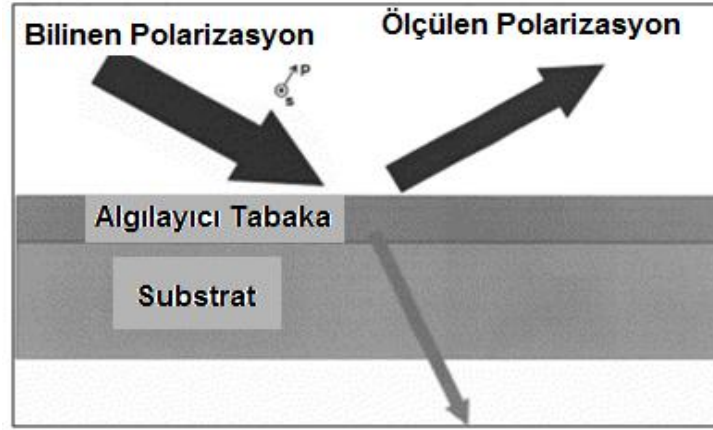
Tipik bir SPR cihaz konfigürasyonu ve yüzey modifikasyonların çeşitli örnekleri Şekil 2.16.'da verilmiştir.



Şekil 2.16. Tipik SPR konfigürasyonu ve sensör modifikasyonu tiplerine örnekler.

2.7. Elipsometrik Sensörler

Elipsometre, polarize monokromatik ışık düzlem dalgasının belirli bir açıda bir yüzeyden yansıması ile elde edilen polarizasyon değişiminin ölçülmesine dayanır.



Şekil 2.17. Elipsometre temelli algılamanın şematik gösterimi.

Elipsometre dolaylı ölçüm tekniğidir ve yüzey hakkında gerekli bilgi ölçülen parametrelerin optik bir modelde çözümlenmesi ile elde edilir. Temel büyüklüklerden birisi, ince bir tabakanın veya bir substratın kompleks dielektrik fonksiyonudur. Bazı durumlarda kompleks kırınım indisi değerinin kullanılması daha uygun olabilir.

Spektroskopik ölçümlerde bu parametreler foton enerjisinin bir fonksiyonudur. Elipsometre ile hesaplanan bir diğer temel özellik ise tabakanın kalınlığıdır (d). Çok katmanlı örneklerde birkaç tabakanın kalınlığı bilinemeyebilir.

Biyolojik tabakalar genellikle kırınım indisi düşük ve tipik olarak kalınlıkları nanometre mertebesinde olan tabakalardır ve biyolojik tabakalar elipsometre ile incelenmeye uygundur. Yansıma katsayıları, substrat ve üst tabakaların optik özellikleri ile bileşimine, kalınlık ve morfolojisine ve yüzey pürüzlülüğüne bağlı olduğundan, elipsometre tekniği ile yapılan ölçümler özellikle biyolojik moleküllere zarar vermez. Elipsometrik sensörler herhangi bir işaretleme tekniği gerektirmeden biyolojik etkileşimleri inceleyebilmektedir. Literatürde, elipsometre temeline dayanan optik biyosensörler ile çalışmalar bulunmaktadır. Bu tip elipsometrik

sensörler ile antikor-antijen bağlanmasının ve enzimatik reaksiyonlar izlenebilmektedir. Bu tür biyosensörlerde analitik olarak bazı sorunlar bulunmakla beraber sensörlerin çalışma temeli biyo-özgünlüğe dayanmaktadır. Ancak farklı moleküllerin tayini ve ayrımı, çoklu sensör verisinin alınması ile sistemin özgünlüğü arttırılabilir. Biyoçip olarak adlandırılan, belirli bölgelerde biyo-özgün alanlar içeren test yüzeyleri bu amaç için kullanılabilir. Antijen-antikor bağlama çalışmalarında, bir seri antijen ya da antikor daha önceden belirlenmiş bölgelere immobilize edilir. Bu bölgelerin sayısı, aynı floresans-temelli biyosensörlerde olduğu gibi binlerce olabilir. Tamamen geliştirilmiş bir sistemde, en küçük spotun boyutu ve yeri bir görüntüleme sistemi yardımıyla belirlenebilir. Antikor ve antijen arasındaki etkileşim, etkileşim öncesi ve sonrası elipsometre ile ilgili alanın kalınlığının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Grubumuz tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, elipsometre bir DNA sensörü olarak kullanılmıştır (Demirel, 2008). DNA hibridizasyonunun, incelenen bölgenin kalınlığını değiştirmediği bilinen bir gerçektir. Hibridizasyon sonrası, bağlanma bölgesinin yoğunluğu ve dielektrik sabiti değişmekte, bu değişimde elipsometrik olarak etkileşimin incelenmesine olanak tanımaktadır.

2.8. Array ve Array Platformlarının Oluşturulması

Günümüzde nanoteknoloji ile ilgili çalışmalarda öncelikli konular arasında yer alan array teknolojileri sürekli gelişmektedir. Tıp, araştırma, gıda, çevre, tarım ve hayvancılık gibi birçok alanda uygulama alanı bulunan array teknolojilerinde en önemli ve kritik kısım “tanı”nın yapılmasıdır. Örneğin gıda ürünlerinin ve çevredeki kirliliğin (örneğin mikrobiyal kökenli) tanısı zorunlu/kaçınılmazdır; tıp alanında da birçok hastalığın önce tanısı yapılır daha sonra tedavi uygulanır. Bugüne kadar birçok alanda kullanılan klasik laboratuvar yöntemleriyle yapılan tanılar zor ve uzun sürelidir. Bu yöntemler kullanılarak “*bir tanı bir test*” ile (test kiti ile) yapılır. Günümüz teknolojisinde ise tanı moleküler düzeyde yapılmaktadır. Moleküler düzeyde tanı klasik laboratuvar yöntemleriyle karşılaştırıldığında çok daha zor ve pahalıdır. Array teknolojileri “*çok sayıda örneğin aynı anda*”, çok hızlı değerlendirildiği ve dolayısıyla çoklu tanıya olanak sağlayan, çok hızla gelişen ve yaygın uygulama alanına sahip moleküler düzeyde tanı yapan önemli bir teknoloji dalıdır. Yüzey esaslı ve süspansiyon esaslı array platformları olmak üzere ikiye

ayrılmaktadır. Genel olarak bir tanı sisteminde hedef molekülü seçici olarak tanıyan bir molekül (“prob”) kullanılır ve bu bir taşıyıcı yüzeye (platforma) yerleştirilir (immobilize edilir). Tanıyıcı molekül ile hedef etkileştirilir, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyal bir çevirici ile ölçülebilir sinyale dönüştürülür ve bir cihaz ile bu sinyal ölçülerek tanı gerçekleştirilir. Array teknolojisinde çok sayıda tanıyıcı molekül array platformlarına yerleştirilerek aynı anda çok sayıda hedef molekül saptanabilmektedir. Biyolojik sistemlerde tanı için genellikle biyolojik moleküller (tek sarmal oligonükleotidler, oligopeptidler, proteinler) prob olarak kullanılır. Bunların seçiminde, yüksek saflıkta üretilmiş olmaları ve array platformlarına istenilen şekilde yerleştirilmiş olmaları kritik öneme sahiptir. Array teknolojilerinde tanının yapılması için kullanılan array platformları katı (silikon waferlar, cam slaytlar, bunların metal (özellikle altın) ya da polimer kaplı formları, polimerik membranlar/filmler) yüzeylerdir. Bu array platformları kullanım alanına ve tanısı yapılacak moleküle göre istenilen desende ve istenilen moleküle modifiye edilmektedir. Array platformu üzerine tanıyıcı molekülün yerleştirilmesinden sonra tanıyıcı molekül ile hedef molekülün etkileşmesi, hedef molekülün genellikle optikçe aktif floresan boya ile etiketlenmesi ve bu etkileşimin çeşitli optik cihazlar kullanılarak ölçümü ile gerçekleştirilir. Tanı sistemlerinde etiket kullanımı pahalı ve zor bir yöntemdir. Bu nedenlerden dolayı son zamanlarda etiket kullanmadan ölçüm yapılabilecek, örneğin kütle değişim esaslı (QCM) ve yine optik (SPR, elipsometre, vb.) cihazların array teknolojilerine uygulanması üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Glökler, 2003).

Süspansiyon-Esaslı Array Platformları

Array platformları “yüzey esaslı” ve “süspansiyon esaslı” olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Silikon, cam gibi yüzeylere prob moleküllerin immobilize edilip hazırlanan array platformları yüzey esaslı olarak tanımlanırken taşıyıcı platform olarak nanopartiküllerin kullanıldığı ve süspansiyon fazda gerçekleştirilen array sistemleri süspansiyon esaslı array platformları olarak adlandırılmaktadır. Özellikle son yıllarda “yüzey esaslı” array platformlarının yanı sıra “süspansiyon esaslı” platformlar geliştirilmiş ve ticari ürünler piyasaya sunulmuştur. (örneğin BD Biosciences (ABD), Illumina (ABD), Evident (ABD)). Bu sistemlerde farklı renklerde polimerik mikro veya nanopartiküller hatta, “quantum dot”lar kullanılır.

Farklı renkte partikül yüzeyine farklı bir tür prob immobilize edilir. Bu partiküller bir araya getirilerek “süspansiyon array platformu” oluşturulur. Süspansiyon ortamı hedef molekülleri içeren ortam ile karıştırılır ve etkileşim bir optik (lazerli) okuyuculu ile akış-sisteminde belirlenir. Özellikle nanopartiküller kullanıldığında (çok yüksek yüzey alanı nedeniyle) küçük hacimde yüksek prob derişimine ulaşmak dolayısıyla sistemin hassasiyetini önemli ölçüde artırarak çok sayıda tanıyı bu süspansiyon ortamında gerçekleştirme olanağı vardır.

1. GİRİŞ

Nanoteknoloji, tıpta devrim yaratma potansiyeline sahip yeni bir alan olarak ifade edilmektedir. Bu alanın kalbi, nanometre boyutunda nanoyapıların oluşturulup bunların boyutuna bağlı olarak gösterdikleri çeşitli eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kullanılmasına dayanmaktadır.

Nanopartiküller, yüksek yüzey alanının yanında farklı optik, elektronik, manyetik ve floresan özelliklere sahip olmalarından dolayı birçok uygulama alanına sahip üstün malzemelerdir. Manyetik nanopartiküller, altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller ve floresan özellik gösteren yarı iletken nanokristaller (Kuantum parçacıkları, Qdot) bunlara örnek gösterilebilir. Özellikle medikal alanda çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında kullanılmak üzere tasarlanan biyosensörlerde, tümör hücrelerinin erken teşhis edilmesinde bu nanopartiküllerin manyetik, optik ve floresan özelliklerinden yararlanılmaktadır.

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tanısı, çevresel kirliliklerin ve biyolojik ajanların belirlenmesi için yüksek seçicilik ve hassasiyette optik nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle Au ve Ag gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Au nanopartiküllerin kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir.

Altın nanoyapıların süspanse olduğu çözeltiler boyut ve geometrik şekillerine bağlı olarak güçlü plasmon bandları göstermektedirler (Perez-Juste, 2005). Altın nanoyapıların biyolojik reseptör (antibadi, oligonükleotit) molekülleri ile aktivasyonu sonucu dielektrik özelliklerinin değişimine bağlı olarak plasmon dalga boylarında "red-shift" denilen dalga boyu kaymasına neden olmaktadır. Bu özelliklerine dayanan birçok uygulamalar bulunmaktadır (Nath, 2004; Yonzon, 2004; Haes, 2002; Lee, 2005). Mirkin ve arkadaşları yüzeyine DNA bağlanmış altın nanopartiküllerin eşleniği ile hibridizasyonu sonucu renk değişimini gözlemleyerek DNA hibridizasyonunu tayin etmişlerdir (Mirkin, 1997; Jin, 2003; Taton, 2000). Lee ve Perez-Jana epoksi ile fonksiyonlandırılmış altın nanoyapıların yüzeyine protein bağlanması sonucu plasmon spektrumlarındaki değişimleri incelemişlerdir (Lee,

2005). Süspansiyon esaslı immunoassay geliştirmek amacıyla küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki antibadinin antijenle etkileşimi sonucu refraktif indeksinin dolayısıyla plasmon spektrumundaki değişim araştırılmıştır (Englebienne, 1998; Englebienne, 2000). Hedef molekülün bağlandığı plasmon spektrumundaki dalga boyu kayması veya belli bir dalga boyundaki absorpsiyon yoğunluğunun değişimi ile analiz edilmekte olup dalga boyu kaymasının incelenmesinin daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Yu,2006). Altın nanoçubuklar hem eksenel hem de radyal yönde plasmon bandı göstermektedirler. Özellikle eksenel yöndeki plasmon dalga boyları buldukları ortamın dielektrik özelliklerinin değişimine daha duyarlıdırlar. Örneğin ortamın refraktif indeksindeki 0.1 birimlik bir değişim bile altın nanoçubukların eksenel plasmon dalga boyunda 40 nm'lik bir dalga boyu kaymasına neden olduğu belirtilmiştir (Perez-Juste, 2005). Bu duyarlılığın altın nanoçubukların uzunluk/çap (aspect ratio) oranının artmasıyla daha çok arttığı rapor edilmiştir. El-Sayed ve arkadaşları altın nanoçubukların "aspect ratio" oranlarındaki en ufak bir değişikliğin çözelti rengine ve plasmon spektrumunda değişikliğe neden olduğunu belirtmişlerdir. Literatürde altın nanoçubukların bu özelliklerinden yararlanılarak farklı özelliklerdeki nanoçubuklarla birden fazla analitin eş zamanlı tayin edildiği multipleks biyosensörleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Yu ve arkadaşları farklı aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklara farklı antijenler bağlayarak altın nanoçubuk problemleri hazırlayarak bunların hedefleri ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boylarındaki kaymayı inceleyerek multipleks biyosensörler geliştirmişlerdir (Yu, 2006). Wang ve arkadaşları E. coli and anti-S. Typhimurium patojenik bakterilerine özgü antibadilerle hazırladıkları altın nanoçubuk problemlerin ilgili antijenleri ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyu kaymalarını inceleyerek patojenleri tayin etmişlerdir (Wang, 2008).

Ayrıca son yıllarda DNA hibridizasyonu, antijen antibadi etkileşimi gibi moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için Au film tabakası yerine Au nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektrik sabiti ve dolayısıyla refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin

gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir Au nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Ayrıca Au ve Ag nanopartiküllerinin partikül boyuna ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermesi nedeniyle birden fazla analitin eş zamanlı tayininde yapıldığı SPR biyosensörleri de geliştirilmektedir.

Sunulan bu çalışmada üç farklı nanopartikül üretilmesi amaçlanmıştır. Bunlardan birincisi son yıllarda çok yoğun bir şekilde araştırmalar yapılan, özellikle nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan ve kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) bağlanabilen altın nanopartiküllerdir. Bunların farklı boyut ve şekillerde üretilmeleri, hem mikroemülsiyonlar ve hem de cam taşıyıcı yüzeylere tek tabakalı adsorbe edilerek, alternatif DNA tanı kitleri ve nanoarrayler geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamındaki çalışmalarda nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) takılabilen küresel ve çubuk formunda altın nanopartikül ve nanoçubuklar, çekirdek/kabuk formunda altın kaplı manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4/Au) olmak üzere üç farklı nanopartikülün sentez ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu nanopartiküllerin mikroemülsiyon fazda tanı kitleri veya nanoarray sistemlerinde ve cam gibi taşıyıcı yüzeylere adsorbe edilerek SPR destekli elipsometrik biyosensörlerinde kullanılabilirlikleri olmak üzere iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti veya nanoarray çalışmalarında seçilen dört tip altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyollu oligonükleotitler immobilize edilerek nanopropalar hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) ve *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır. Öncelikle sentezlenen farklı şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin optik özellikleri incelenenip yüzeylerine farklı derişimlerde prob oligonükleotitler immobilize edilerek optik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Daha sonra prob takılı bu altın nanopartiküller farklı derişimlerde hedef (komplementer) oligonükleotitleri ile

etkileştirilerek, optik özelliğindeki değişimler izlenerek hibridizasyonun olup olmadığı izlenmiştir. Ayrıca sistemin hassasiyetini araştırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin eşleniği olmayan bir oligonükleotit ile etkileştirilerek hem dalga boylarındaki kayma hem de floresan sinyal şiddetindeki değişimler incelenmiştir. En son aşamada yüzeyinde farklı problemler takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar (“nanoarrayler”) hazırlanmıştır. Bu mikroemülsiyon karışımlarına sadece birinin hedefini içeren oligonükleotit çözeltisi eklenerek hedef oligonükleotitin ilgili probunu içeren nanopartikülün plasmon dalga boyundaki kaymalar incelenmiştir. Bu şekilde altın nanopartiküllerin (farklı şekil ve boyutta) optik özelliklerinden faydalanarak mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmuştur. Bir test tüpü içerisinde birden fazla analitin eş zamanlı tayin edilebileceği (lab-in-a-test-tupe) multipleks biyosensörleri geliştirilmeye çalışılmıştır.

SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında öncelikle taşıyıcı destek materyali olarak kullanılacak cam slaytlar öngörülmüş uygun yöntemle temizlenmiştir. Temizlenmiş cam slaytlar 6-Merkaptopropilmetoksisilan (MPTS) çözeltisiyle silanize edilip tiyol uç grubundan dört tip altın nanopartikülün kimyasal olarak immobilizasyonu sağlanmıştır. Farklı derişimlerde (0.25-1.0 (%v/v)) dört tip altın nanopartikülün cam yüzeyine immobilize edilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle cam slayt yüzeyini tek tabaka kaplıyacak şekilde optimum nanopartikül derişimi belirlenmiştir. Daha sonra optimum derişimde cam yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiş altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlar, SPR sisteminde taşıyıcı matris olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış altın nanopartiküllerle genişletilmiş cam slaytlara dört farklı derişimde (0.25-2.0 μM) *M. Gordanae* patojenik bakterisine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum prob derişimi belirlenmiştir. Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış cam slaytlara daha sonra dört farklı derişimde problemlerin hedefi olan oligonükleotitler göndererek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle hibridizasyon sonucundaki kalınlık değişimi incelenmiştir. Ayrıca optimum hedef oligonükleotit derişiminde hedef olmayan oligonükleotit çözeltisi gönderilerek sistemin seçiciliği incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

Yunanca'da cüce anlamına gelen "Nano" bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biri olup, bir nanometre yaklaşık 2–3 atomun yan yana dizilmesiyle elde edilen uzunluktur. Nanoteknoloji, 1 ila 100 nanometre boyutları arasında olan nanoyapıların araştırılıp, teknolojilerin geliştirilmesidir. Atomik skalada yapılan bu araştırmalar sonucu oluşan gelişmeler insan sağlığında nanoteknolojiden kaynaklanan tekniklerin uygulanmasıyla Nanotıp (Nanomedicine) olarak adlandırılan yeni bir disiplin ortaya çıkarmıştır. Tıpta devrim yaratma potansiyeline sahip yeni bir alan olarak ifade edilmektedir. Bu alanın kalbi, nanometre boyutunda nanoyapıların oluşturulup bunların boyutuna bağlı olarak gösterdikleri çeşitli eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kullanılmasına dayanmaktadır.

Nanopartiküller, yüksek yüzey alanının yanında farklı optik, elektronik, manyetik ve floresan özelliklerinden dolayı birçok uygulama alanına sahip üstün malzemelerdir. Altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller, floresan özellik gösteren yarı iletken nanokristaller (Quantum Dots) ve manyetik nanopartiküller bunlara örnek gösterilebilir. Özellikle medikal alanda çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında kullanılmak üzere tasarlanan biyosensörlerde, tümör hücrelerinin erken teşhis edilmesinde bu nanopartiküllerin optik, floresan ve manyetik özelliklerinden yararlanılmaktadır.

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tanısı, çevresel kirliliklerin ve biyolojik ajanların belirlenmesi için yüksek seçicilik ve hassasiyette optik nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle Au ve Ag gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Au nanopartiküllerin kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir. Son yıllarda DNA hibridizasyonu, antijen antibadi etkileşimi gibi moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için Au film tabakası yerine Au nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektirik sabiti ve dolayısıyla

refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir Au nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Ayrıca Au ve Ag nanopartiküllerinin partikül boyuna ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermesi nedeniyle birden fazla analitin eş zamanlı tayininde yapıldığı SPR biyosensörleri de geliştirilmektedir.

Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanılarak kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu özelliklerinden dolayı birçok biyomedikal uygulamalarda kullanımı artmaktadır. Bu amaçla manyetik özellik taşıyan (manyetit (Fe_3O_4), maghemit (Fe_2O_3), kobalt (Co), nikel (Ni) gibi) inorganik maddeler ile yüklü sentetik (polistiren, polivinilalkol, poliakrilamid, poliakrilik asit gibi) ve doğal (kitosan, aljinat, dekstran gibi) polimerik partiküller üretilmekte ve bunları ticari olarak bulunabilmektedir. Son yıllarda manyetik çekirdeğin oksidasyonunu önleyerek inert bir yapı oluşturmak ve biyolojik çalışmalara uyumlu hale getirmek için altın, gümüş gibi metalik yapılarla kaplayarak manyetik özellik gösteren altın kaplı nanopartiküller oluşturulmuştur. Böylece birçok biyomedikal uygulamalar da hem altın kabuğun optik özelliğinden hem de manyetik çekirdeğin manyetik özelliğinden yararlanılmaktadır.

Manyetik nanopartiküller; hücre ayrılması ve saflaştırılması, kontrollü ilaç salımı, RNA-DNA saflaştırılmasında kullanılmaktadır. Klinik teşhis ve tanılarda çok kullanılan Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) tekniğinde manyetit (Fe_3O_4), maghemit (Fe_2O_3) gibi inorganik bir madde ve bunların dekstran gibi bir polimerle kaplanmasından oluşan süperparamanyetik nanopartiküller MRI'de sinyal şiddetini artırıcı ajan olarak kullanılmaktadır. Bu nanoyapıların bir tarafına tümör hücrelerinin çok tükettiği bilinen folik asit grupları diğer tarafına da kemoterapi de kullanılan zehir molekülleri bağlanarak nanoboyutta Truva Atı yapıları hazırlanabilmektedir. Tümör hücreleri, yüzeyinde folik asit taşıyan manyetik nanopartikülleri emerken beraberindeki zehir molekülünü de bırakarak sağlıklı hücreler fazla zarar görmeden sadece kanserli hücrelerin öldürülmesi sağlanabilmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan kemoterapi de kanser hücrelerinin yanında sağlıklı hücrelerde zarar görmektedir. Bu şekilde manyetik

nanopartiküllerin bu yan etkileri ortadan kaldırmasıyla kanser tedavisinde ümit verici sonuçlar elde edilebileceği düşünülmektedir. Ayrıca çağımızın hastalığı olan çeşitli kanser hastalıklarının erken teşhis edilmesinde de kanser hücrelerini tanıyabilen spesifik çeşitli biyomolekülleri (peptit, oligonükleotit, enzim ve antibodiler gibi) manyetik nanopartiküllerin yüzeyine immobilize ederek manyetik nanopropolar hazırlanabilmektedir. Bu problemlerin hücre içindeki hedef molekülleri tanıdığına, partiküllerin oraya birikmesi ile MRI sinyal şiddetinde artma olur. Bu teknikle çeşitli kanser hastalıklarının erken teşhis edilebileceği umut edilmektedir. Yüzeyinde kanser hücrelerine spesifik antibodiler içeren manyetik nanopartiküller, kanser hücrelerine yönlendirilerek uygulanan dalgalı manyetik alan etkisiyle bir ısı oluşturulmaktadır. Manyetik ısıtma (Hyperthermia) olarak adlandırılan bu yöntemle de kanser hücreleri öldürülebilmektedir.

Son zamanlarda eşsiz optik ve kimyasal özellikleri nedeniyle bütün ilgiyi üzerine çeken bu nanoyapılardan biri de yarı iletken maddelerden oluşan kuantum noktacıları (Quantum Dot) olarak adlandırılan nanokristallerdir. Mordan koyu kırmızıya kadar gökkuşağının bütün renklerinde ışımaya yapan bu nanokristaller geniş bir uygulama alanına sahiptir. Kuantum noktacılarının nanoboyutta olmaları, yüksek fotostabiliteye sahip olmaları ve boylarına bağlı olarak ayarlanabilir bir emisyon özelliği göstermeleri gibi özellikler kuantum noktalarının biyolojik, biyomedikal ve biyoanalitik görüntüleme uygulamalarında ideal bir prop olarak kullanılmasını sağlamaktadır.

“Quantum Dot”lar, periyodik cetveldeki II-VI (CdSe, CdTe, CdS, and ZnSe), III-V (InP ve InAs) ve IV-VI (PbS, PbSe) cı grup elementlerinden sentezlenen yarı iletken maddelerden oluşan monodispers inorganik nanokristallerdir. Bu partiküller yaklaşık 10 -50 atom içeren 2-10 nm boyundaki renkli kristallerdir. Ayrıca bunlar ‘yapay atomlar’ olarak da adlandırılmaktadırlar. Çekirdek ve çekirdek-kabuk yapısında olmak üzere iki tip Qdot yapısı vardır. Çekirdek CdS, CdSe, CdTe gibi maddelerden oluşabilmektedir. Çekirdeği oluşturan madde nanokristalin hangi renkte ışık yayacağını belirlemektedir. Çekirdek/kabuk yapısındaki “Qdot”ların çekirdeği ZnS gibi inorganik bir kabuk tarafından korunmaktadır. Kabuk olarak kullanılacak madde çekirdekte kullanılan maddenin enerji band boşluğundan daha büyük bir band boşluğuna sahip maddeden oluşmaktadır. Kabuğu oluşturan

madde nanokristali stabilize eder, kuantum verimini yani ışığın floresan şiddetini artırır, ışık degradasyonunu azaltır. Bu nanokristaller uygulama alanına göre çeşitli polimerlerle kaplanarak oligonükleotitler, peptidler ve antibadiler gibi biyolojik moleküllerle fonksiyonlandırılarak değişik Qdot problemleri hazırlanabilmektedir.

“Qdot”lar, geniş uyarılma ve dar emisyon spektrumuna sahiptirler. Qdotların çekirdeğinin bileşimi ve boyu değiştirilerek geniş bir aralıkta emisyon spektrumu ayarlanabilmektedir. Dolayısıyla farklı boy ve bileşimdeki nanokristaller tek bir ışık kaynağı altında uyarılarak farklı renklerde ışık yaymaları sağlanabilmektedir. Ayrıca Qdotlar peptitler, antibodiler, nükleik asitler gibi biyolojik moleküllere kovalent olarak bağlanabilmektedir. Bu özelliklerinden yararlanarak çoklu Qdot problemleri hazırlanarak birden fazla molekül eş zamanlı olarak analiz edilebilmektedir. Qdotların organik boyalara göre kuantum verimleri (QY) daha iyi yani daha parlak ışık yaymaktadır ve fotokimyasal kararlılığı (photochemical stability) daha yüksektir. Bu özelliklerinden dolayı Qdotlar özellikle uzun süreli ve yüksek duyarlılıkta görüntüleme ve çoklu etiketleme gibi birçok biyolojik uygulamalarda floresan etiket olarak kullanılmaktadırlar. Çoklu analizlerde kullanılacak her bir boyanın tipine bağlı olarak farklı bir ışık kaynağı gerektirmesinden çoklu analizler için uygun değildirler. Her bir boyanın geniş bir emisyon spektrumu vardır. Dolayısıyla farklı organik boyaların emisyon spektrumlarının birbirini kapatmasından dolayı hassas değildirler. Ayrıca organik boyalar uzun süreli floresan özellik göstermezler. Organik boyaların etiket olarak kullanıldığı sistemlerdeki bu tür dezavantajları ortadan kaldıran eşsiz optik ve kimyasal özelliklere sahip QDot’lar çoklu analizler için ideal etiketlerdir.

Yapılan son çalışmalarda hem manyetik nanopartiküllerin manyetik özelliğinden hemde Qdot’ların optik özelliklerinden faydalanmak amacıyla magnetofluoresans nanopartiküller (magnetofluorescent nanoparticle) olarak adlandırılan nano hibrid yapılar oluşturulmuştur. Manyetik özellik gösteren bir çekirdek ve bunun etrafında Qdot nanokristalleriyle kaplandığı çekirdek/kabuk yapısındaki bu nano yapıların kanser hücrelerinin belirlenip ayrılması gibi birçok biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceği düşünülmektedir.

Görüldüğü gibi boyut olarak gözle görülmeyecek kadar çok küçük olmalarına karşın işlevleri açısından büyük işler başaran bu nanopartiküllerin biyomedikal alanda daha birçok gelişmeler sağlayacağı bir kaçınılmazdır. Çizelge 2.1’de nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları gösterilmiştir.

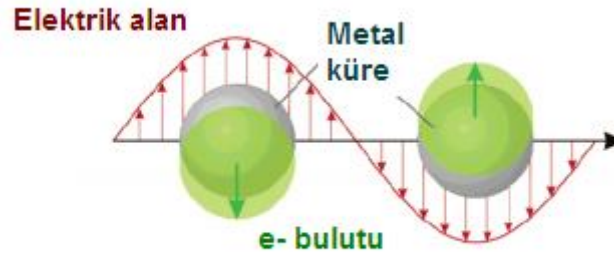
Çizelge 2.1 Nanopartiküllerin genel medikal uygulamaları (Chen, 2008).

| Nanopartiküller | Örnek | Medikal Uygulamalar |
|------------------------|---|--|
| Metal Nanopartikül | Altın Nanopartikül Altın Nanoçubuk Altın Nanokabuk Kuantum Kristalleri | Hastalık tanı ve teşhisi Biyosensör Moleküler görüntüleme İlaç salımı |
| Manyetik Nanopartikül | Süperparamanyetik demir oksitler | MRI |
| Polimerik Nanopartikül | PLGA PLA-PGA | İlaç salımı Protein salımı Gen ekspresyon vektörü |

2.1. Metal Nanopartiküller

Metal nanopartiküller, serbest elektronlarının elektromanyetik alanla uyarılmasıyla oluşturdukları lokalize yüzey plasmon rezonansları nedeniyle görünür ve yakın infrared dalga boylarında güçlü optik uyarılma göstermektedirler. Şekil 2.1’de metal bir küredeki plasmon salınımı gösterilmektedir. 1908 yılında küresel altın kolloidleri için Mie tarafından teorik olarak açıklanmıştır. Daniel ve arkadaşları tarafından bu partiküllerin özellikleri ve kullanım alanları, kimyasal modifikasyonu ve sentez yöntemleri özetlenmiştir (Daniel, 2004). Elghanian ve arkadaşları oligonükleotitle fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller, eşleniği olan oligonükleotitle karıştırıldığında renk değişimi ile 10 fmoI’a kadar tek zincirli oligonükleotit dizilimi belirlemiştir (Elghanian, 1997). Storhoff ve arkadaşları tek bazı farklı olan oligonükleotit dizilimi ısıtarak (melting temperature) yöntemiyle tayin etmişler [Storhoff, 1998]]. Nanopartikül yüzeyine analit molekülü

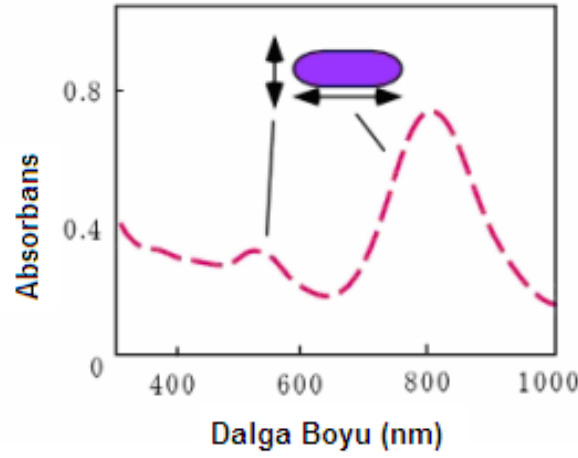
bağlandığında, nanopartiküllerin çevresindeki ortamın dielektrik özelliklerinin değişmesiyle plasmon rezonans dalga boylarında kayma gözlenmektedir. Englebienne, Heves ve arkadaşları nanopartiküllerin bu özelliklerinden yararlanarak partikül yüzeyine bir analit molekülün bağlandığını belirlemişlerdir. Bu basit teknolojiyle 10 nM derişimine kadar etiket içermeyen analitlerin tayin edilebileceği belirtilmiştir (Englebienne, 1998). Ayrıca metal nanopartiküller, mikroskopik etiket olarak kullanılabilir. Altın ve gümüş nanopartikülleri büyük ışık saçılması yapımları ve diğer yarı iletken nanopartiküller ve floroporlar gibi renk solması gibi özellikler göstermemeleri nedeniyle optik görüntüleme uygulamalarında kullanılmaya başlamıştır. Altın nanopartiküllerin en önemli özelliği şekil ve boyutuna bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleridir. Bu özellikleri şekil ve boyutuyla ayarlanabildiği için en önemli biyomedikal uygulamaları dokuların görüntülenebilmesi, tümör bölgesinde altın kabuklu partiküllerin NIR lazer ile uyararak tümörün parçalanması olan fototermal kanser terapisi uygulamalarıdır. Böylece ayarlanabilen plasmon rezonant spektra gösteren altın nanokabuk, nanokafes, nanoçubuk ve nanopartiküller sentezlenerek değişik biyolojik örneklerle fonksiyonlandırılarak kanser tanı ve tedavisinde kullanılabilir.



Şekil 2.1. Metal bir küredeki plasmon salınımı

Altın nanoçubuklar, Şekil 2.2 'de gösterildiği gibi iki farklı plasmon rezonansı göstermektedir. "Transverse" plasmon (TP) nanoçubuğun çapı boyunca uyarılmasına bağlı olarak gösterdiği küresel altın kolloidlerin plasmon rezonansına benzer rezonanstır. Diğer "longitudinal" plasmon (LP) denilen nanoçubuğun uzunluğu boyunca uyarılması sonucu oluşan plasmon rezonansıdır. Nanoçubukların uzunluk/çap oranı denilen "aspect ratio" değeri değıştikçe

plasmon rezonans pikleride değişmektedir. Böylece farklı uzunluk ve çap oranındaki altın nanoçubuklarla görünürden yakın infrarede kadar plasmon rezonans gösteren partiküller elde edilmektedir. Altın nanoçubukların uzunluğu boyunca plasmon rezonansı yüksek polaritasyona sahiptir ve diğer altın nanopartiküllerden daha dar bir çizgi genişliğine sahiptir. Bu özellikleri altın nanoçubukların kullanıldığı birçok uygulamada avantajlar sağlamaktadır. Keskin, polarize olmuş NIR rezonansları çoklu biyolojik sensör ve biyomedikal uygulamalarında kullanılabilirliğini sağlamaktadır. Ayrıca biyosensör uygulamalarında altın nanoçubuklar aynı boydaki küresel altın nanopartiküllere göre ortamın dielektrik sabitinin değişimini daha yüksek hassasiyette göstermektedir. Altın nanoçubuklarından polarize saçılma ile mikroskopik görüntüleme uygulamalarında moleküler skalada oryantasyon bilgileri sağlanabilmektedir. Fototermal terapilerde küçük boyuttaki altın nanoçubuklar ile doku içine penetre olmasında ve damarsal tümörlere girmesinde kolaylık sağlanabilmektedir.



Şekil 2.2. Kolloidal altın nanoçubukların farklı iki yüzey plasmon bandı. Görünür bölge:520-530nm, enine (Transverse) yüzey plasmon bandı, Yakın İnfrared: 700-1500 nm, boyuna (Longitudinal) yüzey plasmon bandı.

Altın nanopartikülleri çeşitli proteinlerle fonksiyonlandırılarak biyobilimlerde araç olarak kullanılmaktadır. En genel yöntem Fres tarafından geliştirilmiş sodyum sitrat yöntemiyle kolloidal altın nanopartikül sentezidir. Tetrakloraurat denilen altın tuzunun trisodyum sitrat ile kontrollü indirgenmesi yöntemidir. Sitrat sadece

indirgeme ajanı olarak değil ayrıca koruyucu bir grup olarakta fonksiyon göstermektedir. Altın nanopartikül çevresinde negatif yük oluşturarak elektrostatik olarak partiküllerin birbirini çekmesini engelleyerek çökmesini engellemektedir. Ayrıca sitrat tabakası tiyol gibi aurofilik moleküllerle kolayca yer değiştirebilmektedir. Örneğin 10-40 nm boyunda koloidal altınların yüzeyine antibadi molekülleri adsorplanarak histolojide doku örneklerinin farklı bölgelerini biyospesifik etiketliyerek daha sonra elektron mikroskopi ile analizi yapılmaktadır (Liao, 2005).

2.2. Küresel Altın Nanopartiküller

Nanoteknoloji kimya, biyoloji, fizik ve tıp alanlarının birleşimiyle oluşan, analitik ve biyolojik bilimlerde ultrasensitif dedeksiyon ve görüntüleme yöntemlerinin gelişmesi için giderek artan bir öneme sahip modern bilimin yeni bir dalı olmaktadır. Özellikle fonksiyonelleştirilmiş altın nanopartiküllerin ultrasensitif dedeksiyon ve görüntüleme yöntemleri ile biyoloji ve farmakoloji alanında kullanımı biyotanıma da araştırmacılar için çekici hale gelmektedir; çünkü altın nanopartiküller benzersiz optik özelliklere (örneğin yüzey plazmon rezonans absorpsiyonu ve rezonans ışık saçılması gibi), yüzey kaplama çeşitliliğine ve yüksek biyoyumluluğa sahiptir (Daniel, 2004; Niazov, 2004).

Genellikle küçük metal nanopartiküllerin optik özellikleri, elektromanyetik radyasyon olayı ile rezonansa giren yüzey elektronlarının toplu salınımında “Yüzey Plazmon Rezonans (SPR)” veya “Lokalize Yüzey Plazmon Rezonans (LSPR)” olarak da bilinen plazmon rezonansına sahiptir (Myroshnychenko, 2008). Altın için, bu salınım rezonans frekansı yığın yapının dielektrik sabiti tarafından kontrol edilmekte ve elektromanyetik spektrumun görünür bölgesinde yer almaktadır; çünkü nanopartiküller yüksek yüzey alanı hacim oranına sahiptir. Plazmon frekansının lokal çevre ile kendi ara yüzünün dielektrik (refraktif indeksine) sabitine duyarlı hassasiyeti vardır. Bu partiküllerin çevresindeki herhangi bir değişim (yüzey modifikasyonu, kümelenme, ortam refraktif indeksi gibi.) dispersiyonların kalorimetrik değişimine yol açmaktadır. Altın nanopartiküllerin bağlanması (ya da kümelenmesi) plazmonların birleşmesi nedeniyle, sık sık belirgin renk değişiklikleri eşliğinde meydana gelmektedir.

Kalorimetrik sensörlerde kullanılan altın nanopartiküller önemli uygulamalara sahiptir ve yaygın olarak incelenmektedir (Burda, 2005).

Sadece plazmon tarafında ışığın kuvvetli emilimi değil, bunun yanı sıra onların Rayleigh (elastik) saçılmasında önem taşımaktadır. Emilimle karşılaştırıldığında büyük oranda giden ışık saçılmakta ve partiküllerin giderek büyüdüğü gözlenmiştir (Murphy, 2008); çünkü altın nanopartiküllerinden saçılan ışığın plazmon bandları elektromanyetik spektrumun görünür bölgesi ile uyum içindedir. Herbir nanopartikülün pozisyonu optik yolla görüntüleme uygulamaları için hazırlanabilmektedir. Altın nanopartiküllerin uyarlanabilen fiziksel özellikleri elektronların ayarlanabilir optik özellikler sunan kollektif salınımlarını etkilemektedir. Bu birçok sayıdaki biyo dedeksiyon uygulamaları içinde uygulama kolaylığı sağlamaktadır. Altın nanopartiküllerin çok yönlü yüzey kimyası çeşitli biyofonksiyonel grupların bağlanmasıyla elde edilmektedir. Amfilik polimerler, silanoller, şekerler, nükleik asitler ve proteinler örnek gösterilmektedir. Ayrıca tiyol gruplarına altın yüzeyinin güçlü bir afinitesi vardır.

Son yıllarda bu çalışmaların bazıları kendi içinde malzemelerin veya alt sınıf nano malzemelerin biyolojik uygulamalarına odaklanarak genel bir bakışla tekrar gözden geçirilmiştir. Burada iyonlar, küçük moleküller, DNA ve protein dedeksiyonu ve hücre analizler, bazı teknik sorunların vurgulanması ve seçilen bir dizi yeni uygulamalar için küresel altın nanopartikül problemlerinin ve altın nanopartikül testlerin hazırlanmasına odaklanılmıştır. Ayrıca görünür bölgede ayarlanabilir absorpsiyon ve NIR (700-1300nm)'a sahip küresel olmayan nanopartiküller, altın çubuklar (AuNRs) ve altın nanokabuklar (AuNS, nano ölçekte üzeri altın kaplı silika ve manyetik nanoküreler) çalışılmıştır (Wang, 2009).

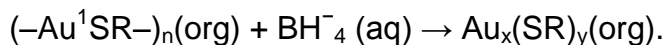
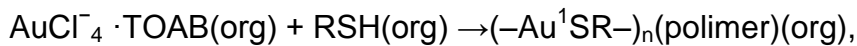
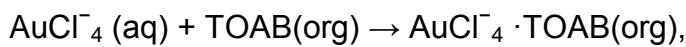
2.2.1. Altın Nanopartikül Problemlerinin Sentezi

Altın nanopartiküller çok geniş bir uygulama alanına sahiptir. Ancak monodispersite gerekli olduğunda pratik sınırlamalar görülmektedir. Altın nanopartiküller için bir nm den bir kaç mikrometreye kadar çok sayıda hazırlama yöntemi literatürde yer almaktadır. 10nm'den 150 nm'ye kadar altın hidrosoller elde etmek için saptanan en yaygın uygulanan prosedür altın(III) tuz çeşitlerinin

sitratle indirgenmesi klasik Turkevich-Frens varyasyonlarıdır (Turkevich, 1951; Frens, 1973). Altın nanopartikülün boyutu (10nm ile 140nm arasında) indirgeyici/stabilizör ajan (trisodyum sitrat) ve altın (III) tuz türevleri (hidrojen/sodyum tetraklorat(III)) arasındaki oranla kontrol edilebilmektedir. Bu metot kolaylıkla diğer istenilen ligandlarla (örneğin tiyollenmiş DNA) partikül yüzeylerindeki kabaca kaplanmış sitratların yer değiştirmesinde sıklıkla kullanılmaktadır (Wang, 2009).

Çoğu hidrofobik ve çap boyutları 1 ile 8 nm arasında olan altın nanopartiküller, altın (III) tuz türevlerinin sodyum borhidrat NaBH_4 ile organik bir çözücü içinde ya iki fazlı sıvı/sıvı sistemleri ya da uygun tek fazlı çözücü kullanarak tiyol ligantların varlığında indirgenerek Brust-Schiffirin metoduyla hazırlanmaktadır (Brust,1994). Brust- Schiffirin metodunda tetraklorat (III), tetraoktilamonyum bromid (TOAB) faz transfer ajanı kullanılarak toluene transfer edilir ve dodekanetiyol (DDT) varlığında NaBH_4 tarafından indirgenmektedir. Daha büyük tiyol/altın mol oranları, daha küçük ortalama çekirdek büyüklüğü vermektedir. Hızlı indirgen eklemesi ve çözeltinin soğutulması daha küçük ve tek boyutlu dağılmış partiküller üretimini sağlamaktadır. Brust-Schiffirin metodunu takiben, çok çeşitli fonksiyonelleştirilmiş tiyol ligantlı altın nanopartiküller (AuNP) sentezlenmiştir. Hussain ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilmiş 5 nm'nin altında örneğin alkil tiyoeter sonlu fonsiyonelleştirilmiş poli(metakrilik asit) gibi tiyoeter ya da tiyol fonksiyonel polimer ligandları kullanarak yüksek oranda tek boyutlu dağılmış altın nanopartiküllerin sulu ortamda tek aşamalı bir yöntemle hazırlanmasını sağlamışlardır (Hussain, 2005). Bu yaklaşımla, partikül boyutu ve partikül dağılımı polimer yapısının, derişiminin ve yoğunluğunun çok küçük değişimleriyle kontrol edilmektedir. Sistematik olarak polimerin altına oranı değiştirilerek nanopartiküllerin boyutları ayarlanabilmektedir ve floresan olmayandan floresan nanopartiküllere geçiş çekirdek çapı 1.7 ile 1.1 nm arasında gözlemlenmektedir.

Brust- Schiffirin prosesi:

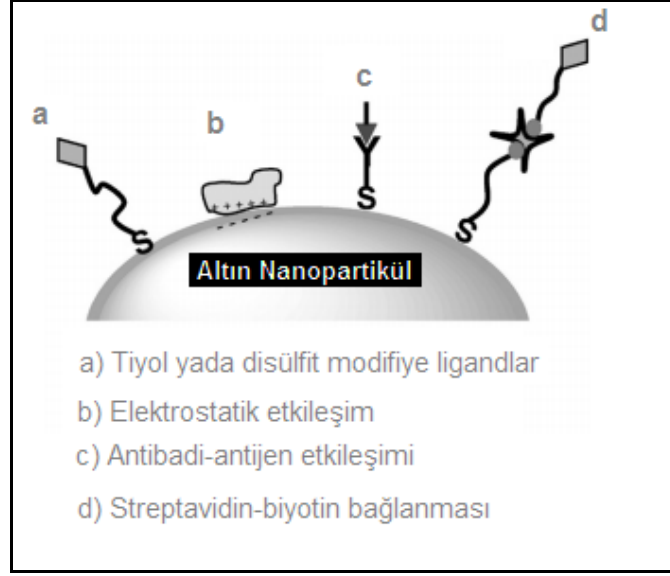


2.2.2. Altın Nanopartikül Problemlerin Stabilizasyonu ve Fonksiyonelleştirilmesi

İleri altın nanopartikül uygulamaları için moleküler tanıma bölgelerinin (örneğin fonksiyonel grupların) nanopartiküllere kararlı bir şekilde yapısı bozulmadan bağlanarak prob nanopartiküller hazırlanmaktadır. Bu aşamada moleküler tanıma bölgeleri aktif halde olup partikül yüzeyine aktif bölgelerinden bağlanmamalıdır. Ayrıca problemler birbirlerine ya da sistemdeki hiç birşeyle non-spesifik olarak etkileşmemelidir. Farklı moleküler tanıma molekülleri takılmış nanopartikül problemleri kullanılarak biyoanalitik çalışmalarda eş zamanlı birden fazla tayin gerçekleştirilebilmektedir. Ancak bu çalışmalarda karşılaşılan problemler araştırılmakta olup altın nanopartiküllerin stabilizasyonu ve fonksiyonlaştırılması çalışmaları halen devam etmektedir. Elektrostatik etkileşim, spesifik tanıma (antibadi-antijen, biyotin-avidin gibi) ve kovalent bağlama (Au-S kovalent) gibi üç tip yöntem yaygın olarak kullanılarak altın nanopartikül problemler hazırlanmaktadır (Şekil 2.3). Ligand moleküllerinin altın nanopartikül yüzeyine elektrostatik etkileşim ya da fiziksel adsorpsiyon yöntemleri ile immobilizasyonu daha basit, az zaman almaktadır. Kovalent immobilizasyon yöntemi elektrostatik etkileşim yöntemine göre daha zor ve karmaşık bir süreçtir. Ancak elektrostatik etkileşimle immobilizasyonda bağlanma yeterince kuvvetli olmadığı için bazı biyolojik çalışmaların daha ileri safhalarında inkübasyon koşulları ve yıkama aşamalarında yeterli bağlanma sağlanamamaktadır. Proteinleri oksidasyondan korumak için küçük yüksüz ve iki tiyol grubu içeren ditiyotretol molekülü, DNA hibridizasyon çalışmalarında ise yüksek tuz derişimi içeren tampon çözeltilerinin kullanıldığı şiddetli deneysel koşulları gerektiren bazı biyolojik çalışmalar bulunmaktadır. Bu şekildeki biyolojik çalışmalarda bu tarz tampon çözeltisi ile uzun süre inkübasyonda altın nanopartikül problemler ve analitler arasında spesifik olmayan güçlü etkileşimler tayinin seçiciliğini azaltmaktadır.

Elektrostatik etkileşim ya da fiziksel adsorpsiyonla immobilizasyon teknikleri karşılaştırıldığında kovalent bağlanma tekniğinin daha kompleks olmasına karşın ligandların altın nanopartikül yüzeyine kovalent bağlanması daha iyi kararlılık ve sağlamlık göstermektedir. Örneğin; yüksek tuz derişimi (2M NaCl) ve kaynama sıcaklığı gibi koşullarda da kararlılık devam etmektedir. Ayrıca tiyol, fosfin ve amin grupları içeren moleküller tarafından olan saldırılara bir ölçüde engel

olabilmektedir. Yüksek kararlılıkta testler gerektiren birçok uygulama alanında kovalent olarak immobilizasyon tekniği tercih edilmelidir. Ligandların altın nanopartikül yüzeyine immobilizasyonunda en çok altın-tiyol (Au-S) kovalent bağ oluşumu tekniği kullanılmaktadır. Partikül yüzeyindeki altın atomları ile ligand arasında altın-tiyol kovalent bağının oluşturulması için tiyol, disülfid, tiyolester gibi sülfür içeren ya da sülfür takılmış ligandlar kullanılmaktadır. Altın nanopartikül yüzeyine alkantiyolatlar, glutatyon, tiyopronin, tiyollü poli etilen glikol, tiyol ya da disülfitle modifiye edilmiş DNA, peptit gibi değişik moleküller takılabilmektedir. Alkil bazlı tek tabaka protein denaturasyonuna neden olmaktadır. Bu sorunu ortadan kaldırmak içinde özellikle nanopartikül-protein ara yüzeyinde bir tetra(etilen glikol) uzatma kolu kullanılmaktadır. Son zamanlarda aptamer-altın nanopartikül problemlerine dayalı biyosensör uygulamalarına olan ilgi artmaktadır. Aptamer, tanınacak hedef analitlere yüksek afinite ve seçicilikte bağlanabilen tek zincirli DNA veya RNA molekülüdür. Aptamerler, SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) adı verilen ligandların in vitro olarak eksponansiyel zenginleştirilmesi yöntemiyle oluşturulmaktadır. Aptamerle fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller proteinler, metal iyonları ve küçük organik bileşikler gibi birçok analitin tayin edilmesinde kullanılmıştır. Zhou ve arkadaşları altın nanopartikül ve aptamer ile pseudo sandaviç yapısı oluşturarak adenosin gibi küçük molekülleri SPR spektroskopi yöntemiyle tayin etmişlerdir (Wang, 2008). Oligonükleotit ve proteinlere spesifik yüksek afinite gösteren biyolojik moleküller ile nanopartikülleri fonksiyonlandırmak en çok uygulanan yöntemlerden biridir. Örneğin, streptavidinle fonksiyonlandırılmış altın nanopartikülleri biyotinli proteinler ya da oligonükleotitlerin, protein A ile fonksiyonlandırılmış altın nanopartiküller değişik immunoglobulinlerin değişik Fc kısımlarının, karbonhidrat modifiye edilmiş partiküller ise yüksek afinite gösterdikleri proteinlerin tayin edilmesinde kullanılmaktadır. Bu moleküller arasındaki yüksek bağlanma sabiti nedeniyle büyük avantajlar sağlamaktadır (Wang, 2009).



Şekil 2.3. Altın nanopartikül problrarı oluşturma yöntemleri

2.2.3. Altın Nanopartikül Problrarının Kullanım Alanları

Altın nanopartikül problrarı analitik ve biyolojik bilimlerde daha çok kimyasal sensör ve görüntüleme ajanı olarak kullanılmaktadır. Mirkin ve arkadaşları nanopartiküllerin agregasyonu sonucu renk değiştirmeleri özelliğinden yararlanarak tek zincirli oligonükleotit takılı altın nanopartikülün eşlenik oligonükleotit ile etkileşimini oluşan renk değişiminden belirlemişlerdir. Mirkin tipi renk değişimine bağlı tanı sistemleri altın nanopartiküllere geniş bir uygulama alanı açmıştır. Daha sonra metal iyonları, küçük organik bileşikler, proteinler, nükleik asitler ve hücreler gibi birçok hedef molekülü tayin edebilen çeşitli altın nanopartikül esaslı tanı sistemleri geliştirilmiştir (Mirkin, 1996).

2.2.3.1. Ağır Metal Katyonlarının Belirlenmesi

Pb^{2+} , Cr^{2+} ve Hg^{2+} gibi ağır metal iyonları çevre ve insan sağlığı için büyük tehlike oluşturan maddelerdir. Lu ve grubu, altın nanopartikülleri DNAz enzimi ile modifiye ederek ağır metal katyonlarını yerinde, eş zamanlı, herhangi bir etiket gerektirmeyen hızlı ve basit bir şekilde tayin edecek kalorimetrik sensör geliştirmişlerdir. Hg^{2+} iyonları timin-timin bazının yanlış eşleşmesini indüklemektedir. Liu ve Mirkin grubu ortamdaki Hg^{2+} iyonlarının timin- Hg^{2+} -timin baz çifti oluşturmasına dayanan duyarlı ve seçici herhangi bir enzim gerektirmeyen

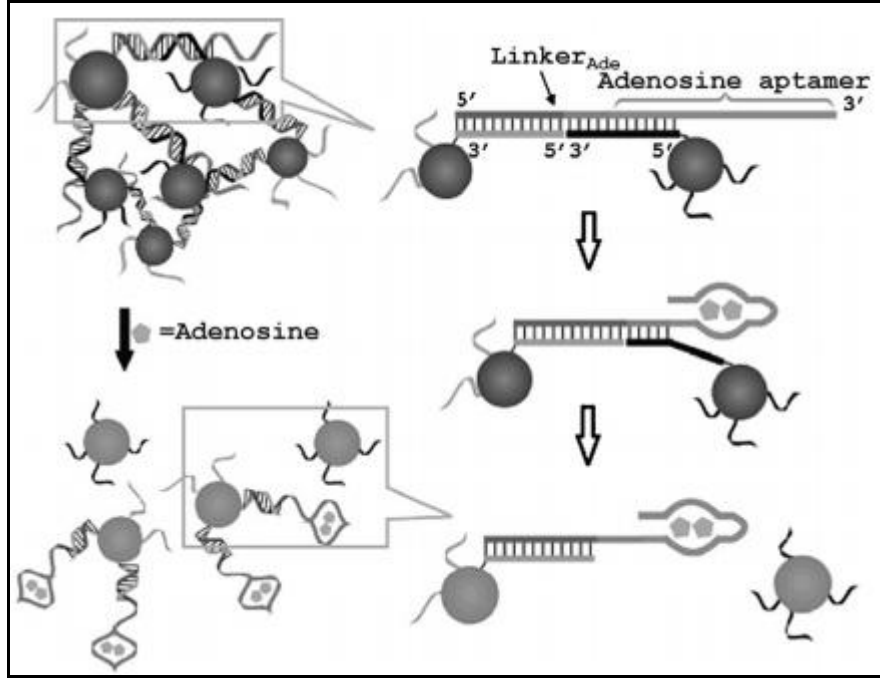
sıcaklık kontrollü kalorimetrik bir sensör oluşturmuşlardır. Hg^{2+} iyonlarının derişimi DNA-altın nanopartikül agregatının bozulma sıcaklığında çözeltili rengindeki değişimle belirlenmiştir (Wang, 2009).

2.2.3.2. DNA Tayini

DNA tayini için altın-nanopartikül esaslı kalorimetrik metotlar geniş çaplı kullanılmış ve literatürde çok fazla yer almaktadır. Au nanopartikül esaslı DNA tayini için yeni teknikler geliştirilmeye başlanmıştır. Mirkin ve arkadaşları, çift sarmal genomik DNA'yı tayin edebilmek için biyo barkod tanı sistemi geliştirmişlerdir. Bu yöntemle biyolojik silah ajanları doğru ve hızlı bir şekilde tayin edilebileceği belirtilmiştir (Mirkin, 2007). Fan ve arkadaşları "chronocoulometry" DNA sensörü (CDS) tasarlayarak sandaviç stratejisi izlenerek hedef DNA'yı tayin etmişlerdir. Altın elektrod yüzeyine prob DNA immobilize edilip hedef DNA ile hibridizasyonunu izlemek için haberci DNA altın nanopartikül ile etiketlenmiştir. Hibridizasyon sonucu altın nanopartiküller elektrod yüzeyine yakınlaşmıştır. "Chronocoulometry" elektrod yüzeyindeki DNA dizilimine elektrostatik olarak bağlanmıştır (Fan, 2007).

Dong ve arkadaşları, DNA hibridizasyonunu yüksek hassasiyette elektriksel yöntemle tek duvarlı karbon nanotüp (single-walled carbon-nanotube) yapısı ile haberci DNA'ya konjuge edilmiş altın nanopartiküller ile tayin etmişlerdir. Bu yöntemle femtomolar gibi çok küçük miktarlara kadar tayin gerçekleştirilebileceği bildirilmiştir (Dong, 2008).

Hedef molekülü yüksek hassasiyet ve seçicilikte tayin etmek için aptamer konjuge edilmiş altın nanopartikül esaslı sensörler de geliştirilmiştir. Liu ve arkadaşları, adenosine yüksek affinite gösteren aptameri kullanarak iki tip DNA ile fonksiyonlandırılmış altın nanopartikülleri ile etkileştirilmiştir (Şekil 2.4). Aptamer ve altın nanopartikül yüzeyindeki DNA dizilimi hibridize olup daha sonra adenosin molekülü ilave edilerek aptamerin adenosine olan yüksek affinitesiyle yapı değiştirerek altın nanopartikül yapısı ortamdaki ayrılarak renk mordan kırmızıya geçmiştir (Lui, 2007).



Şekil 2.4. Aptamer konjuge edilmiş altın nanopartikül esaslı sensörler.

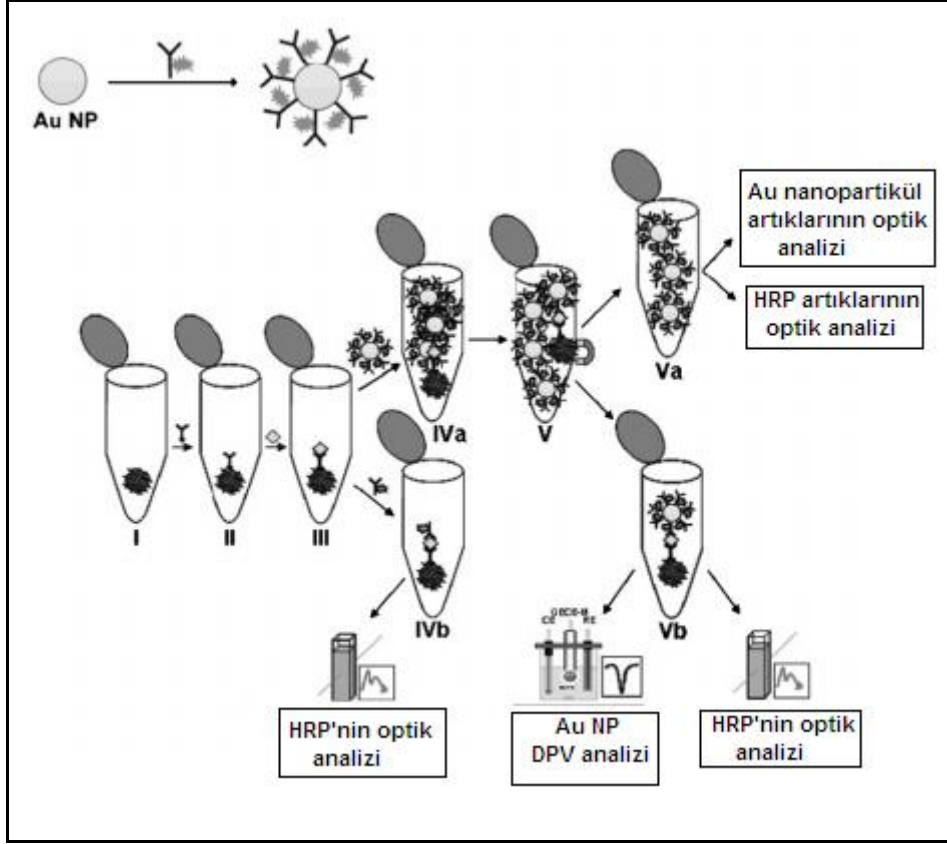
2.2.3.3. Protein Analizi

Biyolojik örneklerdeki proteinlerin görüntülenmesi için antibadi konjuge edilmiş altın nanopartikülleri ışık ve elektron mikroskobunda çok kullanılmaktadır. Altın-protein yapıları biyoanalitik tanı ve teşhis, immunohistokimyasal uygulamalarda prob olarak kullanılmaktadır.

Maier ve arkadaşları, optik rezonans artırmalı absorpsiyon esaslı alerji yapan maddeleri tayin etmek için immunoçip biyosensörleri geliştirmişlerdir. Bu yöntemle sandaviç yapı oluşturarak herhangi bir okuma cihazı gerektirmeden, hızlı ve basit bir şekilde çıplak gözle immunokimyasal bağlanma gözlemlenmiştir (Maier, 2008).

Ambrosi ve arkadaşları, altın nanopartiküllerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini birlikte kullanarak protein tayini gerçekleştirmişlerdir (Şekil 2.5). Anti-insan IgG peroksidaz (HRP) altın nanopartikülleri ile etiketlemişlerdir. Antijen-antibadi bağlanması sonucu manyetik altın nanopartikülleri sandaviç yapı oluşturarak altın

nanopartikülün hem optik hem de elektrokimyasal özelliğinden faydalanarak karakterizasyon yapılarak protein tayini gerçekleştirilmiştir (Ambrosi, 2007).



Şekil 2.5. Altın nanopartiküllerin optik ve elektrokimyasal özelliklerini birlikte kullanarak protein tayini.

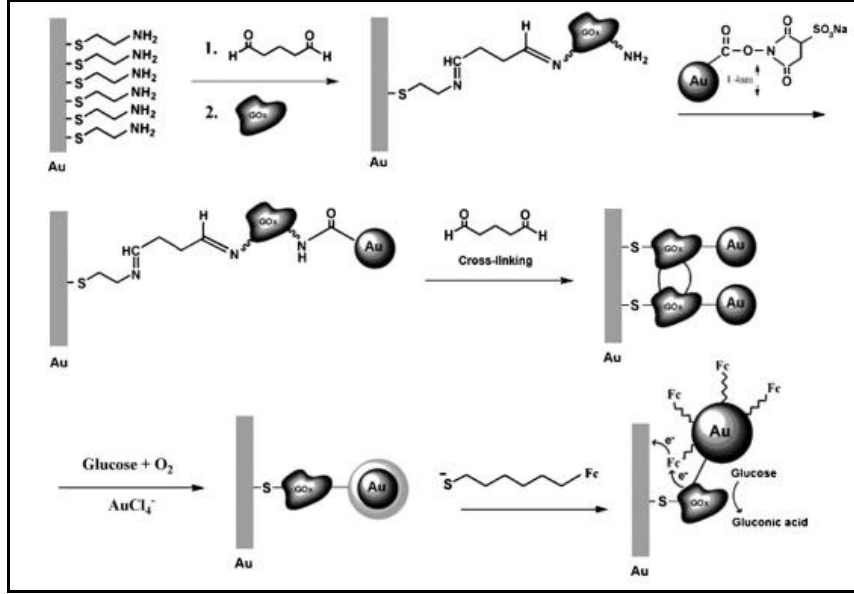
Karbonhidrat-protein etkileşimi canlı organizmalardaki biyolojik prosesler hakkında önemli bilgilerin yanı sıra biyomedikal önemli ajanların geliştirilmesini sağlamaktadır. Russell ve arkadaşları, tiyol modifiye edilmiş basit şekerleri altın nanopartikül yüzeyine takarak bu şekildeki glikonanopartikülleri lektin ve konkavalin A gibi proteinlere bağlanan karbonhidratları belirlemek için kalorimetrik proplar olarak kullanmışlardır (Russell, 2007).

Dong ve arkadaşları, trombine yüksek affinite gösteren aptamer altın nanopartiküllere konjuge edilerek kalorimetrik sensör geliştirmişlerdir. İnsan plazması gibi kompleks biyolojik örneklerdeki hedef molekül yüksek seçicilik ve hassasiyetle bu eknikle tayin edilebileceği bildirilmiştir (Dong, 2008).

2.2.3.4. Enzimatik Aktivite Tayini

Enzimatik aktivitenin ve kinetik parametrelerin yüksek hassasiyette belirlenmesi yeni farmasötik ve medikal teşhis ve tanı cihazlarının geliştirilmesinde önemli bir parametredir. Enzim bağlı immunolojik tanı sistemi olan ELİSA yönteminde iyi kalitede antibadi üretilmesi gerekmekte ve uzun zaman kaybedilmektedir. Araştırmacılar bu dezavantajları ortadan kaldırmak için altın nanopartiküllerin optik ve elektronik özelliklerini içeren yeni yöntemler geliştirilmesine yönelmişlerdir.

Genellikle enzim aktivitesini tayin etmek için radyoaktif ya da floresan etiketler kullanılmaktadır. Mirkin ve arkadaşları, enzimatik aktivitenin incelenmesi ve izlenmesinde altın nanopartiküllerin kalorimetrik indikatör olarak kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Mirkin, 2007). Willner ve arkadaşları, altın elektrod yüzeyine glikoz molekülü glikoz molekülüne de altın çekirdek partikül takmışlardır. Glikoz molekülün okside olması sonucu glukonik asit ve H_2O_2 molekülü oluşmaktadır. H_2O_2 molekülü de $AuCl_4^-$ molekülü için indirgeyici bir ajandır. Elektrod yüzeyindeki glikozun oksidasyonu sonucu oluşan H_2O_2 altın çekirdek moleküllerini indirgeyerek altın yüzeyine daha fazla altın metalinin çökmesiyle altın çekirdek yapı büyümeye başlamıştır. H_2O_2 miktarı glikoz derişimi ile kontrol edilmektedir. H_2O_2 miktarı da altın nanopartikülün büyümesini kontrol etmektedir. Şekil 2.6'da gösterildiği gibi biyokatalitik dönüşüm optik ve elektrokimyasal olarak altın nanopartikülün gelişimi ile izlenmiştir (Willner, 2008).



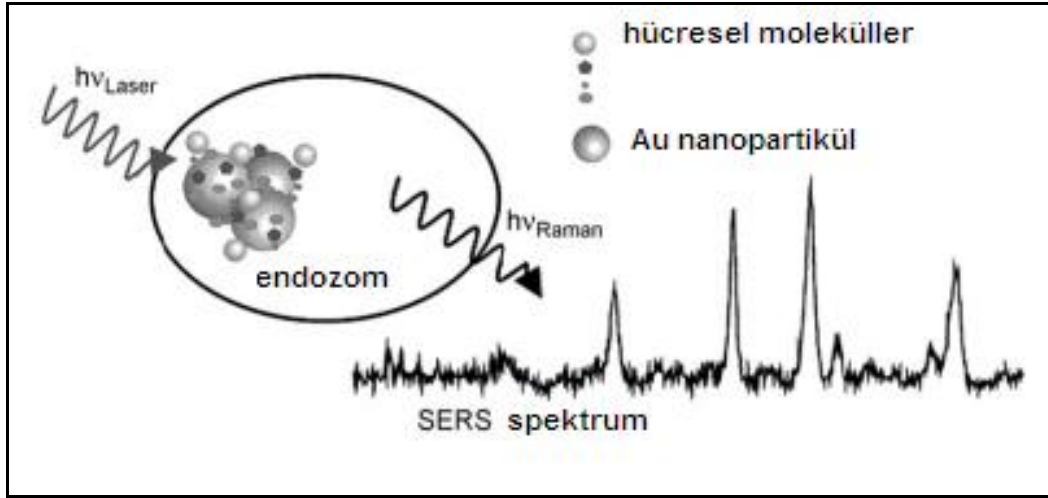
Şekil 2.6. Biyokatalitik dönüşümün altın nanopartiküller ile izlenmesi.

2.2.3.5. Hücresel Analiz

Altın nanopartiküllerin eşsiz optik özellikleri, kolay sentezlenip fonksiyonlandırılabilmesi ve biyouyumlu olması gibi avantajları nedeniyle hücre içi teşhis ve tanı uygulamalarında çok kullanılmaktadır. Kanser hücrelerinin erken ve doğru teşhisi eskiden pahalı cihazlarla uzun sürede tayin edilmekteydi. Tan ve arkadaşları, kanser hücreleri direk olarak kalorimetrik yöntemle belirlemiştir. Kanser hücrelerine yüksek affinite gösteren aptamerler ile altın nanopartikülleri fonksiyonlandırılıp, hedef hücre ile örnek etkileşimi sonucu çok farklı bir renk değişimi olurken diğer hücreler de herhangi bir renk değişimi gözlemlenmemiştir. Bu yöntemle herhangi bir cihaza gerek kalmadan sadece absorban ölçümü ve çıplak gözle yüksek hassasiyette teşhis yapılmıştır (Tan, 2008).

Son zamanlarda hücresel analiz için altın yapılar içeren SERS optik sensörleri geliştirilmiştir. Hücresel SERS sinyalleri hücresel yapının moleküler bileşimi ve lokal pH gibi diğer kimyasal özellikleri hakkında bilgi vermektedir (Şekil 2.7). Kneipp ve arkadaşları, canlı epitelyum ve makrofaj hücrelerdeki endozomdan SERS spektrumlarını ölçmüş ve hücrelerdeki altın nanopartiküllerin özelliklerini incelemiştir. Farklı hücre hatlarındaki nano yapılarından farklı SERS spektrumları

elde edilerek o hücre içindeki ilgili molekülün fiziksel özelliği tanımlanmıştır (Kneipp, 2005; Kneipp, 2006 Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Endozom içindeki hücresel moleküllerin SERS spektrumu.

2.3. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller

Manyetik demir oksit nanopartikülleri biyotıp alanında çok kullanılan bir malzeme haline gelmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin yüksek manyetik momente sahip olmaları, toksik olmamaları ve kolay sentezlenebilmeleri gibi avantajları nedeniyle protein ve enzim immobilizasyonu, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), DNA belirlenmesi ve hibridizasyonu, biyolojik tanı, hedefli ilaç salımı ve gen terapisi gibi birçok uygulamada kullanılmaktadır. Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanılarak kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu özelliklerinin yanı sıra fiziksel ortamlarda kararlılığını koruması ve biyomedikal uygulamalarda kullanılmak üzere yüzeyine biyolojik bir molekül takılabilmesi için polisitiren, polietilen glikol, polivinil alkol ve kitosan gibi değişik doğal ve sentetik polimerler ile fonksiyonlandırılarak kompozit yapıları oluşturulmaktadır. Son yıllarda bu partiküllere yeni özellikler kazandırmak, inert bir yapı oluşturmak, manyetik çekirdeğin oksidasyonunu önleyerek manyetik özelliğini kaybetmeyecek inert bir dış kabuk oluşturmak için yeni arayışlar içine girilmiştir. Bunun sonucunda altın, gümüş gibi metalik yapılarla kaplı manyetik nanopartiküller ortaya çıkmıştır. İlk olarak 2001 yılında Cui ve arkadaşları bu yeni kompozit partikülleri sentezlemişlerdir (Cui, 2005).

Altın hem insan hem hayvan uygulamaları için toksik olmaması, biyouyumlu olması, kimyasal kararlı olması ve yüzey plasmon özelliğinden dolayı UV-görünür bölgede bir absorpsiyon bandı göstermesi gibi özellikleri nedeniyle en çok tercih edilen kabuk malzemesi olmuştur. Ayrıca enzim, protein, DNA gibi biyolojik moleküller altın yüzeyine kovalent olarak daha güçlü bağlanabilmektedir. DNA ya da antibiyo gibi biyolojik moleküller manyetik-Au nanopartiküllerine direkt olarak bağlanamazlar. Geleneksel bağlanma yöntemleri temel olarak ikiye ayrılır. Birincisi biyotinin DNA kullanılarak avidinle aktive edilmiş manyetik-Au nanopartiküllerine bağlanma sağlanır. Diğer yöntem ise altının tiyole olan afinitesinden faydalanarak tiyol modifiye edilmiş DNA gibi biyolojik moleküllerin kullanılmasıdır. Bu yöntem diğerine göre daha az zaman ve emek gerektirmektedir. Böylece altın kabuğunun biyolojik uygulamalara uygun olması, gösterdiği optik özelliği, manyetik çekirdek partikülün manyetik özelliği nedeniyle hem altının hem de manyetin özelliklerinin birlikte kullanılabilmesi çok fonksiyonlu partiküller ortaya çıkmıştır (Sun, 2010).

2.3.1. Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül Sentez Yöntemleri ve Uygulama Alanları

Altın kaplı manyetik nanopartikül üretimi manyetik çekirdek ve altın kabuk olmak üzere iki ana prosesten oluşmaktadır. Altın kaplı manyetik nanopartikül sentez yöntemleri ikiye ayrılmaktadır. Bunlardan birincisi manyetit partikülleri ve bunun etrafını kaplıyacak altını içeren sabit reaktörler şeklindeki ters misel yöntemidir. Ters misel yönteminde verim düşük, üretim zordur. İkinci yöntem ise hem magnetite nanopartiküllerin hemde kaplama işleminin sulu fazda gerçekleştirilmesidir. Demir tuzlarının alkalik bir ortamda ikili çöktürülmesiyle oluşturulan manyetit nanopartiküllerinin kloraurik asit ile indirgenerek altın kaplamanın oluşturulmasıdır. Bu su fazlı metot basit, hızlı ve üretilen partiküller su içinde dağıtılabilir. Bu yöntemde partikül boyu, altın kabuk kalınlığı çok zor kontrol edilebilmektedir. Ayrıca altın ile kaplanmış partiküller ile kaplanmamış manyetit nanopartiküller aynı örnek içinde bulunup birbirinden ayrılması problem oluşturmaktadır. Diğer bir üçüncü yöntemde manyetit sentezi ve altın kaplamanın organik fazda yapılmasıdır. Demir (III) oleatın ısı bozulmasıyla oluşan manyetit nanopartiküllere kaplayıcı bir ajan varlığında altın asetatın indirgenmesiyle

kaplama gerçekleştirilmiştir. Organik metot da partikül boyu ve altın kabuk kalınlığı kontrol edilebilirken manyetik özellikleri az olup sulu çözelti fazına geçtiklerinde çökme göstermektedirler. Ayrıca kullanılan çözücüler çevre dostu olmayıp büyük ölçekte sentez de problem oluşturmaktadır. Partikül boyutunu kontrol edip bulunduğu sulu ortamda kararlılığını sağlamak için manyetik özellikteki çekirdeğin organik fazda altın kaplama işleminin sulu ortamda yapıldığı sentez yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemde partikül boyutu çok iyi kontrol edilirken tamamen kaplama işlemi bir derecede başarılı olup kararlılığının sağlanması tam olarak keşfedilememiştir.

Manyetit nanopartikül yüzeyini tamamen kaplamayacak şekilde altın nanopartiküllerin bağlandığı altın-manyetit kompozitleri oluşturulmuştur. Bu kompozitler, protein ayırma, optik görüntüleme ya da kataliz gibi tam kaplama gerektirmeyen uygulamalar için kullanışlı yapılardır. Bu tarz kompozitler amin ya da tiyol grupları gibi fonksiyonel molekülleri taşıyan manyetit nanopartikül yüzeyine altın nanopartiküllerin kovalent ya da gama ışınları uyarılmasıyla bağlanarak hazırlanmaktadır. Bu yöntemle kompozit yapıların kararlılığını sağlayabilecek derecede manyetit yüzeyine bağlanan altın nanopartikülü kontrol edememektedir. Tamamen altın nanopartikül ile kaplanmamış kompozitler manyetit çekirdeğin bozulması ya da okside olması nedeniyle çok kısıtlı çevrelerde kullanılabilir. Özellikle partiküllerin bir araya gelip aglomerasyon oluşturduğu kan damarlarının tıkanması gibi istenmeyen durumların meydana geldiği in vivo uygulamalarda partikül aglomerasyon kararlılığı çok önemlidir. Demir oksit kararlılığını etkileyen partikül boyu, yüzey fonksiyonallitesi, pH ve iyonik güç gibi parametreler bilinmekte olup, Au-Fe₃O₄ kompozitler için aglomerasyon kararlılığının detayları henüz bilinmemektedir.

Goon ve arkadaşları 50-150 nm aralığında manyetit-altın kompozitleri sentezlemişlerdir. İkili çöktürme yöntemiyle hazırlanan manyetit nanopartiküllerin yüzeyini biyouyumlu polietilenimin ile kaplayarak 2 nm boyutundaki altın nanopartiküllerin bu yüzeye bağlanmasını gerçekleştirmişlerdir. PEI ile partiküllerin aglomerasyona karşı kararlılığını sağlarken altın nanopartiküllerin manyetit yüzeyine bağlanmasıyla manyetit çekirdeğin kimyasal saldırılarına karşı koruyucu bir tabaka oluşturmuştur (Goon, 2008).

Pham ve arkadaşları sitrat indirgeme ajanını kullanarak 15-40 nm boyutunda altın kaplı manyetik nanopartiküller sentezlemişlerdir. Fe^{2+} ve Fe^{3+} tuzlarının güçlü bir alkalın çözeltisi ile ikili çöktürülmesi sonucu oluşturulan manyetit çekirdeği sitrat ile stabilize edilip altın tuzunun ilave edilmesiyle kaplama gerçekleştirilmiştir. Sentezledikleri bu partikülleri IgG proteinini biyolojik ayırma işleminde kullanmışlardır (Pham, 2008).

Wang ve arkadaşları, yetişkin bir sıçanın omiriliğinden izole edilmiş sinir kök hücresine manyetik altın kaplı nanopartikülleri yükleyerek manyetik rezonans görüntüleme kontrast artırıcı olarak kullanılabilmesini araştırmışlardır. 20 hücreye bu partiküller ile etiketledikten sonra sıçanların omiriliğine yerleştirilerek 48 saat ve bir ay sonra MRI ile izlemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda altın kaplı manyetik nanopartiküllerin güçlü kontrast artırıcı özellik gösterdiklerini ve nakledilen hücrelerin uzun dönem in vivo izlenmesi için güzel MRI etiketleri olarak kullanılabilmesi belirtilmiştir (Wang, 2006).

Liu ve arkadaşları, polyol prosesi ile eş boyutlu altın kaplı manyetik nanokristalleri sentezlemişlerdir. Bu nanokristallerin hücre ayırması ve saflaştırılması gibi biyomedikal uygulamalar da kullanılabilirliğini araştırmışlardır. Yüzeyi karboksil gruplarıyla fonksiyonlandırılmış Fe_3O_4 -Au nanokristallerine karbodimid aktivasyonu ile FITC'li streptavidin immobilize etmişlerdir. Hücre karışımları içinden biyotinli anti CD^{4+} antibadisi bağlanmış hücrelere yüksek seçicilik ve verimde bağlanarak hücrelerin ayrılması sağlanmıştır. Bu şekilde sıçan dalağında izole edilmiş CD^{4+} T lenfositlerine bu partiküllerin bağlanabilirliği test edilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda bu partiküllerin bütün dalak hücrelerinden CD^{4+} T lenfositlere yüksek seçicilikte bağlandığını göstermiştir. Böylece bu nanokristallerin, hücre ayırma işlemleri için kullanışlı araçlar olabileceği ayrıca çeşitli hastalıkların tanısı, izlenmesi ve tedavisini içeren biyomedikal uygulamalarda kullanılacak potansiyel malzemeler olabileceği belirtilmiştir (Liu, 2008).

Pita ve arkadaşları, kobalt ferit nanopartiküllerini sentezleyip, altın tuzunun tekrarlamalı indirgenmesiyle eş boyutlu suda dağılılabir 21-29 nm aralığında altın kaplı manyetik nanopartikülleri elde etmişlerdir. Tiyol modifiye edilmiş peptid nükleik asit oligomerleri ile bu partiküller fonksiyonlandırılarak çözeltideki hedef DNA molekülü ile hibridizasyonu Rodamin 6G floresan etiketi ile incelenmiştir. Tek

nükleotit mutasyonunda araştırılarak çok zaman alan DNA genotipleme çalışmaları için biyosensör çalışmalarında bu partiküllerin kullanılacağı bildirilmiştir (Pita, 2008).

Mandal ve arkadaşları, 13 nm boyutunda misel çözeltisinde Fe_3O_4 nanopartiküllerini sentezleyip stabilitesini korumak ve okside olmasını önlemek için altın, gümüş gibi metallerle kaplamışlardır. Fe_3O_4 nanopartiküllerini toksik olmayan glukoz indirgeme ajanı ile kaplayarak $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-Au_{\text{ kabuk}}$ ve $(Fe_3O_4)_{\text{çekirdek}}-Ag_{\text{ kabuk}}$ yapısında partiküller elde etmişlerdir. Çeşitli yöntemlerle karakterize edilerek manyetik özellikleri incelenmiştir. Bu partiküllerin MRI ve DNA sensörü gibi uygulamalarda kullanılacağı belirtilmiştir (Mandal, 2005).

Pradhan ve arkadaşları, sonokimyasal metot denilen ultrasonik ses dalgalarıyla altın-manyetit nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Belli derişimde tetrakloraurat altın tuzu çözeltisinden 20 dakika argon gazı geçirilip, metanol, dietilenglikol ya da oleik asit ilave edilip metanol içinde dağıtılmış manyetit nanopartiküllerini ekleyerek argon gazı geçirilmiştir. Bu karışımı su soğutmalı ceket içeren reaktör içinde belli bir süre sonike ederek altın-manyetit nanokompozitleri elde etmişlerdir. Bu yeni partiküllerin biyomedikal, elektronik, optoelektronik, magnetoptik ve sensör uygulamalarda kullanılacağıni belirtmişlerdir (Pradhan, 2008).

Jeong ve arkadaşları, maghemit (Fe_2O_3) nanopartiküllerini sentezleyerek etrafında altın kabuk oluşturmak için altın tuzunu hidroksilamin ile indirgemişlerdir. Altın kaplı bu manyetik partiküllerin yüzeyine karboksil içeren alkil tiyol grubu olan merkaptohexzadekaniok asit (MHA) immobilize ederek pozitif yüklü hekza-argin esteraz (Arg_6 -esterase) enzimi ile etiketlemişlerdir. Esteraz enzimi takılmış bu altın kaplı manyetik partikülleri ile p-nitrofenol butirat olan renkli substratının kopma (dissociation) hızı izlenerek enzim aktivitesi incelenmiştir. Enzim immobilize partiküller substrat çözeltisiyle etkileştirilip UV-görünür bölge spektrumu ile p-nitrofenol butirat ürününün kopma hızı izlenmiştir. Enzim immobilize partiküller manyetik olarak ayrılıp tekrar yeni bir substrat çözeltisi ile etkileştirilerek tekrar tekrar bu partiküllerin kullanılabilirliği araştırılmıştır. Yapılan bu çalışmalar sonucunda her bir manyetik ayırmadan sonra enzim immobilize edilmiş altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hiçbir enzim aktivitesinde kayıp olmadan tekrar tekrar kullanılabilirliğini gözlemlemişlerdir (Jeong, 2006).

Polietilenimin (PEI) gibi suda çözünen hem amino hem imin gurpları içeren katyonik polimerlerle de elektrostatik olarak manyetik-altın nanopartikülleri kaplanabilmektedir. Sun ve arkadaşları, PEI modifiye edilmiş Fe_3O_4 -Au nanopartikülleri sentezleyerek bunlarla memeli hücrelerinden genomik DNA'nın yüksek verim ve saflıkta ekstraksiyonu ve DNA'nın serbest bırakılmasını başarmışlardır (Sun, 2010).

Cui ve arkadaşları, altın kaplı manyetik nanopartikülleri sentezleyerek IgG ve IgM antibadilerini partikül yüzeyine immobilize etmişlerdir. Kan içindeki HBV antijenini belirlemek için bunları katı faz substrat olarak kullanmışlardır. Yapılan araştırmalar sonucunda bunları immunolojik ve affinite esaslı tayinler için yeni bir substrat olabileceklerini belirtmişlerdir (Cui, 2005).

Manyetik altın kaplı nanopartiküller in vivo gen ve ilaç salımı uygulamalarında taşıyıcı olarak da kullanılmaktadır. Jafari ve arkadaşları, ters misel yöntemiyle sentezledikleri manyetik-altın nanopartikülleri ilaç salımı ve MRI için biyouyumlu poligliserol ile kaplamışlardır. MTT ile hücre toksitesi ve manyetik özellikleri incelenerek biyomedikal uygulamalar için uygun taşıyıcı olabilecekleri bildirilmiştir (Jafari, 2010).

Silva ve arkadaşları, mikroemülsiyon yöntemi ile 9nm boyunda demir oksit nanopartikülleri sentezleyip indirgeme ajanı olarak glikozu kullanarak altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Yeni bir altın çekirdek oluşumundan kaçınarak altın kabuğun oluşumunu kontrol ederek çeşitli yöntemlerle karakterize ederek kaplama sonucunda manyetik özelliğinde azalma olduğunu gözlemlemişlerdir (Silva, 2010).

Süperparamanyetik demir nanopartikülleri (SPION), hücre etiketleme ve ayırma, manyetik rezonans görüntüleme (MRI), ilaç salımı ve manyetik hypertermia gibi biyomedikal uygulamalarda çok kullanılmaktadır. Bu partikülleri altın ile kaplayarak ve biyolojik moleküller ile fonksiyonlandırarak oluşturulan çok fonksiyonlu bu yapılar birçok biyomedikal uygulama için çeşitli fırsatlar sunmaktadır. Suda dağılan altın kaplı demir oksit nanopartikülleri genellikle manyetik çekirdek yüzeyinde Au^{3+} iyonlarının hidroksilamin ya da sitrat ile tekrarlı indirgenmesiyle elde edilmektedir. Lu ve arkadaşları sitratla Au^{3+} iyonlarını manyetik nanopartikül çekirdekleri

yüzeyinde indirgeyerek altın ile kaplamayı gerçekleştirmişlerdir. Bu partiküllerin manyetik özelliklerini inceleyerek saf altın nanopartikül herhangi bir manyetik özellik göstermezken, altın kaplı manyetik partiküllerin süperparamanyetik özellik gösterdiğini belirterek bu partiküllerin manyetik ayırma ve saflaştırma gerektiren biyomedikal uygulamalarda kullanılabileceğini bildirmişlerdir (Lu, 2006).

Küresel şekilde altın kaplı manyetik nanopartiküllerin yanı sıra elipsoid şekilde altın kaplı manyetik nanopartiküllerde oluşturulmaktadır. Bu yeni şekildeki partiküllerin hem nanoçubuk hem de nanokabuğun optik özellikleri çok ilgi çekicidir. Bu yapılar hem aksenel hem de radyal plasmon göstermektedir. Kabuk kalınlığı değişirken aksenel plasmon sabit kalırken radyal plasmon kabuk kalınlığı arttıkça azalmaktadır. Bu nanopirinç (nanorice) yapıların çevreye yüksek duyarlı plasmon özellikleri, kimyasal ve biyolojik proseslerde ortam değişikliklerini lokal olarak izlemek için büyük potansiyel taşımaktadırlar. Bu eşsiz optik özellikteki yeni nano yapıların yüzey artırılmış spektroskopiler ya da SPR sensörleri gibi nanosensör uygulamalarında önemli bir yere sahip olacakları düşünülmektedir. Wang ve arkadaşları, çubuk şeklinde maghemit (Fe_2O_3) nanopartikülleri sentezleyerek aminopropiltrimetoksilan (APTMS) ile fonksiyonlandırarak altın kolloidlerin yapıya bağlanması sağlanmıştır. Bu şekildeki çekirdek partiküllerine altının otokatalitik kaplanması ile kabuk yapısı oluşturulup pirinç şeklinde "nanorice" denilen kompozit partiküller elde edilmiştir (Wang, 2006).

2.4. Altın Nanoçubuklar

Altın nanopartiküllerin sentezi ve özellikleri ile ilgili birçok çalışma bulunmaktadır. Çubuk şeklindeki nanopartiküllere olan ilgi akımı Mie-Gans teorisinden dolayı eşsiz optik özelliklerinden dolayı oluşmuştur.

2.4.1. Altın Nanoçubukların Optik Özellikleri

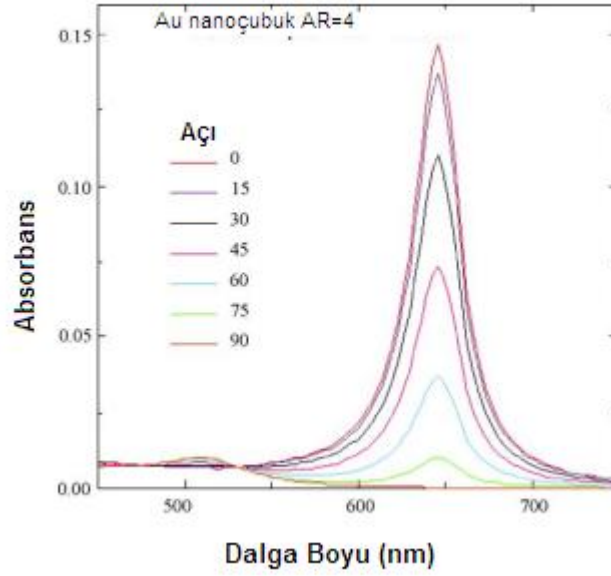
Küçük partiküllerin elektronik, kristalografik, mekanik ve katalitik özellikleri bulk materyallerinden farklıdır. Küçük elipsoid partiküllerin uzunluk/çap (aspect ratio, L/D) oranlarının değişmesiyle plasmon mod piklerinin nasıl değiştiği Gans' eşitliği ile ispatlanmıştır.

Altın nanoçubuklar değişik refraktif indeksine sahip farklı çözücüler içinde renklerini değiştirmektedir. Bu da altın nanoçubukların çevrelerindeki dielektrik özelliklerine oldukça duyarlı olduğunu göstermektedir. Uzunluk/çap oranlarına bağlı olarak renklerinde de değişme göstermektedirler. Partiküllerin bu optik özellikleri boy ve şekline göre değişmektedir. Bu optik özellikleri, metal iletken elektronları ile elektromanyetik ışıma bileşenlerinden elektrik alanla arasındaki etkileşime bağlıdır. Özellikle altın, gümüş, kurşun gibi metaller güçlü absorpsiyon bandları görünür bölge spektrumunda gösterirler ve parlak renk verirler. Bulk halindeki meteryallerde bu özelliği göstermezler.

Altın nanoçubukların etrafı bir kabukla kaplandığında ise kabuğun refraktif indeksine göre bir değişim gösterir. İnce absorpsiyon yapmayan bir kabuğun etkisi, aynı refraktif indeksteki ortam içinde bulunan partiküllerdeki spektral kayma aynı olur. Kabuk katmanı partikülün bulunduğu ortamın refraktif indeksinden farklı ise hem aksenel hemde radyal moddaki yüzey plazmonunda kaymaya neden olur. Örneğin antibadi takılmış bir altın nano çubuk antijen bulunan bir ortamda, eğer antijenin refraktif indeksi sudan daha büyükse plazmon modunda bir kaymaya neden olacaktır (Perez-Juste, 2005).

Oryantasyon Etkisi

Nanoçubukların hem aksenel hem de radyal yöndeki lokalize plazmon rezonansları birbirinden ayrılır. Bunlar polarize ışık ile altın nano çubukların uzun aksenine paralel ve dikey elektrik alanının osilasyonu ile seçici olarak uyarılmaktadır. Işık çubuğun uzun aksenine paralel (0°) de polarize edildiğinde sadece aksenel yüzey plazmonu uyarılarak 645 nm 'de bant göstermektedir. Tam tersi, ışık uzun aksenine dik polarize edildiğinde (90°) yüzey plasmon uzun band tamamen uzaklaşarak sadece radyal mod uyarılmaktadır. Aradaki açılarda ise her iki modun dağılımı ortaya çıkmaktadır. Şekil 2.8'de su içinde oryante olmuş altın nanoçubukların farklı açılarda gösterdiği spektrum gösterilmiştir.



Şekil 2.8. Su içinde oryante olmuş altın nanoçubukların farklı açılarda gösterdiği spektrum.

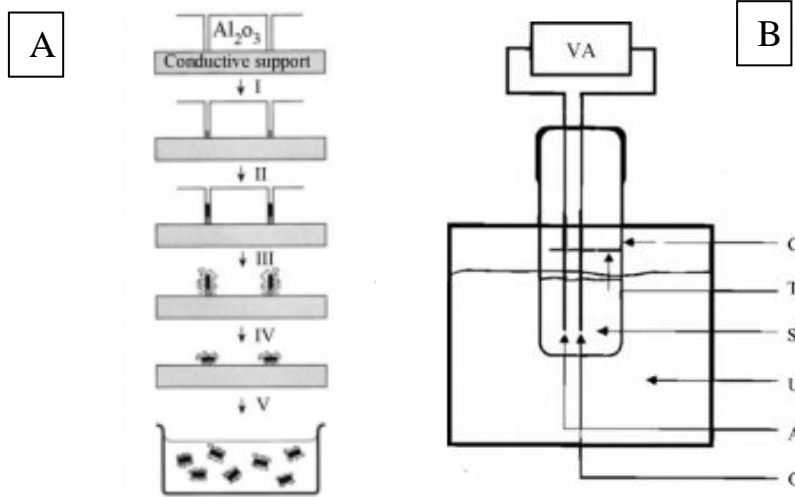
2.4.2. Altın Nanoçubuk Sentezi ve Oluşum Mekanizması

2.4.2.1. Template Metot

İlk olarak bu metot Martin ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu metot, nano gözenekli polikarbonat ya da alümina template membranlarının gözeneklerinde altının elektrokimyasal yüklenmesi (deposition) yöntemine dayanmaktadır. Martin ve arkadaşları Au/alümina kompozitlerinin optikçe şeffaf olduğunu ve ayrıca hazırlanan nanosilindirlerin uzunluk/çap oranlarını değiştirerek kompozit membranlarının renklerini değiştirebilmişlerdir. Başlangıçta elektrokimyasal metotla bir polikarbonat membran üzerine altının depozite edilmesiyle mikroskopik elektrotlar hazırlamak için template metot kullanılmıştır. Daha sonraları bu metot nanokompozitleri sentezlemek için değil ayrıca templatede sentezlenmiş altın nanoçubukları su içinde dağıtmak içinde uygulanmıştır. Ayrıca polimer stabilizasyonu ile membranı çözen organik çözücüler içinde de çubukların süspansiyon edilmesini sağlamıştır (Martin, 1996).

Bu metot kısaca şöyledir; başlangıçta az miktarda Ag ya da Cu alümina destek membranı üzerine püskürtülerek elektrodeposition için iletken bir film

oluşturulmaktadır. Daha sonra bu yüzey üzerinde Au nanopartiküllerin elektrokimyasal olarak büyümesi için kullanılmaktadır. Altın alüminanın nano gözenekleri içinde elektrodepozite edilmektedir. Diğer adımda polivinil pirolidon gibi polimerik bir stabilizör varlığında alimüna membran ve bakır ya da gümüş gibi filmi seçici çözme işlemi yapılmaktadır. Son adımda da oluşturulan nanoçubuklar su ya da organik faz içinde sonikasyonla dağıtılmaktadır. Bu şekilde sentezlenen altın nanopartiküllerin çapı alimüna membranın gözenek çapı ile bağlantılıdır. Böylece istenilen farklı çaptaki altın nanoçubukları kullanılan template'in gözenek çapı kontrol edilerek hazırlanabilmektedir. Nanoçubukların uzunluğu ise, membran gözeneği içine deposite edilen altın miktarı ile ayarlanabilmektedir. Benzer teknikle değişik membranlar kullanılarak değişik altın nanotüpler, nanokompozitler geliştirilmiştir. Template metodundaki temel limitasyon verimdir. Tek tabaka çubuk yapının hazırlanması zor ve bunun sonucunda çok az miligram miktarda çubuk elde edilmektedir.



Şekil 2.9. Altın nanoçubuk sentezleme yöntemleri. A) Template metot, B) Elektrokimyasal metot

2.4.2.2. Elektrokimyasal Metot

İlk olarak Wang ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Wang ve arkadaşlarının yaklaşımı, organik çözücü sistemlerinde ters miseller içinde geçiş metal kürelerinin elektrokimyasal sentezine dayanmaktadır (Wang, 1999). Bu metot yüksek verimde altın nanoçubukların sentezini sağlamaktadır. Bu sentez basit iki elektrot tipi

elektrokimyasal bir hücrede gerçekleştirilmektedir. Bir altın plaka anot olarak, platin plaka ise katot olarak aynı boyutlarda kullanılmaktadır. Her iki elektrotta katyonik yüzey aktif madde (surfaktant) olan, $C_{16}TAB$ (hekzadesiltrimetilamonyumbromide) ve az miktarda nanoçubuk oluşumunu sağlayan kosurfaktant olarak kullanılan hidrofobik katyonik surfaktant olan tetradodesil amonyum bromid ($TC_{12}AB$) içeren çözelti içine daldırılır. $C_{16}TAB$ ayrıca oluşan nanopartiküller içinde stabilizör olarakta davranmaktadır. Bu karışımı içeren elektrostatik hücrede $36\text{ }^{\circ}C$ 'de ultrasonik banyo içine daldırılır. Elektrolizden önce, gerekli miktarda aseton ve sikloheksan elektrolitik çözelti içine ilave edilir. Aseton, $C_{16}TAB$ miselleri içindeki silindirik şekli sağlayan kosurfaktanttır. Misel yapısını oluşturmasını bollaştırmak için kullanılmaktadır. Sikloheksan ise $C_{16}TAB$ miseller içindeki çubuk şeklindeki yapının uzatılmasını artırmak için kullanılmaktadır. Kontrollü akım elektrolizi 3 mA akım ile 30 dk 'da proses gerçekleştirilmektedir. Bu sentez boyunca, bulk altın metal anodu tüketilerek $AuBr_4^-$ iyonu oluşturulmaktadır. Bu anyonlar katyonik surfaktantlarla kompleks oluşturarak indirgenmenin olduğu katota göçerler. Yalnız hala çekirdeklenmenin katot üzerinde mi miseller içinde mi olduğu bilinmemektedir. Sonikasyon işlemide, oluşan çubukları yüzeyden uzaklaştırmak ya da katot yüzeyinde çubukların kırılmaması için yapılmaktadır. Altın nanoçubukların uzunluk/çap oranlarını kontrol etmek içinde Pt elektrodun arkasında elektrolitik çözeltinin içine bir gümüş plaka daldırılmaktadır. Gümüş plaka tarafından oluşturulan gümüş iyonları ile anot tarafından oluşturulan altın iyonları arasında redoks reaksiyonu olmaktadır. Şekil 2.9'da elektrokimyasal metot şematik olarak gösterilmiştir. Wang ve arkadaşları gümüş iyonlarının derişimi ve bunların salınım hızının nanoçubukların uzunluğunu belirlediğini bulmuşlardır. Gümüş iyonlarının mekanizmadaki rolü henüz bilinmemektedir.

2.4.2.3. Çekirdek Geliştirme Metodu (Seed Growth Method)

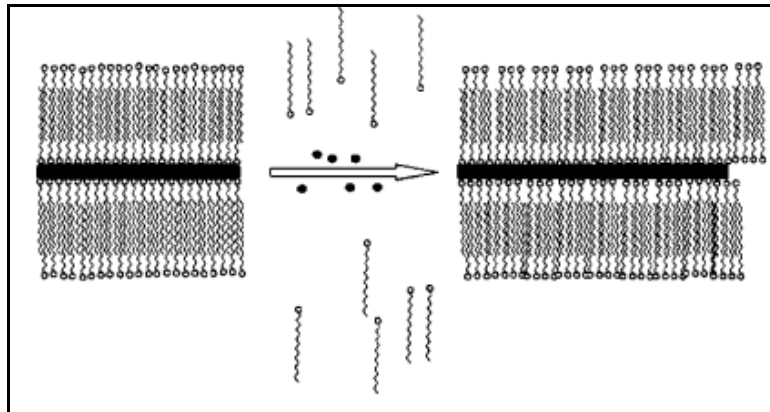
Monodispers kolloit partiküllerin, çekirdek geliştirilmesi yöntemi 1920'lere dayanmaktadır. Birçok araştırmacı tarafından monodispers metal nanopartiküllerin sentezlenmesinde bu yöntemi kullanmıştır. Çekirdek geliştirme metodu ile altın nanoçubuk sentezleme yöntemi Şekil 2.11'de gösterilmektedir. Natan ve arkadaşları küresel altın nanopartikül çözeltisi içindeki altın kolloid yüzeyinde

hidroksilamin gibi zayıf bir indirgeyici ajanla Au^{3+} 'ün indirgenmesine dayanmaktadır (Natan, 1998). Frens metoduyla monodispers 20 ve 100 nm boyuntunda oluşturulan altın nanopartikülleri kullanarak sodyum sitratı indirgeyici ajan olarak kullanarak altın nanoçubukları sentezlemişlerdir. Bu araştırmacılar, hidroksilaminle yapılan altın nanoçubuk oluşumunun çok az olduğunu belirtmişlerdir. Jana ve arkadaşları, 12 nm boyunda sitratla stabilize edilmiş altın nanopartikülleri değişik indirgeme ajanları ve koşullarını kullanarak çekirdek geliştirme yöntemiyle altın nanoçubuk oluşumunu çalışmışlardır. Çekirdeklerin varlığında ek bir çekirdeklenmenin olduğunu belirtmişlerdir. Ek bir çekirdeklenmeden indirgeme ajanının metal çekirdek ve metal tuzu çözeltisine ekleme hızı, indirgeme ajanının kimyasal indirgeme potansiyeli gibi kritik parametrelerin kontrol edilmesiyle kaçınılabileceğini ifade edilmiştir (Jana, 2001). Adım adım partikül büyütme metodu büyük çekirdek/altın tuzu oranında başarılı geliştirme adımları boyunca devam ettirilebilmektedir. Murphy ve arkadaşları 5-40 nm boyutunda küresel uniform boyda altın nanopartikülleri sentezlemişlerdir. Birincil çekirdek denilen 3.5 nm çapında altın çekirdekleri sitrat varlığında altın tuzunun borohidrit ile indirgenmesiyle hazırlamışlardır. Geliştirme adımında, surfaktant çözeltisi ortamında gerçekleştirmişlerdir. İkinci çekirdeklenmeyi geliştirme adımında geliştirme (büyütme) koşullarını kontrol ederek engellemişlerdir. Bunun içinde, çekirdek yok iken misellerin varlığında altın tuzunu indirgemeyen zayıf indirgeme ajanı olan askorbik asidi kullanarak yapmışlardır (Murphy, 2001). İstenilen uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar surfaktant çözeltisi ortamındaki büyütme koşulları kontrol edilerek sentezlenebilmektedir. Gümüş nitratin ($AgNO_3$) eklenmesi sadece altın nanoçubukların verimi ve uzunluk/çap oranını etkilemesinin yanı sıra altın nanoçubuk oluşum mekanizmasını ve buna bağlı olarak kristal yapısını da etkilemektedir. Böylece $AgNO_3$, altın nanoçubukların kristal yapısı, morfolojisi ve optik özelliklerinde önemli bir rol oynamaktadır.

a) $AgNO_3$ Kullanmadan Altın Nanoçubuk Sentezi

Murphy ve arkadaşları, sitrat varlığında sodyum borohidrit ile indirgenerek 3.5 nm boyunda altın nanoçekirdekleri kullanarak yüksek uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. Bu yöntemde $C_{16}TAB$ ve askorbik asit derişimini

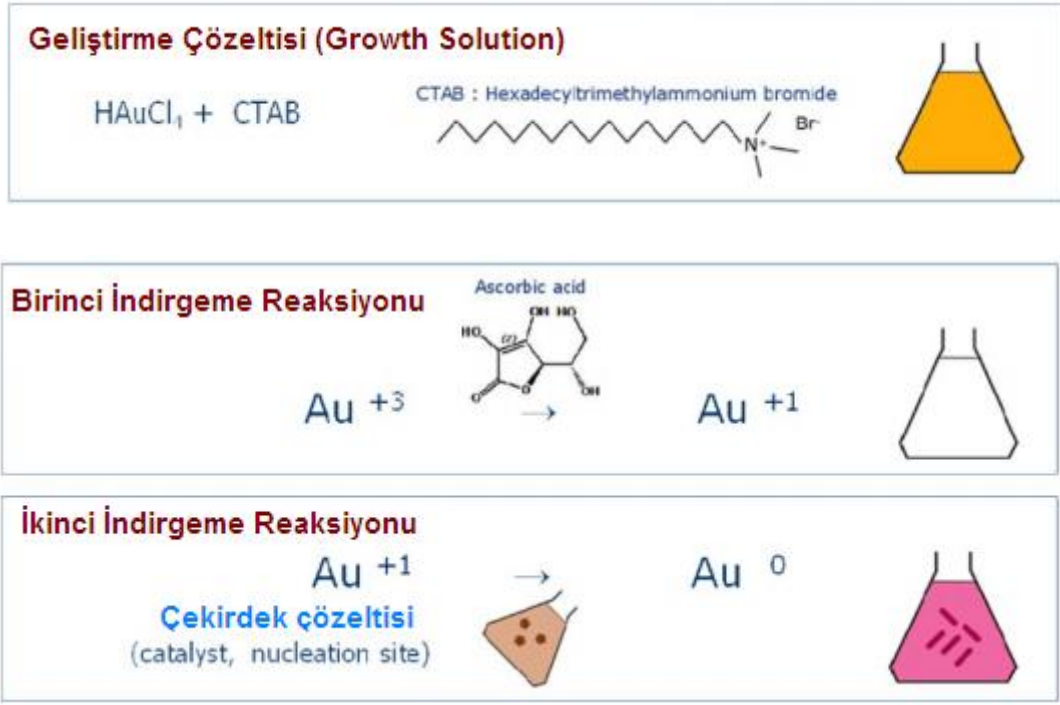
optimize ederek, 2 ve 3 adımda çekirdeklenme prosesi uygulayarak büyüme koşullarını çok dikkatli kontrol etmişlerdir. Bu yöntemle yaklaşık %4 gibi bir verimde altın nanoçubuk elde etmişlerdir. Uzun altın nanoçubukları küresel ve fazla olan yüzey aktif maddeden santrifüjle ayrılmıştır. Daha sonra aynı grup sadece pH kontrolü ile monodispers büyük uzunluk/çap oranında altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirmişlerdir. Büyütme çözeltisinin pH'ını 2.8' den 3.5 ve 5.6'ya çekerek 18.8 ve 20.2 uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar elde etmişlerdir. Çubuk şeklinde nanopartiküllerin, surfaktant çözeltisi ortamında oluşum mekanizması henüz tam açıklanamamıştır. Fikirlerden birine göre $C_{16}TAB$ molekülü altın nanoçubukların üzerine çift katlı yağ molekülü şeklinde absorplanmaktadır. Tetrametil amonyum baş grupları altın yüzeyinde ilk tek tabakayı oluşturmaktadır. Murphy ve arkadaşları $C_{16}TAB$ nın baş gruplarının altın nanoçubuğun pentahedral çift taraflı kristalografik yüzeylerine bağlandığını savunmaktadırlar. Altın nanoçubuklar $C_{16}TAB$ moleküllerinin çubuk geliştirilmesi sırasında farklı kristal yüzeylerine absorplanmasıyla misel bir yapı meydana getirilmesiyle oluşturulmaktadır. C_nTAB 'deki hidrokarbon uzunluğu nanoçubuğun sadece uzunluğunu değil ayrıca verimini de etkilemektedir. Kısa zincir uzunluğu kısa çubuklar oluştururken uzun zincir uzunluğu yüksek verimde uzun çubuklar oluşturmaktadır. $C_{16}TAB$ 'in farklı kristal yüzeylerine çift katlı tercihli absorpsiyonu incelendiğinde, yüzey aktif madde kuyruklarının fermuar şeklinde (zipping) yapı oluşturmasıyla kararlı çift katlı tabaka ile uzun nanoçubuk oluşumuna öncü olmaktadır (Şekil 2.10). (Murphy, 2001; Murphy 2003).



Şekil 2.10. Altın nanoçubuk oluşumunda kullanılan C_n TAB yüzey aktif maddesinin oluşturduğu çift tabakalı fermuar (zipping) yapısı.

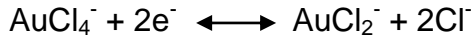
Perez-Juste ve arkadaşları sıcaklık ve C_{16} TAB derişimi azaltıldığında uzunluk/çap oranı 1 ve 6 arasında küçük uzunluk/çap oranında ve %50 verimle altın nanoçubuk sentezleneceğini belirtmişlerdir. Uzunluk/çap oranının kontrol edilmesi, monodispersite ve verimi etkileyen birçok faktör bulunmaktadır. Bunlar, çekirdeğin kararlılığı, sıcaklık, surfaktantın yapısı ve derişimidir. C_{16} TAB ile kaplı çekirdeklerden sitratla stabilize edilmiş çekirdeklerden daha çok verimle altın nanoçubuk sentezlendiği belirtilmiştir. Az miktarda çekirdek eklendiğinde uzunluk/çap oranı yüksek altın nanoçubuklar elde edilmiştir. Bu da aksel plasmon bandında kaymaya neden olmaktadır. Uzunluk/çap oranı arttıkça aksel plasmon dalga bandında kayma göstermektedir. Perez ve arkadaşları surfaktant çözeltisinde altın nanoçubuk sentezinde bir elektrik alanı uygulamışlar ve katyonik misellere altın tuz iyonlarının bağlanmasıyla ilgili mekanizmayla bir takım sonuçlar almışlardır (Perez-Juste, 2004). Bunlar:

- Çekirdeklerin kolloidal stabiliteleri arttıkça oluşan çubuk verimi artmıştır.
- Br^- iyonlarının C_nTA^+ varlığında Cl^- iyonlarına göre daha iyi çubuk oluşumunu desteklediğidir. Surfaktant kuyruğunun (C_n) uzunluğunun artması çubukların uzunluk/çap oranını ve çubuk oluşum verimini artırmaktadır. $NaCl$, NaS_3 ya da $NaBr$ eklenmesi çubukların uzunluk/çap oranını azaltmaktadır. İyonik gücün artırılması çubuk oluşum verimini azaltmaktadır.
- Optimum koşullarda çekirdek/ $HAuCl_4$ oranı ile uzunluk/çap oranı kontrol edilebilmektedir. Çekirdek/ $HAuCl_4$ oranı arttıkça uzunluk/çap oranı azalmaktadır.
- $AuCl_4^-$ ve $AuCl_2^-$ iyonları $C_{16}TAB$ 'e absorplanmaktadır. $C_{16}TAB/HAuCl_4$ optimum derişim oranı çok dar bir pencerededir. $C_{16}TAB/HAuCl_4$ oranı 10:1'den küçükse çökme olur. Sıcaklığın artırılmasından kaçınılmalı yoksa yüksek sıcaklıklarda çubuk oluşum verimi azalmaktadır.

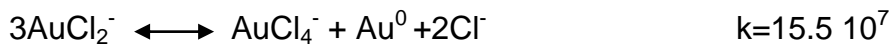


Şekil 2.11. Çekirdek geliştirme metoduyla altın nanoçubuk sentezi.

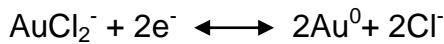
C_{16}TAB varlığında, askorbik asit Au^{III} 'yü Au^{I} 'e indirgemektedir.



Kolloidal altın oluşmamakta $\text{AuCl}_2^- \text{-C}_{16}\text{TAB}$ 'e parçalanmaktadır. C_{16}TAB varlığında kolloidal altına HAuCl_4 eklenerek $\text{AuCl}_2^- \text{-C}_{16}\text{TAB}$ oluşmaktadır.



Au^{I} 'e indirgenmesiyle elektronca zengin altın çekirdeklerinin yüzeyine elektron transferi olmaktadır.

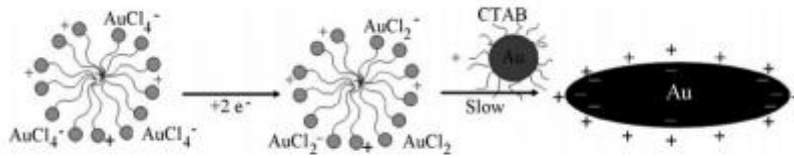


C_{16}TAB varlığında indirgeme reaksiyonu aşağıdaki gibi olur.



Tipik mikroelektrot tipi çöktürme boyunca, elektronlar altın nanopartiküllere transfer olunur. $AuCl_2^-$ iyonları elektronları alarak uygun absorpsiyon bölgelerine absorplanır. Tipik küresel altın nanopartiküllerin oluşturulması bu şekildedir.

$C_{16}TAB$ içeren çözeltide altın çekirdekleri $C_{16}TAB$ ile kapsülenererek altın iyonları $C_{16}TAB$ 'e bağlanır. Altın nanoçubuk oluşum hızı, $AuCl_2^-$ ile yüklü katyonik misellerle katyonik altın çekirdek partiküllerinin çarpışma frekansı ile belirlenmektedir. Bu etkileşim miseller ile altın nanoçubuklar arasındaki elektriksel çift tabakanın etkileşimi ile kontrol edilmektedir. Reaksiyon hızı misellerin çarpışma hızıyla kontrol edilir. Misellerin uç kısımlarının yan bölgelerinden daha hızlı çarpışmasıyla çubuk oluşmaktadır. Şekil 2.12'de altın nanoçubuk oluşum mekanizması gösterilmektedir. Monodispers altın nanoçubukları küçük boyuttaki küresel partiküllerden santrifüjle ayrılmaktadır. Aynı boyuttaki çubuk ve kürelerin birbirinden ayrılmasında santrifüjleme işlemi kullanışlı değildir. Boyut seçici çöktürme ya da ekstraksiyon metotları farklı boydaki küresel karışımları ayırmak için kullanılırken çubukların büyük boyutları için kullanılmamaktadır. Nano gözenekli filtrelerle şekil ayrımı yapılmasında da çubukların kısa eksenlerinin küresel olanlarla yaklaşık aynı boyutta olduğu için kullanışlı bir yöntem değildir. Wang ve arkadaşları boyut kromatografi yöntemiyle çubukları kürelerden ayırmışlardır.



Şekil 2.12. Altın nanoçubuk oluşum mekanizması.

b) $AgNO_3$ Kullanarak Altın Nanoçubuk Sentezi

$AgNO_3$ varlığında altın nanosenteziyle elektrokimyasal ya da diğer metotlara göre şekli daha iyi kontrol edilebilmekte ve ayrıca çubuk oluşum verimi artmaktadır. Ag^+ iyonlarının metal nanopariküllerin şekillerini modifiye etme mekanizması henüz anlaşılammıştır. Hipoteze göre Ag^+ iyonları partikül yüzeyine $AgBr$ şeklinde

absorplanıp AgBr ile pasifize edilmiş kristal yüzeylerinin gelişmesi engellenmektedir. Askorbik asit indirgeme gücünü çok düşük pH'larda azalmaktadır. Nikoobakht ve El Sayed yeni bir çekirdek geliştirme metodu geliştirerek daha önceki metottaki bazı sınırlamaları ve zorlukları ortadan kaldırmıştır. Sitrat kaplı çekirdekler yerine C₁₆TAB kaplı çekirdekleri kullanarak silindirik olmayan ya da farklı şekilsiz partiküllerin oluşumunu engellemişlerdir. %99 verimle uzunluk/çap oranı 1.5 ile 5 arasında altın nanoçubuklar elde etmişlerdir. Her iki tip çekirdekle oluşturulan altın nanoçubukların farklı kristal yapısına sahip olduğunu görmüşlerdir. Çubuk geliştirme çözeltisindeki gümüş iyonlarının miktarının artırılmasıyla istenilen uzunluk/çap oranında altın nanoçubuklar elde edilmiştir. Gümüş derişiminin artırılmasıyla aksel plasmon bandında kayma oluşturulmuştur. Ancak kritik bir gümüş derişiminin üzerinde altın nanoçubukların uzunluk/çap oranının tekrar azaldığı görülmüştür. Altın nanoçubukların uzunluk/çap oranının Ag iyonları ile kontrol edilebildiği gibi ayrıca sabit derişimdeki Ag⁺ varlığında nanoçubuk geliştirme çözeltisine çekirdek çözeltisi miktarının artırılmasıyla da kontrol edilebilmektedir. Altın iyon derişimi (Au³⁺) ≈6.10⁻⁴ M'a çıkartıldığında daha büyük uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklar elde edilmektedir. Askorbik asit derişimi oluşturulan çubuğun yapısının (morfolojisi) yanında verim ve uzunluk/çap oranını da etkilemektedir. Askorbik asit miktarı arttıkça uzunluğun ve verimin azaldığı görülmüştür. Bu etki çok fazla miktardaki indirgeme ajanlarının varlığında çekirdeklerin çok hızlı bir substrat gibi davranmasından kaynaklanmaktadır. Tek bileşenli C₁₆TAB gibi bir surfaktant kullanılarak gümüş iyonları ya da altın çekirdek derişiminin artırılmasıyla aksel plasmon bandı 825 nm'ye kadar uzunluk/çap oranı 4.5 kadar olan altın nanoçubuklar sentezlenmektedir. Nikoobakht ve El Sayed uzunluk/çap oranı 5'in üzerinde olan altın nanoçubuk sentezlemek için BDAC (Benzildimetil amonyumklorit) / C₁₆TAB karışımı olan ikili surfaktant sistemi kullanmışlardır. BDAC/ C₁₆TAB oranı 16'dan 2'ye kadar değiştirilerek uzunluk/çap oranı 5 ve 8'e kadar altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. İlk gelişme adımı 1 saat içinde olurken ikinci geliştirme adımı 1 haftadan fazla zaman almıştır. Surfaktant oranı arttıkça çok miktarda küresel nanopartikülleri oluşumunu azaltarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. İlk gelişme adımından sonra farklı miktarlarda gelişme çözeltisi aşama aşama eklenerek nanoçubuğun boyu uzatılmıştır (Nikoobakht, 2003; El Sayed, 2003).

Altın nanoçubuk oluşumundaki gümüş nitratin etkisinin mekanizması henüz açıklanamamıştır. İki farklı mekanizma ileri sürülmektedir. Bunlardan birincisi, surfaktant derişimi ve çözeltilinin iyonik gücüne bağılı belli bir boyutta surfaktant bir kalıp oluşturmaktadır. Altın ve gümüş iyonları içeren geliştirme çözeltilisine askorbik eklendiğinde altın iyonları indirgenmektedir; çünkü gümüş iyonları sadece bazik pH'larda indirgenmektedir. Nikoobakht ve El Sayed C₁₆TAB surfaktantının baş gruplarına gümüş iyonlarının yerleşmesiyle Ag-Br çifti oluşturup bromid iyonlarının yük yoğunluğu azalmaktadır. Böylece altın yüzeyindeki birbirine komşu baş gruplar birbirini iterek C₁₆TAB misel yapıları uzayacaktır. Bu sadece C₁₆TAB monomerlerinin yan yüzeylere uç yüzeylerine göre daha fazla afinite göstermesinde olabilmektedir. HRTEM görüntüleri altın nanoçubukların dört yüzeyinin olduğunu göstermektedir. BDAC:C₁₆TAB surfaktant karışımı kullanıldığında C₁₆TAB monomerleri yan yüzeylere BDAC monomerlerinin uç yüzeylere yüksek afinite göstermesiyle Ag-Cl çiftinin Ag-Br çiftine göre daha zayıf bağlanmasıyla eksenel yönde gelişme hızı daha büyük olmaktadır.

İkinci mekanizmaya göre, C₁₆TAB monomerlerinin rijit yapısı nedeniyle tek yönlü gelişme olduğudur. Gümüş iyonlarının olmadığıda uzun çubukların zipping mekanizmasıyla oluşumuna benzer bir mekanizma göstermektedir. Askorbik asit ilave edildiğinde gümüş iyonları indirgenmeyerek Ag-Br yapısı oluşturmaktadır. Ag-Br yapısının altın nanokristaller yüzeyine adsorplanmasıyla altın indirgenmesini yavaşlatarak altın nanoçubukların tek kristal oluşumunu sağlamaktadır.

2.4.2.4. Diğer Altın Nanoçubuk Sentez Yöntemleri

Diğer metotlarla elde edilen altın nanoçubuk yöntemlerinde az verimde, tekrarlanabilirliği az olan ve yeterli verimde uzun nanoçubuk elde edilememesi gibi kısıtlamalarla karşılaşmıştır.

Yang ve arkadaşları, fotokimyasal metotla altın nanoçubuk sentezlemişlerdir. Elektrokimyasal yöntemine benzer bir çubuk geliştirme çözeltilisi hazırlanarak farklı miktarlarda gümüş nitrat eklenerek herhangi bir indirgeme ajanı kullanmadan gerçekleştirilmiştir. Altın nanoçubuk oluşumu UV ışık ile indüklenmektedir. Gümüş iyonu artırıldığında uzunluk/çap oranı artmış, gümüş iyonu olmadığıda küresel partikül oluşturulmuştur (Yang, 2002). Yamada ve arkadaşları mika yüzeyi

üzerinde gümüş nitrat içermeden çekirdek geliştirme yöntemini kullanmışlardır. Mika yüzeyine küresel çekirdek nanopartikülleri yerleştirilerek C₁₆TAB içeren geliştirme çözeltisine daldırılmıştır. Yaklaşık %15 oranında nanoçubuk geliştirilmiştir. Wei ve arkadaşları aynı metodu cam yüzeyler için modifiye etmişlerdir. Çekirdek yüzeyine takılmış uzatma kolunun ve altın tuz derişiminin oluşturulan altın nanoyapılara etkisi incelenmiştir (Yamada, 2003).

2.4.3. Altın Nanoçubukların Kullanım Alanları

Altın nanoçubukları temel olarak hastalık tayini ve teşhisi, hastalık tedavisi olmak üzere iki farklı alanda kullanımı bulunmaktadır.

2.4.3.1. Tedavi Uygulamaları

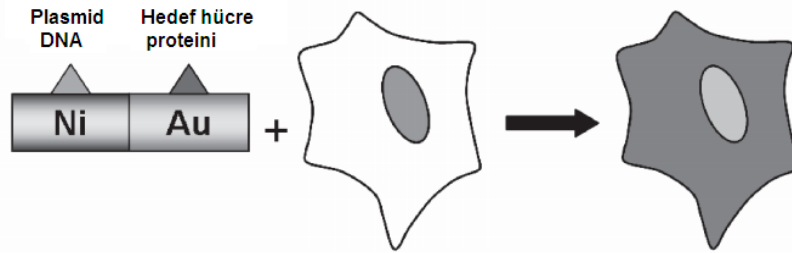
Altın nanoçubukların gen transferi ve fototermal terapi olmak üzere iki tedavi uygulamasıda bulunmaktadır.

Gen Transferi

Gen terapisi, plasmid DNA'nın hedef hücreye taşınıp etkili bir şekilde salınmasına bağlıdır. Gen transferinde genellikle taşıyıcı sistemler önemli hücresel bariyerlerle karşılaşmaktadır. Son zamanlarda biyolojik aktiviteyi tetiklemek için foton ışınlanması uygulayarak nano taşıyıcı sistemlerin iyi kontrol edilme ile ilgili çalışmalar başlamıştır. Bu şekilde taşıyıcı sadece geni hücreye transfer etmeyip aynı zamanda gen ekspresyonunu da başlatmaya yardım etmelidir. Yakın kızılaltı ışını (NIR) iyi bir tedavi ajanıdır. Dokuların en derin kısımlarına kadar nüfuz etmekte ve UV-görünür ışını ile karşılaştırıldığında daha az zarar vermektedir. Örneğin, yeşil floresan protein geni (EGFP) konjuge edilmiş altın nanoçubukları hem in vivo hem de in vitro olarak gen ekspresyonunu izlemek ve görüntülemek için kullanılmıştır. NIR ışınının etkisini UV-görünür spektroskopisi, elektroforez ve TEM ile karakterize etmişlerdir. EGFP-altın nanoçubuk yapısının laser uygulamadan önce ve sonraki optik ve yapısal özellikleri incelenmiştir. EGFR-altın nanoçubuk konjugatı femto saniye NIR ışınına maruz bırakıldığında altın nanoçubukların boyutu ve şekli değişerek DNA'yı Hela hücrelerine gönderip aynı dozda NIR ışınına maruz bırakılmış hücrelerde bu dozda herhangi bir öldürücülük gözlenmezken GFP ekspresyonunun laser gönderilen yerde başladığı gözlenmiştir.

Altın nanoçubuklarla gen transfeksiyonunun verimi hücreye hedef ligandlar kullanarak artırılabilir (Megan, 2007).

Salem ve arkadaşları, gözenekli-alumina membranında elektrodepozisyon yöntemiyle altın-nikel nanoçubukları sentezleyerek gen transfeksiyonunu incelemiştir. Nanoçubuğun nikel segmentinde karboksil uç grubu oluşturularak plasmid DNA nikel kısmına bağlanmıştır. Hedef hücreye yönlendirmek için hedef hücreye spesifik transferin proteinini nanoçubuğun altın segmentine bağlanmıştır. Bu nanoçubuk yapısı kullanılarak insan embriyonik böbrek memeli hücre hattına (HEK293) yeşil floresan proteini (GFP) ile etiketli genlerin in vitro transfeksiyonu gerçekleştirilmiştir. Altın-nikel nanoçubuğun hücre stoplazmasına girişi TEM ile incelenerek hücreye girmeden önce plasmidin salımı gözlemlenmiştir. Şematik olarak Şekil 2.13’de gösterilmiştir (Salem, 2003).



Şekil 2.13. Nikel-altın nanoçubuk yapısıyla gen transfeksiyonu.

Fototermal Terapi

Genellikle cerrahi müdahale kullanılmadan termal terapi ya da “hyperthermia” olarak adlandırılan ısı etkisi ile tümör hücrelerinin parçalanması yöntemidir. Hedef bölgede sıcaklığın artırılmasında, infrared lambaları, ultrasonik ses dalgaları, radyo frekansı göstermelerine karşın, nanokabuk ya da nanoçubuklara göre ısıtılma verimlerinin daha düşük olması ve orta görünür bölge dalga boylarında rezonans oluşturmaları nedeniyle doku örneklerinde fototermal terapi uygulamalarında çok fazla kullanılamamaktadır. Altın nanoçubuklarla bu limitasyonlar aşılarak ışık enerjisi termal enerjiye verimli bir şekilde dönüştürülmektedir. Altın nanoçubukların aksenel plasmon rezonans dalga boyunun NIR dalga boyunda olması nedeniyle doku uygulamaları bu aralığa girmektedir. Ayrıca dar plasmon absorpsiyon band genişliği göstermektedir. Bu

özelliklerin hepsi fototermal terapi sırasında sağlıklı hücrelerin zarar görmesini azaltmaktadır. İn vitro çalışmalarda altın nanoçubuklar hedef moleküle spesifik molekül ile fonksiyonlandırılıp hedef hücre ile etkileştirilip daha sonra uyarılmıştır.

Huff ve arkadaşları, folik asit ligandlarını altın nanoçubuklarına konjuge etmişlerdir. Folik asit konjuge altın nanoçubukları, ağız epitel türevli tümör hücre hatları olan KB kanser hücrelerine yüksek seçicilikte bağlanmaktadır. Laser ışınlanması sonucu hücre membranlarında fototermal hasar oluşmuştur (Huff, 2007).

Huang ve arkadaşları, bifonksiyonel altın nanoçubukları kullanarak kanser hücrelerini fototermal olarak tahrip etmişlerdir. Anti-EGFR ile altın nanoçubukları konjuge edip bu antibadiye spesifik kanserli olmayan epitelyum hücre hattı (HaCaT) ve iki kanserli ağız epitelyum hücre hatları [HOC313, HSC3] ile inkübe etmişlerdir. Laser ışınlanması sonucu kanser hücreleri normal hücreleri öldürmek için gerekli lazer akısının yarısı kadar bir akı ile tahrip edilmiştir (Huang, 2006). Bu yöntemle sadece kanser hücreleri tahrip edilmemektedir. Pissuwan ve arkadaşları, makrofaj hücre hatlarına spesifik bağlanan CD11b antibadisini altın nanoçubuklara konjuge ederek laser ışınlanması ile bunları tahrip etmişlerdir. (Pissuwan, 2007). Ayrıca aynı grup, patojenik parazit olan *Toxoplasma gondii* 'e spesifik bağlanan antibadi konjuge edilmiş altın nanoçubuklarını kullanarak laser uygulamasından sonra %80 oranında organizmanın "tachyzoites"i tahrip edilmiştir.

2.4.3.2. Hastalık Teşhis ve Tanı Uygulamaları

Altın nanopartiküllerinin güçlü ışık absorpsiyonu ve saçılımı nedeniyle biyomedikal tanı sistemlerindeki görüntülemeye etiket ve kontrast ajanı (contrast agent) olarak kullanılmaktadır. Özellikle altın nanoçubukların optik absorpsiyon verimleri aynı hacimde küresel altın nanopartiküllerine göre 20 kat daha fazla olması ve ışık saçılma sabitinin nanoküre ve nanokabuklara göre oldukça büyük olması nedeniyle biyomedikal tanı ve teşhis uygulamalarında altın nanoçubuklar daha çok kullanılmaya başlanmıştır.

Görüntülemeye Hastalık Tayin ve Teşhis Belirteci Olarak Kullanımı

Kanser hücreleri, farklı biyolojik özellik gösteren heterojen hücre topluluğundan oluşmaktadır. Hücre yüzey işaretçilerine spesifik olarak bağlanabilen antibadiler

floresan bir molekülle etiketlenerek flow sitometre (flow cytometry) ile hücrelerin immunofenotipleri belirlenerek kanser tanı ve teşhisi konulabilmektedir. Bu yöntem de kullanılan floresan moleküllerin geniş bir absorpsiyon bandı göstermesi 300-700 nm gibi dar bir dalga boyunda uyarılması nedeniyle spektral bandların üst üste çakışması nedeniyle çoklu tanı yöntemlerinde kullanılamamaktadır. Maksimum 7 hücre tipi incelenebilmektedir. Bunlara alternatif olarak kuantum kristalleri (Qdot) olarak adlandırılan yapılar boyutuna bağlı olarak eşsiz floresan özellik göstermeleri nedeniyle çoklu tanı sistemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Bunlarında in vivo çalışmalarda toksik olmaları nedeniyle toksik olmayan kimyasal floroporlardan daha parlak ışık saçan, kısa sürede rengini kaybetmeyen, 10^{-16} M gibi çok küçük derişimlerde bile tayin yapabilen, 600-2000 nm aralığı gibi geniş bir aralıkta optik sinyal verebilen altın nanoçubuk esaslı moleküler problar geliştirilmiştir. Altın nanoçubuklarla yaklaşık 30 moleküler prob oluşturularak çoklu tanı sistemlerinde kullanılabileceği belirtilmiştir. Farklı hücre işaretçilerine affinite gösteren antibadi takılmış altın nanoçubuklarını kullanarak hücrelerin farklı immunofenotip profilleri basit ve eş zamanlı olarak teşhis edilebilmektedir (Pissuwan, 2008).

Kanser gibi hastalıkların teşhis ve tanısında optik görüntüleme teknolojileri çok tercih edilmektedir. Bu teknolojilerde hastalığın hücresel özelliklerini görüntülemek için etiket bir molekül ya da nanopartiküller kullanılmaktadır. Organik boyaların fotokimyasal yapılarının zamanla bozulması (photodecomposition), kuantum kristallerinin in vivo ve in vitro uygulamalarda özellikle insan sağlığı uygulamalarında çok toksik olması nedeniyle altın nanoçubukların biyouyumlu olması, fotokimyasal bozunma göstermemeleri, optik ve elektron mikroskobunda görünebilmeleri nedeniyle hastalık teşhis ve tanısı uygulamalarında kullanılmaya başlanmıştır.

Huang ve arkadaşları, altın nanoçubukları monoklonal anti-epidermal büyüme faktör reseptör antibadisi (anti-EGFR) ile fonksiyonlandırarak anti-EGFR-altın nanoçubuk konjugatları oluşturmuşlardır. EGFR kanserli epitel tümör hücrelerini "over-express" ettiği bilinmektedir. Hazırlanan bu konjugatları normal ve kanserli hücre hatları ile inkübe etmişlerdir. Kanser hücreleri yüzeyine bağlanan altın nanoçubuk-anti EGFR konjugatlarının saçtığı kırmızı ışık ile karanlık mod mikroskobu altında kanser hücreleri tayin edilmiştir (Huang, 2007). Ayrıca bu

konjugatları Raman spektroskopisinde kanser hücrelerini belirlemek içinde kullanmışlardır (Huang, 2006).

Altın nanoçubukları fotolüminisans ajanı olarakta kullanılmaktadır. Özellikle doku derinliklerinde yer alan kanser hücrelerini belirlemek için iki-foton luminans görüntüleme (two-photon luminescence) parlak kontrast ajanı olarak Durr ve arkadaşları kullanmışlardır (Durr, 2007).

Altın nanoçubuklar kullanılarak hücre ve derin dokuların görüntülenmesi için optoakustik ya da fotoakustik tomografi gibi yeni teknikler geliştirilmiştir. Li ve arkadaşları boy/çap oranı 3.7 ve 5.9 olan iki altın nanoçubuk karışımını optoakustik görüntüleme yöntemiyle kanser hücrelerini erken teşhis etmek için kullanmışlardır. Kısa altın nanoçubuğa anti-HER2, uzun olanına anti CXCR4 antibadisi konjuge ederek belli bir dalga boyundaki laser ışınları aynı örnek içinde iki farklı bölgedeki altın nanoçubuğun eksenal plasmon rezonansı ile görüntülenme sağlanmıştır (Li, 2007).

Kim ve arkadaşları, poliakrilik asit modifiye altın nanoçubuklarını hücreye spesifik antibadiler takarak bu konjugatların uyarılmış hücrelere bağlanması sonucu oluşan optoakustik görüntü yoğunluğu uyarılmamış hücrelere göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir. Altın nanoçubukların, iltihaplı tepkilerin erken aşamalarında in vitro teşhis edilmesinde mükemmel kontrast ajanı olarak kullanılabilineceği bildirilmiştir (Kim, 2007).

Biyosensör Uygulamaları

Altın nanoçubuklar, boyut ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleri, protein ve DNA gibi biyolojik moleküllerle yüzeyi kolayca modifiye edilebilmesi nedeniyle daha çok sensör uygulamalarında kullanılmaktadır.

Geçmiş yıllarda biyolojik tanı sistemleri, etiketleme ve sensör sistemlerinde floresan özellik gösteren boyalara olan ilgi büyüktü. Bu geleneksel metota alternatif nanopartikül barkot etiketler, rezonant Rayleigh saçılması, nanopartikül agregasyonu, lokal refraktif indeks değişimleri ve yük transfer etkileşimleri gibi nanopartikül esaslı biyosensör teknikleri geliştirilmiştir.

Metal nanopartiküllerin ışık absorpsiyonu ve saçılımı sonucu oluşturdukları çok güzel renkler araştırmacıların ilgisini bu yeni oluşumlara yönlendirmiştir. Metal nanopartiküller bileşimi, boyu, şekli, ortamın dielektriği ve gözlenen metal süspansiyonunun rengi gibi materyal özelliklerine bağlı olarak farklı optik özellikler göstermektedir. Pratik olarak nanoyapıların plasmonik özelliği ayarlanabilen nanopartikülleri oluşturmak için çok fazla yöntem bulunmaktadır. En sık kullanılan metot metal tuzlarının indirgenmesidir. Partikül boyutu, kullanılan reaktantların derişimi ve kullanılan indirgeme ajanlarının indirgeme gücü ile kontrol edilebilmektedir. Altın ve gümüş nanopartikülleri beyaz ışık altında uyarıldığında boyut, bileşim ve şekline bağlı olarak farklı renkte ışık saçmaktadır. Örneğin 80 nm boyutundaki gümüş nanopartikül süspansiyonu mavi, aynı boyutta altın nanopartikül süspansiyonu ise sarı, 60 nm boyutundaki altın nanopartikül süspansiyonu yeşil, 200 nm boyutundaki altın nanopartikül süspansiyonu kırmızı ışık saçmaktadır.

Altın nanoçubuklarla moleküler tanı sistemleri için geliştirilen biyosensörler literatürde oldukça fazla yer almaktadır. İnsan IgG 'sine affinite gösteren protein altın nanoçubuğa konjuge edilerek insan IgG'si immobilize edilmiş membran ile inkube edilmiştir. İnkubasyon sonrası membran üzerinde mavi-gri spot oluşturulmuştur (Alekseeva, 2005).

Li ve arkadaşları, altın nanoçubukların floresan özelliklerini inceleyerek büyük boy/çap oranına sahip altın nanoçubukların yüksek floresan yoğunluğu gösterdiğini bildirmişlerdir. Bu özelliklerinden yararlanarak DNA analizi için optik biyosensör uygulamaları ve floresan prob mikroarray teknikleri geliştirmişlerdir (Li, 2005).

Oyelere ve arkadaşları, altın nanoçubukları Raman esaslı hücreiçi biyosensör uygulamasında kullanmışlardır. Altın nanoçubuklarına simian virüs çekirdek sekans peptidini immobilize ederek altın nanoçubuk-peptit konjugatı oluşturmuşlardır. Bu konjugatları normal ve kanser hücreleri ile inkübe ederek Raman sinyalleri ölçülmüştür. Normal ve kanser hücrelerinden alınan Raman spektrumlarındaki farklılıklar incelenerek kanser teşhisi gerçekleştirilmiştir (Oyelere, 2007).

Altın nanoçubukların biyosensör uygulamaları bölüm 2.5'deki lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) biyosensörleri kısmında ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

2.5. Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Biyosensör, analite özgün olarak bağlanan bir biyolojik eleman ve bu bağlanma sonucu gerçekleşen cevabı, fiziksel ve gözlemlenebilir sinyale çeviren bir sinyal çeviriciden oluşur. Sinyal çeviricisine göre elektrokimyasal, termal ve optik olmak üzere birçok sensör bulunmaktadır. Bu metotların her birinin kendine göre güçlü ve zayıf olduğu yönleri bulunmaktadır. Optik çeviricilerin birçok uygulama için bazı avantajları vardır. Optik biyosensörlerin en önemli avantajları, duyarlı olmaları ve biyomoleküler etkileşimlerinin eş zamanlı gözlemlenebilmesidir. Optik sensör teknikleri kemilüminisans, floresen, ışık absorpsiyonu ve saçılması, reflektans, yüzey plasmon rezonans ve raman saçılımı gibi çevirici (transducer) mekanizmalarını kullanarak tayin yapmaktadır. Son 20 yıldır yüksek seçicilik ve duyarlılıkta hastalıkların tayini ve görüntülenmesi, ilaç araştırmaları, çevre kirliliği ve biyolojik ajanların teşhisi gibi birçok uygulama için optik nanobiyosensörler üzerine çalışmalar yapılmıştır. Araştırmacılar, optik biyosensörleri geliştirmek için metal nanopartiküllerin olağanüstü optik özelliklerine dayanan alternatif stratejiler araştırmaya başlamışlardır.

Lokalize yüzey plasmon rezonansına (LSPR) dayalı optik sensörler altın, gümüş gibi metalik nanopartiküllere dayalı sensördür. Nanopartikül esaslı bu sensörler kimyasal ve biyolojik hedef moleküllerin miktarını etkili bir şekilde ölçülebilmektedir. Bu sensörlerin temeli, metal nanopartikül yüzeyindeki biyolojik ya da kimyasal molekülün ortamda bulunan hedef molekülüne bağlanması sonucu ortamın dielektrik sabitinin değişimine bağlı olarak yüksek hassasiyette yüzey plasmon rezonans dalga boyundaki kaymanın ölçülmesine dayanmaktadır.

Lokalize yüzey plasmon rezonansı (LSPR) partikül boyuna, şekline, partiküller arası uzaklık, materyalin dielektrik özelliği ve nanopartikülün etrafındaki ortamın dielektrik özelliğine bağlıdır. Nanopartiküllerin maksimum absorbans yaptığı yüzey plasmon dalga boyu UV- görünür bölge spektroskopisi ile ölçülmektedir. Partiküllerin yüzey plasmon rezonansları buldukları çevreye bağlı olarak değişmektedir. Bu nanopartiküllerin yüzeyindeki molekül hedef molekülüne

bağlandıktan sonra ortamın dielektrik sabitinin değişmesiyle yüzey plasmon rezonansında değişime neden olmaktadır. Bu değişim ölçülerek tayin gerçekleştirilmektedir.

LSPR nanosensörleri, yüksek seçicilik ve duyarlılıkta, herhangi bir etiket gerektirmeyen, basit, ucuz, hızlı ve çoklu tayin yapılabilen diğer sensörlere göre birçok avantajları olan bir sensördür. Ayrıca basit, ucuz, küçük ve taşınabilir sistemlerdir (Zhao, 2006).

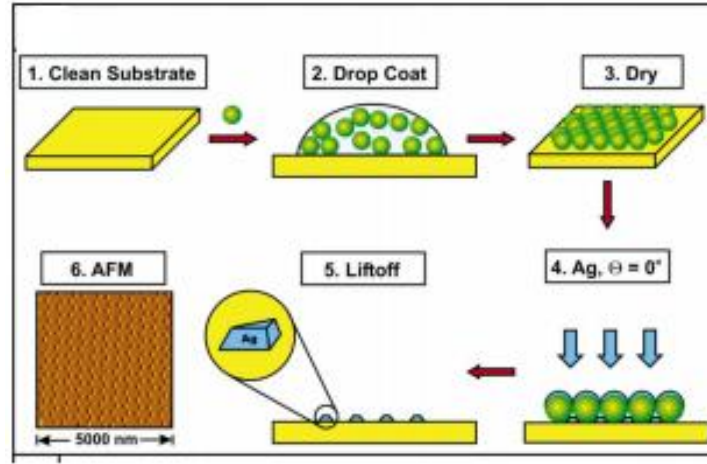
Lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) sensörleri, yüzey ve süspansiyon esaslı olmak üzere ikiye ayrılmaktadır.

2.5.1. Yüzey Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Yüzey esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans sensörlerinde ilk olarak nanopartiküller oluşturularak çeşitli yöntemlerle bir substrat yüzeyi üzerine yerleştirilmektedir. Substrat üzerine immobilize edilmiş nanopartiküller hedef molekülü tanıyan prob molekül ile kimyasal olarak modifiye edilmektedir. Son olarak bu şekilde hazırlanan sensör yüzeyi hedef molekülleri ile etkileştirildiğinde prob molekülün hedef moleküle bağlanması sonucu ortamın refraktif indeksinin değişmesiyle nanopartiküllerin yüzey plasmon rezonans dalga boylarında bir kayma gerçekleşmektedir. Bu dalga boyundaki kayma UV-görünür bölge spektroskopisi ile görüntülenmektedir.

Yüzey esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans sensörlerinde substrat yüzeyine nanopartiküllerin yerleştirilmesinde partikül boyu, şekli ve partiküller arası boşluğun iyi kontrol edildiği nanoküre litografisi (Nanosphere Litografy, NSL) yöntemi sık kullanılmaktadır. Nanolitografi yönteminde önce eş boyutlu belli çaptaki nanoküreler ile substrat yüzeyinde tek tabaka iki boyutlu kolloidal bir maske oluşturulur. Substrat yüzeyine nanokürelerin yüklenmesi için spin kaplama, damla kaplama (drop coating) ve termoelektrik soğutmalı açı kaplama (thermoelectrically-cooled angle coating) gibi yöntemler uygulanır. Mika, cam gibi negatif yüklü yüzey üzerine karboksilat ya da sulfat gibi negatif yüklü fonksiyonel grup modifiye edilmiş nanoküreler kullanılarak nanokürenin bulunduğu çözücü buharlaştırılıp nanoküreler kapiler kuvvetle bir araya gelerek substrat üzerinde bir arada hegzagonal güzel bir şekil oluştururlar. Bu nanoküre maskesinin üzerine

metal termal buharlaştırma, elektron demeti yükleme (electron-beam deposition) ya da laser sinyali yükleme (pulsed laser deposition) yöntemiyle yüklenir. Metal yüklemekten sonra nanoküre maskesi genellikle sonike edilerek substrat yüzeyinden ayrılır. Böylece şekil, boyut ve partiküller arası boşluk kontrol edilerek istenilen yapıda yüzeyi metal nanopartikül ile desenlendirilmiş yüzeyler oluşturulur. Çözelti esaslı sisteme göre bu yöntemle daha iyi optik özellikler kontrol edilebilmekte ayrıca tekrar aynı desende üretim yapılabilir (Şekil 2.14).



Şekil 2.14. Nanoküre litografisi yöntemi.

Nanoküre litografi yöntemiyle cam substrat üzerine genişliği 100 nm yüksekliği 51 nm olan Ag üçgen prizma nanopartiküller oluşturulmuştur. Ag nanopartiküllerin LSPR λ_{max} 561.4 nm ölçülmüştür. Ag nanopartikül yüzeyi kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturacak alkanetiyol-merkaptoundekanik asit ile fonksiyonlandırıldıktan sonra LSPR λ_{max} 598.6 nm ölçülerek 38 nm'lik bir kayma gerçekleşmiştir. Ag nanopartikül yüzeyindeki karboksil fonksiyonel gruplarından biyotin molekülü kovalent olarak bağlanmış ve LSPR λ_{max} 609.6 nm ölçülerek 11 nm'lik bir kayma oluşmuş daha sonra hedef molekül olan streptavidinle etkileşimi sonucu LSPR λ_{max} 636.6 nm ölçülerek 27 nm'lik bir kayma oluşmuştur. Bu şekilde dalga boyu kaymasına dayanan nanopartikül esaslı sensörler literatürde çok sayıda yer almaya başlamıştır (Haes, 2004).

Haes ve arkadaşları, nanoküre litografi yöntemiyle basit ve ucuz bir yöntemle boyut ve şekil kontrollü array sistemi oluşturmuşlardır. Cam substrat yüzeyi

üzerine eş boyutlu polistiren nanoküreleri çöktürüp, nanoküre maskesi üzerine ısı ya da ışık saçılması yöntemiyle metal yükleme yapıp daha sonra polistiren nanoküreler uzaklaştırılarak iki boyutlu eş büyüklükte üçgen prizma yapısında nanopartiküllerden oluşan cam substrat yüzeyinde array yapıları oluşturmuşlardır. Aynı yöntemle Ag üçgen prizma nanopartikülleri oluşturarak dinitrofenil molekülünü partikül yüzeyine kimyasal olarak bağlayıp anti difenil içeren çözelti ile etkileştirmişlerdir. Bağlanma sonucu oluşan dalga boyundaki kaymayı tayin ederek bağlanma katsayısını belirlemişlerdir (Haes, 2004).

Haes ve arkadaşları Alzheimer hastalığını gösteren amiloid türevli olan ADDL (Amyloid-derived diffusible ligand) molekülünü LSPR sensörü ile tayin etmişlerdir. Cam substrat üzerine yerleştirilmiş gümüş üçgen prizma nanopartikülü 11-merkaptoundekanoik asitle fonksiyonlandırılıp karbodimid reaksiyonu ile anti ADDL antibadisini kovalent olarak partikül yüzeyine bağlamıştır. Anti ADDL molekülü ile modifiye edilmiş Ag nanopartiküllerin yüzey plasmon rezonansını ölçüp ADDL antibadisini içeren çözelti ile 30 dakika inkübe ettikten sonra yüzey plasmon rezonansındaki değişimi ölçmüştür. Tekrar anti ADDL molekülü ile etkileştirerek sandaviç yapıyı oluşturmuştur. Bu şekilde hem insan beyni ekstraktı hemde sentetik ADDL molekülü ile çalışmaları gerçekleştirerek kısa sürede yüksek hassasiyetle Alzheimer hastalığının LSPR biyosensörü ile tayin edilebileceğini belirtmiştir (Haes, 2005).

LSPR sensörü ile birden fazla hedef molekül aynı anda ucuz, basit küçük bir çip üzerinde, kısa sürede daha az analit hacmi ile tayin edilebilmektedir. Yonzon ve arkadaşları, LSPR karbonhidrat sensörü geliştirmişlerdir. 35 nm ve 75 nm yüksekliğine sahip iki Ag üçgen prizma nanopartikülü tek bir cam substrat yüzeyinde oluşturduktan sonra 75 nm yüksekliğine sahip Ag partikülü 5 mM mannoz ile modifiye etmişlerdir. Konkovalin A ile inkübe ettikten sonra dalga boyunda 5nm'lik kayma oluşmuştur. 35 nm yüksekliğindeki Ag partikülleri 5 mM galaktoz ile modifiye edilip konkovalin A ile inkibasyonu sonunda dalga boyunda herhangi bir değişim gözlemlenmemiştir. Konkovalin A mannoza spesifik olduğu için sadece mannoz takılı partikülün dalga boyunda değişim olmuştur. Yonzon ve arkadaşları bu çalışmaya dayanarak LSPR sensörünün hassasiyetinin yüksek

olduğunu ve bir substrat üzerinde birden fazla hedef molekülün tayin edilebileceğini vurgulamışlardır (Yonzon, 2004).

Nath ve arkadaşları, 12-48 nm aralığında küresel altın nanopartikül sentezleyerek etiket gerektirmeyen çip formatında nanoSPR biyosensörü geliştirmişlerdir. Substrat olarak cam kullanıp bunları uygun yöntemler ile temizledikten sonra aminopropiltrioksolan (APTES) ile muamele ederek aminle fonksiyonlandırılmış sensör çipi üzerinde 39 nm boyundaki altın nanopartikül süspansiyonu 24 saat inkübe edilmiştir. Partikül yüzeyinde de karboksil grubu oluşturmak için merkaptopropiyonik asit (MPA) ile etkileştirilmiştir. Yüzeydeki karboksil gruplarına karbodiimid reaksiyonu ile amin uçlu biyotin takılarak streptavidin tayininde kullanılmak üzere lokalize yüzey plasmon değişimi ölçümüne dayanan metal nanopartiküllerin optik özelliğinden faydalanarak nanoSPR biyosensörü geliştirilmiştir (Nath, 2004).

Altın nanoçubukların lokalize yüzey plasmon özelliklerinden yararlanarak hastalık teşhisi ve ilaç araştırmaları gibi uygulamalar için geliştirilen çeşitli biyosensör sistemleri oluşturulmuştur. Chen ve arkadaşları elektrokimyasal yöntemle altın nanoçubukları sentezlemişlerdir. Cam slayt yüzeyini merkaptopropiltrimetoksisilan (MPTMS) ile muamele edip tiyol uçlu substrat hazırlamışlardır. Bu cam slayt yüzeyine altın nanoçubukları immobilize edip nanoçubuk yüzeyinde sistamin tek tabakası oluşturmuşlardır. Karbodiimid reaksiyonu ile biyotin bağlayarak biyotin-streptavidin etkileşimini ortamın refraktif indeksinin değişimine bağlı olarak SPR spektrumundaki pik kaymasını UV-görünür spektrofotometresi ile incelemişlerdir. Bu şekilde herhangi bir örnek hazırlmaksızın kan içindeki çok düşük derişimdeki analitlerin birkaç dakika gibi kısa bir sürede tayin edilebileceği biyosensörlerin oluşturulabileceği bildirilmiştir (Chen, 2007).

Huang ve arkadaşları, etiket gerektirmeyen altın nanoçubukların lokalize yüzey plazmon rezonansına dayalı optik biyosensör geliştirmişlerdir. Çekirdek geliştirme yöntemiyle sentezledikleri altın nanoçubukları tiyol uçlu cam slayt üzerine immobilize ederek yüzeyine keçi IgG antibadisi takarak lokalize yüzey plasmon rezonansındaki pik kayması ile antijen-antibadi etkileşimini tayin etmişlerdir. Proteomiks ve in vitro tanı ve teşhis uygulamalarında LSPR sensörlerin kullanılabilceği belirtilmiştir (Huang, 2009).

Haes ve arkadaşları ayrıca nanoküre litografi yöntemiyle hazırladığı Ag üçgen prizma partiküllerini çözelti faza alarak çözelti faz Ag üçgen prizma nanopartikülleri hazırlamışlardır. Nanoküre litografi yöntemiyle cam yüzey üzerinde oluşturulan nanopartiküller alkantiyol etanol çözeltisi ile 48-96 saat inkübe edilmiştir. Alkantiyol molekülleri nanopartikül yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tek tabaka oluşturmuştur. Daha sonra nanopartiküller etanol çözeltisinde 3 dakika sonike edilerek substrat yüzeyinden koparılıp çözelti faza alınmıştır. Çözeltiye alkantiyol ilave edilerek nanopartiküllerden dimer yapıları oluşturulmuştur. Her aşamada yüzey plasmon rezonans spektrumları incelenerek çözelti içinde dimer yapısı oluşturan nanopartiküllerin LSPR spektrumlarında önemli bir değişim gözlenmiştir. Haes ve arkadaşları, çözelti fazdaki bu dimer yapılar ile sandaviç yapıda biyolojik hedeflerin tayin edilebileceğini ve canlı sistemlerde nanobiyosensörlerin geliştirilebileceğini belirtmişlerdir (Haes, 2004).

2.5.2. Süspansiyon Esaslı Lokalize Yüzey Plasmon Rezonans (LSPR) Biyosensörleri

Süspansiyon esaslı array sistemi basit fakat henüz güçlü bir yöntem değildir. Biyosensör çalışmasında en çok çalışılan moleküller sulu fazda biyolojik moleküllerdir. Analit molekül ile hedef molekülün birbirine bağlanmasını hassas ve spesifik bir şekilde belirleyecek sistemler gerekmektedir.

Aggregasyon esaslı tayin yöntemleri klinik çalışmalarda çok kullanılmaktadır. Lateks çökeltme testi (LAT) olarak bilinen test ilk olarak 1956 yılında geliştirilmiştir (Singer, 1956). Lateks çökeltme testi ve buna benzer testlerde lateks mikroküreler biyomoleküller spesifik antitadiler ile fonksiyonlandırılıp mikroküre problemler hazırlanır. Kan ya da üre gibi hedef antijeni içeren çözelti ile bu mikroküre problemleri etkileştirilerek antitadi-antijen etkileşimi sonucu lateks kürelerinde gözle görünen çökeltme izlenerek tayin gerçekleştirilir. Lateks çökeltme testi etkili ve 15 dakika ile 1 saat gibi kısa sürede tayin gerçekleştirilebilen hızlı bir yöntemdir. Dedektör olarak insan gözlemi ve yüksek derişimde analit gerektirmesi nedeniyle çok hassas bir yöntem değildir.

Süspansiyon esaslı LSPR sensörlerinin yüzey esaslı LSPR sensörlerinden farkı herhangi bir substrat kullanmadan süspansiyon içinde tayinin gerçekleştirilmesidir.

Süspansiyon esaslı lokalize yüzey plasmon rezonans (LSPR) sensörleri ile tanı, partiküller arası etkileşim sonucu ortamın refraktif indeksinin değişimine bağlı olarak lokal yüzey plazmon rezonansındaki değişimle gerçekleştirilmektedir. Lokal yüzey plasmon rezonansındaki değişim de UV-görünür bölge ve rezonant Rayleigh saçılım spektroskopisi ile incelenmektedir.

Son zamanlarda, altın nanopartikül esaslı UV-görünür bölge tekniği ile DNA tayin edilmektedir. Altın yüzeyine takılan oligonükleotit dizisinin eşlenik DNA dizisi ile hibridizasyonu sonucu absorpsiyon spektrumunda dolayısıyla çözelti renginde renk değişimi oluşmaktadır. Kalorimetrik tayin yöntemi olarak bilinen bu yöntemle hedef oligonükleotit femtomol gibi düşük derişimlere kadar tayin edilebileceği bildirilmiştir. Nanopartiküllerin aggregasyonuna dayanan tayin yöntemlerinin geleneksel floresan esaslı yöntemlere göre 100 kat daha hassas olduğu da belirtilmiştir (Taton, 2000).

Resonant Rayleigh ışık saçılmasına dayalı tayin kalorimetrik tekniğe göre daha kuvvetli olmasına karşın henüz çok fazla bu konu ile ilgili yayın bulunmamaktadır. 60 nm boyutundaki altın nanopartiküllerinden bir kısmına insan anti-IgG ile bir kısımda insan IgG 'si takılarak antijen ve antibadi yüklü bu iki altın nanopartikülü bir test tüpü içinde karıştırılıp dijital kamera ile görüntülenmiştir. Altın yüzeyindeki proteinler eşlenik proteini ile etkileşimi sonucu partiküller bir araya gelmiş ve lokalize yüzey plasmon rezonansında "red-shift" olarak adlandırılan kırmızıya kaymaya neden olmaktadır. Başta yeşil renk olan çözelti rengi antijen-antibadi etkileşimi sonucu bir araya gelen altın nanopartiküller nedeniyle 15 dakika içinde turuncuya dönmüştür. Bu renk değişimi ile antijen-antibadi etkileşimi tayin edilmiştir. Bu tarz tayin yöntemlerinin dezavantajları, nanopartikül agglomerasyonunun analit-hedef molekül arası etkileşim sonucu olup olmadığının net olarak bilinmemesi, tersinir olması ve nicelleştirmenin zor olmasıdır. Bu dezavantajları nedeniyle daha çok bir substrat yüzeyine nanopartiküllerin yerleştirilmesiyle yüzeyde gerçekleşen bağlanma sonucu oluşan lokalize plasmon rezonansındaki kaymaya dayanan biyosensörler geliştirilmiştir (Roll, 2003).

Wang ve arkadaşları, iki farklı boy/çap oranına sahip amin fonksiyonel uç grup taşıyan altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. Nanoçubuklardan birine anti-Ecoli diğerine anti-S. Typhimurium immobilize ederek E-coli ve S. Typhimurium

patojenlerini tayin etmek için nanoçubuk problemleri hazırlamışlardır. Bu iki tip nanoçubuk karışımını E-coli ve S. Typhimurium bakteri karışımı ile karıştırarak UV-görünür bölge spektroskopisi ile plasmon rezonans dalga boyundaki kayma incelenmiştir. Yapılan ölçüm sonucunda her iki tip nanoçubuk problemin ilgili spesifik antibadiye bağlanması sonucu aksel plasmon dalga boyunda kayma olduğunu gözlemlemişlerdir. Bu yöntem ile basit, hızlı, ucuz, 30 dakika gibi kısa bir sürede, ekstra kompleks bir cihaza gerek kalmadan birden fazla patojenin eş zamanlı tayin edilebileceğini belirtmişlerdir (Wang, 2008).

Yu ve arkadaşları, çekirdek geliştirme yöntemiyle farklı boy/çap oranına sahip üç altın nanoçubuk sentezlemişlerdir. Her bir nanoçubuğa üç farklı antibadi (monoklonal insan IgG, monoklonal sıçan IgG, monoklonal koyun IgG) immobilize ederek üç farklı nanoçubuk problemleri hazırlamışlardır. Her üç farklı probu üç farklı hedefin bulunduğu antibadi karışımı ile inkübe ederek her bir nanoçubuk problemin ilgili hedef molekülüne bağlanması sonucu aksel plasmon piklerindeki dalga boyu kaymalarını incelemişlerdir. Yaptıkları çalışmalar sonucunda, altın nanoçubukların boyuna bağlı olarak gösterdikleri farklı optik özelliklerinden faydalanarak basit, hassas ve bir deney tüpü içinde birden fazla biyolojik hedefin tayin edilebileceği bir test tüpü içinde laboratuvar (lab-in-a-tube) tabir edilen biyosensör geliştirdiklerini belirtmişlerdir (Yu, 2006).

Pan ve arkadaşları, çekirdek geliştirme yöntemiyle boy/çap oranı 3 ve 8 olan altın nanoçubuklar oluşturmuşlardır. Yüzeyine sığır serum albumin (BSA) immobilize ederek triptofan ile altın nanoçubuk-albumin etkileşimi sonucu floresan özelliği incelenmiştir. Altın nanoçubuk derişimi arttıkça floresan yoğunluğunun arttığını gözlemlemişlerdir. BSA'nin altın nanoçubuğa bağlanma sabiti ve bağlanma kapasitesini triptofana floresan özelliğini artırarak incelemişlerdir (Pan, 2007).

2.6. Yüzey Plasmon Rezonans (SPR) Biyosensörü

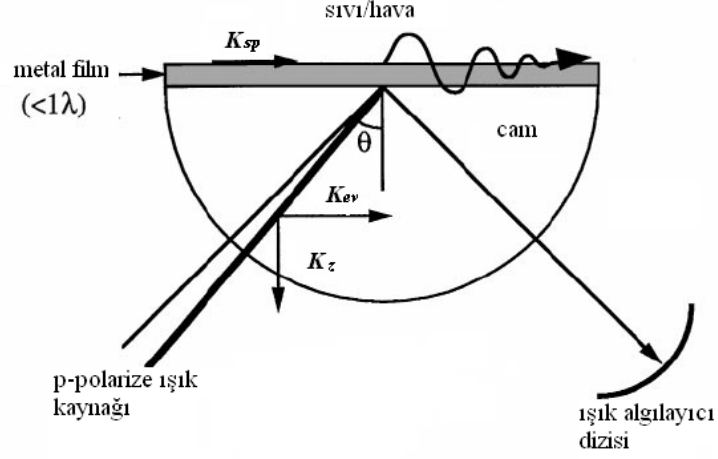
SPR, sensör yüzeyinde antijen-antibadi ya da nükleik asit eşleşmeleri gibi çeşitli nedenlerden oluşan ve SPR yüzeyinde biriken biyolojik filmler nedeniyle kırılma indisindeki ("refractive index", RI) küçük değişiklikleri belirleyebilen ve çok sıkça kullanılan bir analitik ölçüm cihazıdır. SPR etiketsiz çalışan bir yöntem olduğu için tayin edilecek biyomolekülün herhangi bir etikete ihtiyacı olmamaktadır. 30 yılı

aşkın bir süredir kullanıldığından, SPR ile ilgili pek çok farklı çalışma ve geliştirme yapılmıştır. Tüm çalışmalar sonucunda günümüzde SPR, kimyasal ve biyolojik etkileşimlerin incelenmesinde kullanılan etiketsiz bir karakterizasyon ve tayin metodu olarak kabul edilmekte ve kullanılmaktadır (Duman, 2007).

SPR Teorisi

Yüzey plazmonu, biri metal (iletken) ve diğeri de dielektrik (yalıtkan) olan iki ortamın ara yüzeyi boyunca yayılan ve düzlem boyunca ilerleyen yük yoğunluğudur. Metal serbest elektron modeline uygun olarak serbest elektron davranışı göstereceğinden kullanılan metalin türü çok önemlidir. Yüzey plazmonu yaratmak için uygun metaller arasında gümüş, altın, bakır, alüminyum, platin gibi metaller mevcuttur ve altın ile gümüş literatürde sıkça rastlanılan metallerdir. Gümüş, keskin bir SPR eğrisi verdiği için, altın ise daha kararlı olduğu için tercih edilir. Yüzey plazmonunun uyarılması için Otto (1968) ve Kretschmann (1971) tarafından iki farklı optik düzen geliştirilmiştir. Ancak, Kretschmann tarafından geliştirilen, azaltılmış tam yansıma (“attenuated total reflection”, ATR) düzeni, çoğu SPR cihazının tasarımında kullanılan bir yapıdır.

SPR cihazının temeli olan Kretschmann düzeninde, (Şekil 2.15.) optik olarak daha yoğun olan bir ortamdan (örneğin cam) gelen ışığın, optik olarak daha az yoğun bir ortam (örneğin hava veya ince altın film) ile daha yoğun ortam ara yüzeyinden geçemeyerek yoğun ortama geri yansımaları ile ortaya çıkan “içten tam yansıma” prensibi kullanılır. Gelen ışık tamamen yansımalarına karşın, bu ışığın manyetik bileşeni, yaklaşık bir dalga boyu mesafe ile daha az yoğun olan ortam içerisine nüfuz eder.



Şekil 2.15. Yüzey plazmon rezonansı oluşturmak için Kretschmann düzeneği.

SPR, bu iç yüzeye geçiş yapan manyetik alanın, SPR yüzeyinde kullanılan metaldeki serbest elektronları uyarması sonucu ışık şiddetindeki değişimi ölçen bir cihazdır. Tam yansıma sonucu elde edilen sönümlü dalganın dalga vektörü Eşitlik 2.1.' deki gibi verilir.

$$K_{ev} = \frac{\omega_o}{c} \eta_g \sin \theta \quad (2.1.)$$

Burada, K_{ev} ; sönümlü dalganın dalga vektörü, ω_o ; gelen ışığın frekansı, c ; ışığın boşluktaki hızı, η_g ; optik olarak yoğun ortamın (örneğin cam) kırma indisi, θ ; ışığın geliş açısıdır.

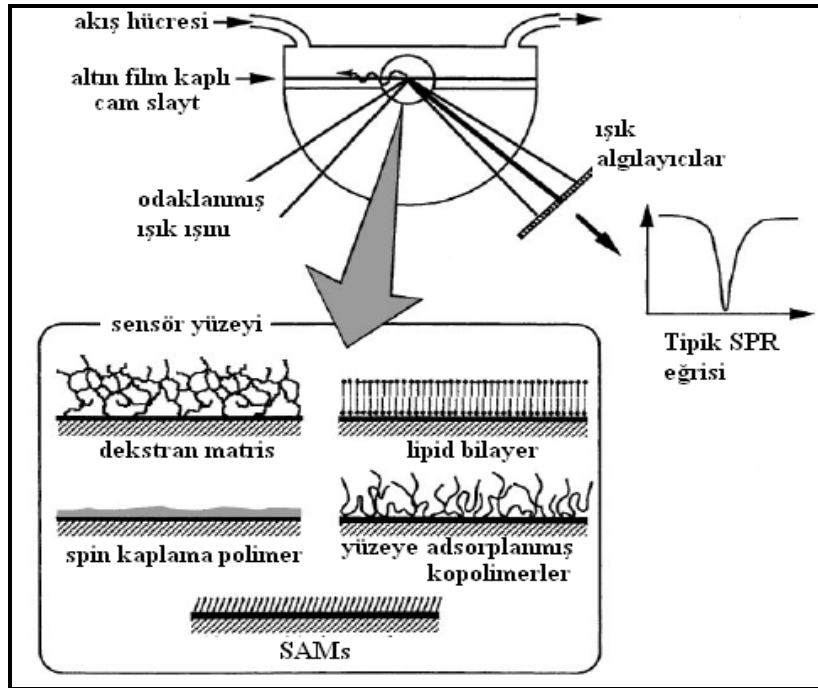
Yüzey plazmonunun dalga vektörü ise eşitlik 2.2.' deki gibi ifade edilir:

$$K_{sp} = \frac{\omega_o}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_m \eta_s^2}{\epsilon_m + \eta_s^2}} \quad (2.2.)$$

Burada, K_{sp} ; yüzey plazmon dalgasının dalga vektörü, ω_o ; gelen ışığın frekansı, c ; ışığın boşluktaki hızı, η_s ; dielektrik ortamın (örneğin çözelti) kırma indisi, ϵ_m ; metal filmin dielektrik sabitidir.

Gelen ışık ile metal filmde-serbest salınım yapan elektronlar (plazmonlar) belirli bir geliş açısında $K_{ev} = K_{sp}$ olacak şekilde rezonansa girer ve bu rezonans yüzey plazmon rezonansı olarak adlandırılır. Eşitlik 2.2.'den görüleceği gibi K_{sp} , metal filmin üst tarafındaki dielektrik ortamın kırma indisine bağlıdır. Bu nedenle, metal yüzeyi ile temasta olan biyolojik ortamın kırma indisinin herhangi bir etkileşim ile değişmesi sonucu, yüzey plazmon rezonansında bir değişiklik gözlenir.

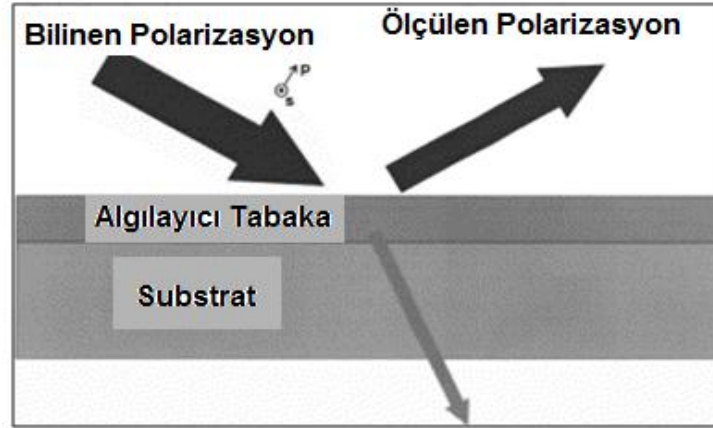
Tipik bir SPR cihaz konfigürasyonu ve yüzey modifikasyonların çeşitli örnekleri Şekil 2.16.'da verilmiştir.



Şekil 2.16. Tipik SPR konfigürasyonu ve sensör modifikasyonu tiplerine örnekler.

2.7. Elipsometrik Sensörler

Elipsometre, polarize monokromatik ışık düzlem dalgasının belirli bir açıda bir yüzeyden yansıması ile elde edilen polarizasyon değişiminin ölçülmesine dayanır.



Şekil 2.17. Elipsometre temelli algılamanın şematik gösterimi.

Elipsometre dolaylı ölçüm tekniğidir ve yüzey hakkında gerekli bilgi ölçülen parametrelerin optik bir modelde çözümlenmesi ile elde edilir. Temel büyüklüklerden birisi, ince bir tabakanın veya bir substratın kompleks dielektrik fonksiyonudur. Bazı durumlarda kompleks kırınım indisi değerinin kullanılması daha uygun olabilir.

Spektroskopik ölçümlerde bu parametreler foton enerjisinin bir fonksiyonudur. Elipsometre ile hesaplanan bir diğer temel özellik ise tabakanın kalınlığıdır (d). Çok katmanlı örneklerde birkaç tabakanın kalınlığı bilinemeyebilir.

Biyolojik tabakalar genellikle kırınım indisi düşük ve tipik olarak kalınlıkları nanometre mertebesinde olan tabakalardır ve biyolojik tabakalar elipsometre ile incelenmeye uygundur. Yansıma katsayıları, substrat ve üst tabakaların optik özellikleri ile bileşimine, kalınlık ve morfolojisine ve yüzey pürüzlülüğüne bağlı olduğundan, elipsometre tekniği ile yapılan ölçümler özellikle biyolojik moleküllere

zarar vermez. Elipsometrik sensörler herhangi bir işaretleme tekniği gerektirmeden biyolojik etkileşimleri inceleyebilmektedir. Literatürde, elipsometre temeline dayanan optik biyosensörler ile çalışmalar bulunmaktadır. Bu tip elipsometrik sensörler ile antikor-antijen bağlanmasının ve enzimatik reaksiyonlar izlenebilmektedir. Bu tür biyosensörlerde analitik olarak bazı sorunlar bulunmakla beraber sensörlerin çalışma temeli biyo-özgünlüğe dayanmaktadır. Ancak farklı moleküllerin tayini ve ayrımı, çoklu sensör verisinin alınması ile sistemin özgünlüğü artırılabilir. Biyoçip olarak adlandırılan, belirli bölgelerde biyo-özgün alanlar içeren test yüzeyleri bu amaç için kullanılabilir. Antijen-antikor bağlama çalışmalarında, bir seri antijen ya da antikor daha önceden belirlenmiş bölgelere immobilize edilir. Bu bölgelerin sayısı, aynı floresans-temelli biyosensörlerde olduğu gibi binlerce olabilir. Tamamen geliştirilmiş bir sistemde, en küçük spotun boyutu ve yeri bir görüntüleme sistemi yardımıyla belirlenebilir. Antikor ve antijen arasındaki etkileşim, etkileşim öncesi ve sonrası elipsometre ile ilgili alanın kalınlığının ölçülmesi ile belirlenmiştir. Grubumuz tarafından yapılan bir başka çalışmada ise, elipsometre bir DNA sensörü olarak kullanılmıştır (Demirel, 2008). DNA hibridizasyonunun, incelenen bölgenin kalınlığını değiştirmediği bilinen bir gerçektir. Hibridizasyon sonrası, bağlanma bölgesinin yoğunluğu ve dielektrik sabiti değişmekte, bu değişimde elipsometrik olarak etkileşimin incelenmesine olanak tanımaktadır.

2.8. Array ve Array Platformlarının Oluşturulması

Günümüzde nanoteknoloji ile ilgili çalışmalarda öncelikli konular arasında yer alan array teknolojileri sürekli gelişmektedir. Tıp, araştırma, gıda, çevre, tarım ve hayvancılık gibi birçok alanda uygulama alanı bulunan array teknolojilerinde en önemli ve kritik kısım “tanı”nın yapılmasıdır. Örneğin gıda ürünlerinin ve çevredeki kirliliğin (örneğin mikrobiyal kökenli) tanısı zorunlu/kaçınılmazdır; tıp alanında da birçok hastalığın önce tanısı yapılır daha sonra tedavi uygulanır. Bugüne kadar birçok alanda kullanılan klasik laboratuvar yöntemleriyle yapılan tanılar zor ve uzun sürelidir. Bu yöntemler kullanılarak “*bir tanı bir test*” ile (test kiti ile) yapılır. Günümüz teknolojisinde ise tanı moleküler düzeyde yapılmaktadır. Moleküler düzeyde tanı klasik laboratuvar yöntemleriyle karşılaştırıldığında çok daha zor ve

pahalıdır. Array teknolojileri “çok sayıda örneğin aynı anda”, çok hızlı değerlendirildiği ve dolayısıyla çoklu tanıya olanak sağlayan, çok hızla gelişen ve yaygın uygulama alanına sahip moleküler düzeyde tanı yapan önemli bir teknoloji dalıdır. Yüzey esaslı ve süspansiyon esaslı array platformları olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Genel olarak bir tanı sisteminde hedef molekölü seçici olarak tanıyan bir moleköl (“prob”) kullanılır ve bu bir taşıyıcı yüzeye (platforma) yerleştirilir (immobilize edilir). Tanıyıcı moleköl ile hedef etkileştirilir, bu etkileşim sonucu ortaya çıkan sinyal bir çevirici ile ölçülebilir sinyale dönüştürülür ve bir cihaz ile bu sinyal ölçülerek tanı gerçekleştirilir. Array teknolojisinde çok sayıda tanıyıcı moleköl array platformlarına yerleştirilerek aynı anda çok sayıda hedef moleköl saptanabilmektedir. Biyolojik sistemlerde tanı için genellikle biyolojik moleküller (tek sarmal oligonükleotidler, oligopeptidler, proteinler) prob olarak kullanılır. Bunların seçiminde, yüksek saflıkta üretilmiş olmaları ve array platformlarına istenilen şekilde yerleştirilmiş olmaları kritik öneme sahiptir. Array teknolojilerinde tanının yapılması için kullanılan array platformları katı (silikon waferlar, cam slaytlar, bunların metal (özellikle altın) ya da polimer kaplı formları, polimerik membranlar/filmler) yüzeylerdir. Bu array platformları kullanım alanına ve tanısı yapılacak moleküle göre istenilen desende ve istenilen moleküle modifiye edilmektedir. Array platformu üzerine tanıyıcı molekölün yerleştirilmesinden sonra tanıyıcı moleköl ile hedef molekölün etkileşmesi, hedef molekölün genellikle optikçe aktif floresan boya ile etiketlenmesi ve bu etkileşimin çeşitli optik cihazlar kullanılarak ölçümü ile gerçekleştirilir. Tanı sistemlerinde etiket kullanımı pahalı ve zor bir yöntemdir. Bu nedenlerden dolayı son zamanlarda etiket kullanmadan ölçüm yapılabilecek, örneğin kütle değişim esaslı (QCM) ve yine optik (SPR, elipsometre, vb.) cihazların array teknolojilerine uygulanması üzerine yoğun çalışmalar yapılmaktadır (Glökler, 2003).

Süspansiyon-Esaslı Array Platformları

Array platformları “yüzey esaslı” ve “süspansiyon esaslı” olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Silikon, cam gibi yüzeylere prob moleküllerin immobilize edilip hazırlanan array platformları yüzey esaslı olarak tanımlanırken taşıyıcı platform olarak nanopartiküllerin kullanıldığı ve süspansiyon fazda gerçekleştirilen array sistemleri süspansiyon esaslı array platformları olarak adlandırılmaktadır.

Özellikle son yıllarda “yüzey esaslı” array platformlarının yanı sıra “süspansiyon esaslı” platformlar geliştirilmiş ve ticari ürünler piyasaya sunulmuştur. (örneğin BD Biosciences (ABD), Illumina (ABD), Evident (ABD)). Bu sistemlerde farklı renklerde polimerik mikro veya nanopartiküller hatta, “quantum dot”lar kullanılır. Farklı renkte partikül yüzeyine farklı bir tür prob immobilize edilir. Bu partiküller bir araya getirilerek “süspansiyon array platformu” oluşturulur. Süspansiyon ortamı hedef molekülleri içeren ortam ile karıştırılır ve etkileşim bir optik (lazerli) okuyuculu ile akış-sisteminde belirlenir. Özellikle nanopartiküller kullanıldığında (çok yüksek yüzey alanı nedeniyle) küçük hacimde yüksek prob derişimine ulaşmak dolayısıyla sistemin hassasiyetini önemli ölçüde artırarak çok sayıda tanıyı bu süspansiyon ortamında gerçekleştirme olanağı vardır.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Sunulan çalışma kapsamında yapılan deneysel çalışmaları farklı şekil, boyut ve yapıda altın nanopartiküllerin sentez, karakterizasyonu ve bu nanopartiküllerin nanotıp uygulamaları olmak üzere iki ana grup altında toplamak mümkündür. Tez kapsamının ilk bölümünde üç farklı nanopartikül üretilmesi amaçlanmıştır. Nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) takılabilen küresel ve çubuk formunda altın nanopartikül ve nanoçubuklar, çekirdek/kabuk formunda altın kaplı manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4/Au) olmak üzere üç farklı nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Partikül boyuna ve şekline etki eden parametreler incelenerek optik özelliklerine olan etkileri araştırılmıştır. Farklı boyutta küresel altın nanopartikülleri, tetrakloraurat altın tuzunun ($HAuCl_4$) indirgeme ajanı (sodyum sitrat) ile indirgenmesi yöntemiyle sentezlenmiştir. Çubuk formundaki altın nanopartikülleri ise küresel formdaki altın nanopartikül çekirdeklerinin geliştirilmesi yöntemi ile hazırlanmıştır. Küresel ve çubuk şeklindeki altın nanopartiküllerin partikül boyuna dolayısıyla optik özelliklerine etki eden parametreler incelenmiştir. Çekirdek/kabuk şeklindeki nanopartiküllerde süperparamanyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin altın ile kaplanmasıyla elde edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküllerin Zeta-Sizer, AFM ve TEM yöntemleriyle partikül boy ve boy dağılımları, Zeta Potential ile partikül yüzey yükleri, UV-Vis-Infrared ve Floresan Spektrofotometresi ile optik özellikleri incelenmiştir. FTIR ve XRD yöntemleriyle kimyasal yapıları, VSM yöntemiyle manyetik özellikleri incelenmiştir.

Tez kapsamının ikinci bölümünde, ilk kısımda yapılan çalışmalar sonucunda sentezlenmiş ve karakterize edilmiş farklı boyut ve şekildeki altın nanopartiküllerin mikroemülsiyon fazda tanı kitleri ya da nanoarray sistemlerinde ve cam gibi taşıyıcı yüzeylere adsorbe edilerek SPR destekli elipsometrik biyosensörlerinde kullanılabilirlikleri olmak üzere iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu iki çalışmada birinci bölümde sentezlenmiş ve karakterize edilmiş küresel şekilde altın nanopartikül, iki farklı uzunluk ve çapta altın nanoçubuk ve manyetit içeren altın kaplı nanopartiküllerden en uygun olanı seçilerek dört farklı örnek üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti ya da nanoarray çalışmalarında seçilen dört tip altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyollu oligonükleotitler immobilize edilerek nanopropalar hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) ve *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır. Öncelikle sentezlenen farklı şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin optik özellikleri incelenip yüzeylerine farklı derişimlerde prob oligonükleotitler immobilize edilerek optik özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Daha sonra prob takılı bu altın nanopartiküller farklı derişimdeki hedef (komplementer) oligonükleotitleri ile etkileştirilerek, optik özelliğindeki değişimler izlenerek hibridizasyonun olup olmadığı izlenmiştir. Ayrıca sistemin hassasiyetini araştırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin eşleniğı olmayan bir oligonükleotit ile etkileştirilerek hem dalga boylarındaki kayma hem de fluoressan sinyal şiddetindeki değişimler incelenmiştir. En son aşamada yüzeyinde farklı problemler takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar ("nanoarrayler") hazırlanmıştır. Bu mikroemülsiyon karışımlarına sadece birinin hedefini içeren oligonükleotit çözeltisi eklenerek hedef oligonükleotitin ilgili probunu içeren nanopartikülün plasmon dalga boyundaki kaymalar incelenmiştir. Bu şekilde altın nanopartiküllerin (farklı şekil ve boyutta) optik özelliklerinden faydalanarak mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmuştur.

SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında öncelikle taşıyıcı destek materyali olarak kullanılacak cam slaytlar öngürülmüş uygun yöntemle temizlenmiştir. Temizlenmiş cam slaytlar 6-Merkaptopropilmetoksisilan (MPTS) çözeltisiyle silanize edilip tiyol uç grubundan dört tip altın nanopartikülün kimyasal olarak immobilizasyonu sağlanmıştır. Farklı derişimlerde dört tip altın nanopartikül cam yüzeyine immobilize edilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum nanopartikül derişimi belirlenmiştir. Daha sonra optimum derişimde cam yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiş altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlar, SPR sisteminde taşıyıcı matriks olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlara dört farklı derişimde *M. Gordonae* patojenik bakterisine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum

prob derişimi belirlenmiştir. Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış cam slaytlara daha sonra dört farklı derişimde problemlerin hedefi olan oligonükleotitler göndererek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle hibridizasyon sonucundaki kalınlık değişimi incelenmiştir. Ayrıca optimum hedef oligonükleotit derişiminde hedef olmayan oligonükleotit çözeltisi gönderilerek sistemin seçiciliği incelenmiştir. Yapılan tüm deneysel çalışmalar farklı bölümler altında ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

3.1. Nanopartiküllerin Sentezi

3.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Tez kapsamında küresel altın nanopartikül sentezi çalışmalarını sırasında kullanılan cam malzemeleri Sigma-Aldrich firmasından temin edilen sülfürik asit (H_2SO_4 , %90 v/v) ve nitrik asit (HNO_3 , %90 v/v) çözeltilerinin 3:1 oranından karıştırılarak hazırlanan kral suyu çözeltisi ile temizlenmiştir. Altın nanopartikül sentezinde hidrojen tetrakloraurat(III) trihidrat altın tuzu ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, %99.9), tri sodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7$, %99.9) ve sodyum borhidrit ($NaBH_4$, %99.9) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

Altın nanoçubukların sentezinde hidrojen tetrakloraurat(III) trihidrat altın tuzu ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, %99.9), setil trimetilamonyum bromür (CTAB, %99.9), L-askorbik asit (%99.9) ve sodyum borhidrit ($NaBH_4$) herhangi bir saflaştırma işlemine tabi tutulmadan Aldrich (ABD) firmasından temin edildiği gibi kullanılmıştır. Gümüş nitrat ($AgNO_3$, %99.9) Fluka (ABD) firmasından satın alınmıştır.

Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin sentezinde daha önce yüksek lisans tez çalışmamda (Sayar, 2004) üretmiş olduğum suda süspansiyon edilmiş yaklaşık 40 ve 90 nm boyutundaki manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri kullanılmıştır. Bu partiküllerin etrafının altın kaplanması sırasında hidrojen tetrakloraurat(III) trihidrat altın tuzu ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, %99.9) ve tri sodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7$, %99.9) Sigma-Aldrich (ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin altın kaplı olmayan manyetit nanopartiküllerinden ayırmak için okzalik asit ve amonyum okzalattan oluşan okzalat çözeltisi kullanılmıştır. Okzalat çözeltisinde kullanılan

okzalik asit ($C_2H_2O_4$, %99.9) ve amonyum okzalat monohidrat ($(NH_4)_2C_2O_4 \cdot H_2O$, %99) Sigma-Aldirich (ABD) firmasından temin edilerek kullanılmıştır.

Ayrıca tüm çalışmalar boyunca çözeltiler hazırlanırken ve yıkama işlemleri yapılırken yüksek saflıkta (özgül direnci $> 18 M\Omega$) deiyonize H_2O (DI H_2O) kullanılmıştır.

3.1.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Altın nanopartiküller için bir nm den bir kaç mikrometreye kadar çok sayıda hazırlama yöntemi literatürde yer almaktadır. 10 nm'den 150 nm'ye kadar altın nanopartikül elde etmek için saptanan en yaygın uygulanan prosedür altın(III) tuz çeşitlerinin sitrat ile indirgenmesi klasik Turkevich-Frens yöntemidir. Tez kapsamında küresel altın nanopartiküllerin üretimi için izlenen metot Turkevich-Frens yöntemi olup şöyledir: İlk olarak sentez sırasında kullanılacak cam malzemeler kral suyu çözeltilisinden geçirilerek saf su ile yıkanmıştır. 75 mg tetrakloraurat ($HAuCl_4 \cdot 3H_2O$) denilen altın tuzu 250 ml deionize su içinde çözünerek (0.88 mM) çözelti geri soğutucu altında yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. İndirgenme ajanı olarak kullanılan trisodyum sitrattan ağırlıkça %1 oranında sitrat içeren 26.25 ml'lik indirgeme çözeltisi hazırlanarak kaynama noktasına gelmiş altın tuzu çözeltisine hızlıca ilave edilmiştir. Çözeltinin ilave edilmesiyle ilk 15 dakika içinde renk sırasıyla sarıdan mora, griye ve kırmızıya dönüşmüştür. Aynı sıcaklıkta 15 dakika daha karıştırılarak küresel altın nanopartikülleri sentezlenmiştir. Oda sıcaklığına soğutulmuş nanopartiküllerden büyük agregatları uzaklaştırmak ve sterilize etmek için 0.22 μm 'lık filtreden geçirilmiştir. Sentezlenen altın nanopartikülleri 10000 rpm'de santrifüjlenerek su ile üç defa yıkanarak $+4^\circ C$ 'de buzdolabında karanlıkta saklanmıştır.

Farklı boylarda altın nanopartiküller üretebilmek için altın tuzu mol miktarı sabit tutulup trisodyum sitrat mol değeri değiştirilerek bir seri deney yapılmıştır. Trisodyum sitrat/ $HAuCl_4$ mol oranı 1.0-4.5 arasında değiştirilerek trisodyum sitrat miktarının elde edilen altın nanopartiküllerin optik özelliklerine, partikül boy ve boy dağılımına etkileri incelenmiştir. Üretilen altın nanopartiküllerin fluoressan spektrofotometre ile fluoressan özellikleri, X-RD ile kristal yapısı, FTIR ile kimyasal yapısı, VSM ile manyetik özellikleri karakterize edilmiştir.

3.1.3. Altın Kaplı Manyetik (Fe₃O₄/Au) Nanopartiküllerin Sentezi

Altın kaplı manyetik nanopartiküller, manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküllerin bulunduğu çözeltilerde demir oksit yüzeyinde Au³⁺ iyonlarının hidroksil amin, trisodyum sitrat gibi çeşitli indirgeyici ajanlar ile indirgenmesi yöntemiyle üretilmektedir. Tez kapsamındaki bu partiküllerin üretilmesinde indirgeyici ajan olarak trisodyum sitrat kullanılmıştır. Çekirdek/kabuk (Fe₃O₄/Au) yapısındaki nanopartiküllerin sentezi, ilk olarak manyetik özellik gösteren manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküllerin üretimi daha sonra bunların altın ile kaplanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans tez çalışmam (Sayar, 2004) sonucu elde ettiğim tecrübe ve deneyimler sonucu manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküller, Fe(II) ve Fe(III) iyonlarının NaOH gibi alkali ortamda çöktürülmesiyle üretilmiştir. Manyetit nanopartiküllerin üretimi için izlenen yöntem şöyledir: Dört boyunlu bir reaktörde geri soğutucu altında, mekanik karıştırıcı ve su banyosu kullanılarak, N₂ atmosferinde, 80°C'deki 160 ml deionize su içine yüksek karıştırma hızında 120 ml 1.25 M Fe²⁺ ve Fe³⁺ tuz çözeltisi ile 120 ml 5M NaOH çözeltisi ilave edilmiştir. Reaksiyonun hemen başında siyah bir çökelek oluşumu gözlenmiştir. Bu çözelti 80°C'de 2 saat çok yüksek karıştırma hızında karıştırılmıştır. Manyetik ayırıcı (MCB 1200 Biomagnetic Processing Platform, Sigris, İngiltere) yardımıyla manyetik olan partiküller ile olmayan partiküller birbirinden ayrıldıktan sonra birkaç defa su ile yıkama işlemi uygulanmıştır. 0.1 M'lık tetrametilamonyum hidroksit (TMAOH, Sigma, ABD) çözeltisi ile stabilize edilerek 0.01 M'lık HNO₃ ile bir kere yıkanmıştır. 0.01 M'lık HNO₃ çözeltisinde dağıtılan nanopartiküller 80-90°C'de çözelti rengi kahverengi olana kadar karıştırılmıştır. Bu şekilde okside olan Fe₃O₄ nanopartikülleri 0.1 M'lık TMAOH çözeltisi içinde süspansiyon edilip pH 11 olana kadar su ile yıkanmıştır. Tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe₃O₄ nanopartikülleri hazırlanmıştır.

İkinci aşamada, 1.2 ml tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe₃O₄ nanopartikülleri 200 ml deionize su içinde süspansiyon edilip, 0.7 ml 155.2 mM'lık trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek sitrat iyonlarının OH⁻ iyonları ile değişmesi için 15 dakika sonike edilmiştir. Daha sonra çözelti yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti ilk kaynama noktasına ulaştığında etrafını altınla kaplamak için Au³⁺ iyonlarının Fe₃O₄ nanopartiküllerinin etrafında indirgenmesi için

10 ml 10 mM'lık tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi eklenerek 15 dakika kaynama noktasında karıştırılmıştır. Bu süre sonunda çözelti oda sıcaklığına gelinceye kadar yüksek hızda karıştırmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık sarı olan çözelti rengi kahverengi ve koyu renge dönerek en son kırmızı kahve olmuştur. Elde edilen nanopartiküller 10000 rpm'de santrifüjlenerek mıknatıs yardımıyla manyetik olan nanopartiküller ile manyetik olmayanlar birbirinden ayrılmıştır. Bu şekilde manyetik özellik göstermeyen çekirdeğinde manyetit nanopartikülü içermeyen sadece küresel altın nanopartiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri altın kaplı olanlardan ayırmak için her ikisi de manyetik özellik göstermesi nedeniyle manyetik ayırma yapılamamıştır. Literatürde altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri ayırmak için 1 M HCl çözeltisi ile yıkanıp birkaç kez de su ile yıkama işlemi ile gerçekleştirilmiştir (Cui, 2005). Ancak Liu ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartiküllerin 2 M ve üzeri HCl çözeltisi içinde stabilitesini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucu hem manyetit nanopartiküllerin hem de altın kaplı manyetik nanopartiküllerin derişik asit çözeltisi içinde hemen çözündüğünü belirtmişlerdir (Liu, 2008). Bu nedenle altın kaplı olmayan manyetit nanopartikülleri kaplı olanlardan ayırmak için karışım 0.02 M'lık okzalat çözeltisinde 1 saat mekanik karıştırılmıştır. Okzalat çözeltisi içersinde sadece manyetit nanopartiküllerin çözündüğü literatürde belirtilmiştir (Goon, 2008). Tekrar su ile santrifüjleme işlemi yapılarak süpernatant kısmında çözünmüş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımda altın kaplı manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır.

Altın tuz miktarı oluşturulan manyetik altın kaplı nanopartiküllerin etrafındaki altın kabuk kalınlığını etkilemektedir. HAuCl_4 miktarı 10, 15 ve 20 mM olacak şekilde üç farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilerek HAuCl_4 miktarının partikül boyuna ve plasmon özelliğine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca ortalama partikül boyu 40 ve 90 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülü kullanılarak iki farklı boyutta manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) sentezlenerek partikül boyu, plasmon özellikleri ve manyetik özellikleri araştırılmıştır. Üretilen altın kaplı manyetik nanopartiküllerin floresan spektrofotometre ile floresan özellikleri, X-RD ile kristal yapısı, FTIR ile kimyasal yapısı, VSM ile manyetik özellikleri karakterize edilmiştir.

3.1.4. Altın Nanoçubukların Sentezi

Genel çubuk formundaki altın nanopartiküllerin sentezlenmesi küresel formdaki altın nanopartikül çekirdeklerinin büyütülmesi yöntemi olan çekirdek geliştirme metodu (Seed Growth method) ile sentezlenmektedir. Altın nanoçubukların üretimi, küresel yapıda altın çekirdeklerinin hazırlanıp bu çekirdeklerin büyütme çözeltisinde silindirik yapıya dönüştürülmesi olmak üzere iki ana prosesten oluşmaktadır. İlk olarak küresel yapıda altın çekirdeklerin sentezinde izlenen yöntem şöyledir: 7.5 ml 100 mM'lık setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) çözeltisine 250 µL 10 mM'lık tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi eklenerek hafifçe karıştırılmıştır. 600 µl 10 mM'lık sodyum borhidrit (NaBH_4) çözeltisi hazırlanarak buzdolabında belli bir süre bekletilip karıştırılan çözeltiliye eklenerek 2 dakika karıştırılmıştır. Çözelti rengi açık sarıdan açık kahveye dönüşerek çekirdek (seed) çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisinin reaktif hale geçmesi için 2-5 saat aralığında karanlıkta bekletilmiştir.

İkinci aşamada nanoçubuk geliştirme (growth) çözeltisi hazırlanmıştır. Nanoçubuk geliştirme çözeltisi, setiltrimetilamonyum bromid (CTAB), altın tuzu ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), gümüş nitrat (AgNO_3) ve askorbik asitten oluşmaktadır. 40 ml 100 mM'lık CTAB çözeltisine 1.7 ml 10 mM'lık $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi eklenerek düşük karıştırma hızında karıştırılmıştır. Bu çözeltiliye önce 250 µl 10 mM'lık AgNO_3 ve daha sonra 270 µl 100 mM'lık askorbik asit eklenmiştir. Askorbik asitin eklenmesiyle çözelti rengi kahverengi sarıdan su gibi şeffaf renge dönüşmüştür. Bu şekilde hazırlanan nanoçubuk geliştirme çözeltisine daha önce hazırlanıp reaktif hale geçmesi için beklenen çekirdek çözeltisinden 420 µl eklenerek düşük karıştırma hızında karıştırılmıştır. Çekirdek çözeltisinin ilave edilmesinden 10 dakika içinde elde edilen nanoçubuğun uzunluk/çap oranına göre bir renk oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen nanoçubuklar 30 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenerek su ile yıkanıp çubuk şeklindeki Au nanopartiküllerden küresel formdaki altın nanopartiküller ayrılarak 0.1M'lık CTAB çözeltisi içinde süspansiyon edilmiştir. Bu şekilde altın nanoçubuklarda herhangi bir değişiklik olmadan aylarca saklanabilmektedir.

Küresel partiküllerin uzamasıyla çubuk yapısının oluşum mekanizmasının komplike olmasından dolayı altın nanoçubuk yapısının oluşumu tam olarak açıklanamamıştır.

Reaksiyonda kullanılan HAuCl_4 , AgNO_3 , indirgeme ajanları, askorbik asit, NaBH_4 , CTAB ve çekirdek çözeltisindeki en ufak değişiklik çubuğun morfoloji ve boyutunda büyük değişikliklere neden olmaktadır. Aynı prosedüre karşın değişik renk ve boyutta farklı optik özellikler gösteren altın nanoçubuklar sentezlenebilmektedir. Tezin amaçlarından biri olan mikroemülsiyon fazda DNA nanoarray geliştirilmesi olduğu için farklı boyutta altın nanoçubukların sentezlenmesi için uzunluk/çap oranını (aspect ratio) etkileyen AgNO_3 miktarı, çekirdek çözelti miktarı, askorbik asit miktarı, surfaktant türü ve derişimi, reaksiyon sıcaklığı, farklı çekirdek çözeltilerinin ve farklı sürelerde bekletilmiş çekirdek çözeltilerin kullanılması gibi parametrelerin uzunluk/çap oranına dolayısıyla çözelti rengi ve optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir.

3.2. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Tez kapsamında küresel yapıda altın nanopartiküller, çubuk yapısında altın nanopartiküller ve çekirdek/kabuk yapısında altın kaplı manyetik nanopartiküller olmak üzere üç tip nanopartikül hazırlanmış ve bunların fiziksel ve kimyasal yapıları, optik özellikleri çeşitli yöntemlerle karakterize edilmiştir. Aşağıda bu partikülleri karakterize etmek için kullanılan cihazlar ve kullanım şekilleri ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

Hazırlanan nanopartiküllerin boy ve boy dağılımlarını belirlemek için Zeta-Sizer (3000 HSA, Malvern, İngiltere) cihazı kullanılmıştır. Cihaz ölçüm yöntemi olarak Dinamik Işık Saçılması (DLS) kullanılmaktadır. Dinamik ışık saçılması, mikro saniyenin onda biri ile mili saniye zaman aralığında, örnek çözeltinin küçük bir kısmından saçılan ışığın zamanla değişiminin ölçülmesidir. Sentez sonrası yıkanıp, santrifüjlenen partiküller distile-deionize su kullanılarak seyreltilmiş ve yaklaşık 3 ml hacimli örnek çözeltisi polistiren küvet içersine konulmuştur. Deneyler, sıcaklık kontrollü bir bölme içersine yerleştirilen polistiren küvetin içersindeki çözeltiden 633 nm'lik kırmızı lazer ışığının geçirilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Örnek içersinden geçirilen lazer ışığından saçılan ışık 90° 'ye yerleştirilen detektör tarafından ölçülmüştür. Dedektörde ölçülen ışık şiddeti, elektronik sinyallere dönüştürölüp korelatöre gelmektedir. Korelatörde küçük zaman aralıklarında saçılan ışık şiddeti değerleri karşılaştırılır ve ışık şiddetinin değişim hızı belirlenmektedir. Saçılan ışığın

şiddetindeki değişimler, çalışılan bölgenin içinde ve dışındaki moleküllerin difüzyon hızıyla ilgilidir (Brownian hareketi) ve analiz edilen veriler direkt olarak ışık saçılmasına neden olan partiküllerin difüzyon katsayılarını vermektedir. Difüzyon ile partikül büyüklüğü arasındaki ilişki, küresel partiküller için Einstein tarafından geliştirilen ve Brownian hareketi ile açıklanan teorik denklikle açıklanmaktadır. Bu denklikten, küresel partiküllere ait difüzyon katsayıları fonksiyonlaştırılıp, hidrodinamik çap hesaplanmaktadır.

Partikül boy ve boy dağılımının ölçülmesinde kullanılan cihaz, partiküllerin zeta potansiyellerini de vermektedir. Partikül yüzeyinden belli bir uzaklıkta bulunan iyonlar hareket eden partikül ile birlikte sürüklenmemektedir. Bu uzaklığa kayma düzlemi denilmekte bu aralıkta ölçülen elektrik potansiyali zeta potansiyali olarak tanımlanmaktadır. Cihaz mikroelektroforez tekniğini kullanarak zeta potansiyali ölçmektedir. Bu teknik bir elektrik alanı içindeki yüklü partikülün hızının ölçülmesi esasına dayanmaktadır.

Nanopartiküllerinin kimyasal yapısı Fourier Transform Infrared Spektrofotometresi (FTIR, Shimadzu, DR 8101, Japonya) kullanılarak belirlenmiştir. Sentezlenmiş olan partiküller vakum etüvünde kurutulduktan sonra KBr ile (ağırlıkça %1 olacak şekilde) karıştırılarak disk haline getirilmiş ve FTIR spektrumları oda sıcaklığında çekilmiştir.

Üretilen nanopartiküllerinin karakterizasyonu ve kristal yapısının belirlenebilmesi için X-ışını kırınım difraktometresi (Rigaku RU-200, Japonya) kullanılmıştır. 0.5 mm Pyrex kapilerde hazırlanan örneklerin 50 Kv x150 Ma gücünde, 60 dak ölçümlerle, 20-100° 2θ açısında spektrumları çekilmiştir.

Nanopartiküllerin manyetik özelliklerinin incelenmesinde Titreşimli Manyetometre (Vibrating Sample Magnetometer, Fieldial Mark II Varian, Almanya) cihazı da kullanılmıştır. Vakum etüvünde kurutulmuş olan örneklerin 0 ile 20000 Gauss'luk bir manyetik alandaki mıknatıslık değerleri, oda sıcaklığında ölçülmüştür. Manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Bu ölçüm tekniğinde kurutulmuş olan örneğe sabit frekansta manyetik alan uygulanmaktadır. Örnek manyetik özelliğe sahipse bir mıknatıs gibi davranır ve geçici bir manyetik akış nedeniyle iletken çubuğun içinde potansiyel farkı

oluşur. Titreşimli manyetometre bu potansiyel farkı ölçerek örneğin manyetik özelliğini belirlemektedir.

Hazırlanan partiküllerin fluoresan özellikleri fluoresan spektrofotometre (Cary Eclipse, Avustralya) cihazı ile incelenmiştir. Belli derişimdeki partiküller kuartz küvete konularak uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 400-600 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu her bir partikül için maksimum emisyon dalga boyu bulunmuştur. Her bir partikül için bulunan emisyon dalga boyu sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 200-400 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılarak emisyon, uyarılma dalga boyları ve fluoresan sinyal şiddeti değerleri belirlenmiştir.

Üretilen partiküllerin optik özelliklerini incelemek için UV-görünür bölge spektrofotometresi (V-530,Jasco) kullanılmıştır. Belli derişimdeki partikülleri kuartz küvete konularak 200-1100 nm dalga boyu aralığında maksimum absorbans yaptığı dalga boyları belirlenmiştir.

Üretilen nanopartiküllerin çap ve uzunluklarını belirlemek ve görüntülemek için Transmission Elektron Mikroskobu (TEM, Tecnai G² F30, FEI Company) kullanılmıştır. Belli derişimdeki nanopartiküller karbon kaplı altın grid üzerine damlatılarak vakum sisteminde kurutulduktan sonra 200 kV voltaj geriliminde görüntüler elde edilmiştir. Bütün TEM ölçümleri Bilkent Üniversitesi Malzeme Bilimi ve Nanoteknoloji Enstitüsünde (UNAM) yapılmıştır. Ayrıca altın nanopartikülleri görüntülemek amacıyla Atomik Kuvvet mikroskobunda (AFM Nanosurf) non kontakt modunda 200 mV voltajda görüntüler alınmıştır.

Hazırlanan üç farklı nanopartiküllün kullanıldığı SPR destekli elipsometrik sensör yüzeylerinin ortalama kalınlık ölçümleri görüntülemeli "nulling" elipsometre (Nanofilm, EP3SW, Almanya) cihazı ile karakterize edilmiştir. Elipsometrik ölçümler sonucu elde edilen psi (Ψ) ve delta (Δ) açıları ile sensör yüzeyinde oluşan DNA karışımının oluşturduğu tabakanın kalınlığı ve optik özellikleri hakkında bilgi edinilmiştir. Bu işlem, elde edilen elipsometrik açıların, uygun bir şekilde modellenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Kalınlık ölçümleri 532 nm dalga boyunda lazer kaynağına sahip elipsometre ile substrata göre en uygun elipsometrik analiz açısı olan 70° geliş

açısında gerçekleştirilmiştir. Substrat yüzeyinde 2 ayrı noktadan, 3 bölgede ölçme işlemi gerçekleştirilmiş, “nulling” algoritması olarak da 4 bölge sıfırlama (“4-zone nulling”) kullanılarak, yüzey anizotropisi ve muhtemel deney hataları etkisinin en aza indirilmesi amaçlanmıştır. Elde edilen veriler, üç katmanlı modelde, sırasıyla hava, organik katman, altın nanopartikül ve cam substrat (BK7) kullanılarak modellenmiş ve organik katmanın kalınlığı bulunmuştur. Modelde hava için $n=1,0000$; organik katman için $n=1,4600$ altın nanopartikül için $n=0,4137$ $k=2,2721$ ve kalınlık 50 nm; BK7 substrat için $n=1,5183$ olarak alınmıştır.

3.3. Nanopartiküllerin Nanotıp Uygulamaları

3.3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Cihazlar

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti ve nanoarray çalışmalarında tiyol uç grulu 6 karbon uzatma kolu içeren MTB ve GOR prob ve hedef oligonükleotitleri MOLIBOL (Almanya) tarafından satın alınma yoluyla sağlanmıştır. MTB patojenlerine özgü oligonükleotid probu olarak 5’-HS-(CH₂)₆-(T)₁₅ GGG TGC ATG ACA ACA AAG TTG G-3’ dizisi, eşlenik hedef dizisi olarakta 5’-C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC-3’ sırası kullanılmıştır. *M. gordonae* patojenine özgü oligonükleotid probu (GOR) olarak 5’-HS-(CH₂)₆-(T)₁₅ CAC CCT CGG GTG CTG TC-3’ dizisi, eşlenik hedef dizisi olarak ta 5’-GA CAG CAC CCG AGG GTG-3’ dizi kullanılmıştır. Tiyol uç grubu taşıyan oligonükleotitlerin altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlamasında buffer olarak kullanılan fosfat buffer salin (PBS, pH 7.5) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Yüzeyinde oligonükleotit taşıyan altın nanoprobaların hedef oligonükleotitleri ile hibridizasyonunu gerçekleştirmek için pH 7.4’de PBS, 0.1 M NaCl ve 0.01% (w/w) Tween içeren hibridizasyon bufferı kullanılmıştır.

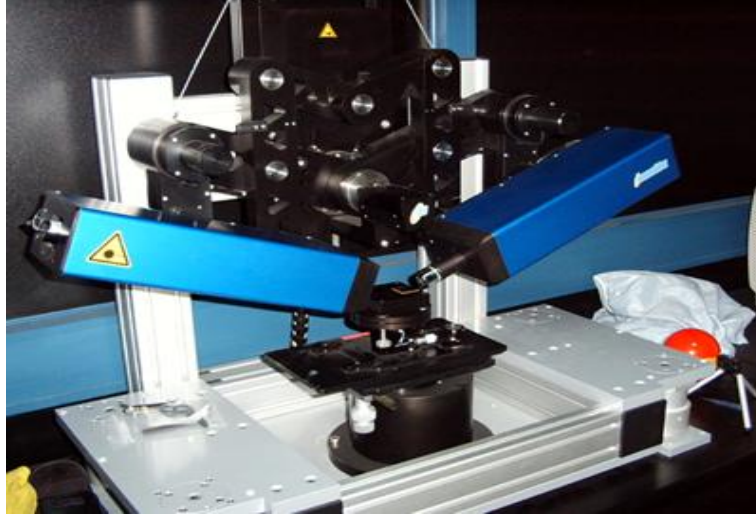
Tez kapsamındaki çalışmalarda SPR destekli elipsometre uygulamalarında taban malzeme olarak kırılma indisi bilinen BK7 cam slaytlar kullanılmış ve daha sonraki modifikasyonlar için 25mm×25mm’lik parçalara kesilmiştir. Cam slaytların temizlenmesi için Sigma-Aldrich firmasından temin edilen hidroklorik asit-HCl (% 37,8 v/v), sülfürik asit-H₂SO₄ (%70), mutlak etil alkol-C₂H₅OH (% 99 v/v) kullanılmıştır. Temizlenen yüzeyler BOS firmasından alınan yüksek saflıkta azot gazı ile kurutulmuştur. Ayrıca tüm çalışmalar boyunca çözeltiler hazırlanırken ve yıkama işlemleri yapılırken yüksek saflıkta (özgül direnci > 18 MΩ) deiyonize H₂O (DI H₂O)

kullanılmıştır. Cam slaytların yüzeyine altın nanopartiküllerin bağlanması için cam slaytların silanlanması için kullanılan 6-Merkaptoaminopropilmetoksisilan- $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ (MPTS, % 99 v/v) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. SPR destekli elipsometre çalışmalarında *M. gordonae* patojenine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotid probu (GOR prob) 5'–HS– $(\text{CH}_2)_6$ – $(\text{T})_{15}$ CAC CCT CGG GTG CTG TC–3', eşlenik hedef dizisi (GOR hedef) 5'–GA CAG CAC CCG AGG GTG–3' ve eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi 5'–C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC–3' MOLIBOL (Almanya) tarafından satın alınma yoluyla sağlanmıştır. Altın nanopartiküllerin yüzeyine istenilen prob oligonükleotitlerin immobilizasyonu için kullanılan pH 3.8 KH_2PO_4 tamponu ve eşlenik dizilerinin hibridizasyonunda hibridizasyon tamponu olarak kullanılan pH 7.4 fosfat tamponu için gerekli olan NaCl, Na_2HPO_4 , EDTA, Tween 20 (%0.005) gibi kimyasallar Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir. Sensör yüzeyinin oluşturulmasındaki son aşamada, bloklama ajanı olarak kullanılan 1-merkupto-6-hekzanol- $\text{HS}(\text{CH}_2)_6\text{OH}$ (MCH, %99 v/v) aynı şekilde Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır.

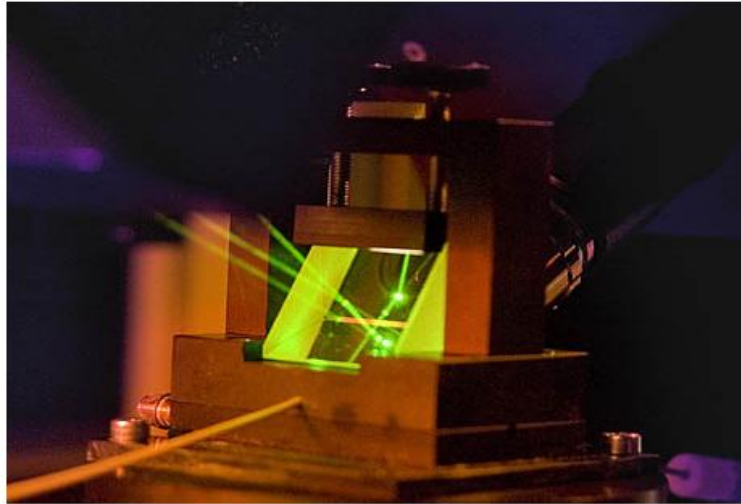
Kullanılan Cihazlar

Yapılan çalışmalarda kullanılan yüzeylere fiziksel veya kimyasal olarak bağlı organik tabakaların temizlenmesi için oksitleyici ortama ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle slayt yüzeylerini temizlemek ve yüzeyde oksitleme işlemini gerçekleştirmek için oksijen plazma yapılmış ve işlemler plazma cihazında gerçekleştirilmiş (Diener, Tetra, Clairton, PA, ABD) cihazı kullanılmıştır.

Tez kapsamındaki tüm çalışmalarda SPR bağlanma kinetikleri ve yüzeylerindeki kalınlık ölçümleri için Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Göttingen, Almanya) kullanılmıştır. Akış hücresine istenilen hızda akış verebilmek için ISMATEC (MCP-Process IP 65, Württemberg, Almanya) marka peristaltik pompa, uygun silikon ve teflon hortumlar kullanılmıştır. Şekil 3.1. ve Şekil 3.2.`de sırasıyla çalışmalarda kullanılan görüntülemeli elipsometre ve akış hücresi görülmektedir.



Şekil 3.1. Tez çalışmasında kullanılan görüntülemeli elipsometre (Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre) cihazı.



Şekil 3.2. Tez çalışmasında kullanılan elipsometre akış hücresi.

3.3.2. Mikroemülsiyon Fazda DNA Tanı Kiti veya Nanoarray Çalışmaları

Tez çalışmasının amaçlarından biri süspansiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ya da DNA arraylerin oluşturulmasıdır. Bu amaçla küresel ve çubuk yapısında altın nanopartiküller ve çekirdek/kabuk yapısında altın kaplı manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu nanopartiküllerin karakterizasyonu yapılabildiği optik özellikleri incelendikten sonra dört tip altın nanopartikül bu çalışma için seçilmiş olup, bunlar 13 nm ortalama partikül çapına sahip küresel altın nanopartikül, uzunluğu 32.3 nm çapı

6.7 nm (uzunluk/çap oranı 4.8) olan altın nanoçubuk, uzunluğu 40 nm çapı 19 nm (uzunluk/çap oranı 2.1) olan altın nanoçubuk, ortalama çapı 87 nm olan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerdir.

3.3.2.1. Süspansiyon Fazda Altın Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti ya da nanoarray çalışmalarında seçilen dört tip altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyol modifiye edilmiş oligonükleotitler immobilize edilerek nanopropalar hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) ve *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit probları ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır. Öncelikle sentezlenen farklı şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin UV-görünür bölge spektrofotometresi ile maksimum absorbans yaptığı dalga boyları belirlenmiştir. Daha sonra farklı derişimlerde (0.5-3.0 μM) tiyol modifiye edilmiş prob oligonükleotitleri nanopartikül içeren çözeltilere eklenerek 50 °C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Tiyolün altına olan afinitesinden faydalanarak prob oligonükleotitler nanopartikül yüzeylerine immobilize edilmiştir. Prob oligonükleotitlerin altın nanopartikül yüzeyine immobilizasyonunda uygulanan deneysel çalışma şöyledir: Nanopartikül (nanoçubuk, küresel altın nanopartikül, altın kaplı manyetik nanopartikül) stok çözeltisinden 1'er ml'lik dört örnek alınarak 0.5;1.0;2.0 ve 3.0 μM derişimlerinde PBS (pH 7.4) bufferında hazırlanmış tiyol modifiye edilmiş prob oligonükleotit (MTB, GOR) çözeltileri bu nanopartikül çözeltilerine eklenmiştir. Nanopartikül oligonükleotit karışımları 50°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Oligonükleotitin nanopartikül yüzeyine spesifik bağlanma verimini arttırmak için PBS bufferı eklenerek çözeltinin iyonik gücü artırılmıştır. Bu çözelti tekrar 50°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası nanopartikül yüzeyine bağlanmayan prob oligonükleotitleri uzaklaştırmak için 10000 rpm'de santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Çöken kısım tekrar PBS bufferında dağıtılarak UV-görünür bölge spektrofotometresi ile maksimum absorbans yaptığı dalga boyları ölçülerek "red-shift" (kırmızı kayma) olarak adlandırılan dalga boylarındaki kayma incelenmiştir. Her bir nanopartikülün oligonükleotit immobilize edilmeden önceki dalga boyları ile farklı derişimde (0.5-3.0 μM) prob oligonükleotit immobilize edildikten sonraki dalga boyları karşılaştırılarak optimum prob oligonükleotit derişimi belirlenmiştir. Farklı derişimlerdeki prob oligonükleotitlerin nanopartikül yüzeyine bağlanmasıyla derişme bağlı olarak ne kadarlık bir dalga boyu kaymasına neden

olduğu incelenmiştir. Sistemin hassasiyetini araştırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin komplementeri olmayan bir oligonükleotit ile aynı deneysel yöntem izlenerek dalga boylarındaki kayma ölçülmüştür. Ayrıca dört farklı altın nanopartikülün yüzeyinde prob oligonükleotit yokken, yüzeylerine prob oligonükleotit takıldıktan sonra ve hedef oligonükleotitle hibridize olduktan sonraki fluoresan özellikleri incelenmiştir. Hedef oligonükleotit takıldıktan sonra çözelti dehibridize olduğu sıcaklığa ısıtılıp santrifüjlendikten sonra fluoresan spektrofotometre ile tekrar fluoresan özellikleri gözlemlenmiştir. Süspansiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti sistemi, plasmon dalga boylarındaki kaymalarının incelenmesinin yanı sıra fluoresan sinyal şiddetindeki değişimler ile de araştırılmıştır.

Optimum prob deşişimi belirlendikten sonra o deşişimde prob takılı altın nanopartiküllerin farklı deşişimlerde (0.5-3.0 μM) hedef (komplementer) oligonükleotitleri ile hibridizasyonu sağlanmışır. Optimum prob deşişiminde hazırlanan altın nanoprobaları hibridizasyon bufferı içinde süspansiyon edilmiştir. Çözeltiyeye 1.0; 2.0; 3.0 μM deşişimlerinde hedef oligonükleotit çözeltisi eklenerek hibridizasyonun gerçekleşmesi için 25 °C'de 12 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası hibridize olmayan oligonükleotitler 10000 rpm'de santrifüjlenerek ayrılmıştır. Çöken kısım tekrar PBS bufferında dağıtılarak plasmon dalga boylarındaki kaymalar ölçülmüştür. Prob oligonükleotitin farklı deşişimlerdeki hedef oligonükleotitle hibridizasyonu sonucu farklı deşişimdeki hedef oligonükleotitlerin ne kadarlık bir dalga boyu kaymasına neden olduğu incelenmiştir. Dört farklı altın nanopartikül için yukarıda anlatılan işlemler ve ölçümler aynen uygulanarak her bir nanopartikül için optimum prob ve hedef oligonükleotit deşişimi belirlenmiştir. Ortalama 13 nm partikül çapına sahip küresel altın nanopartikül ve uzunluğu 32.3 nm çapı 6.7 nm (uzunluk/çapı oranı 4.8) olan altın nanoçubuklar ile yapılan çalışmalarda *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmışır. Uzunluğu 40 nm çapı 19 nm (uzunluk/çapı oranı 2.1) olan altın nanoçubuk ve ortalama çapı 87 nm olan altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikül ile yapılan çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmışır.

3.3.2.2. Mikroemülsiyon Fazda Nanoarray Çalışmaları

Bu bölümde farklı prob lar takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar (“nanoarrayler”) hazırlanmıştır. Bunlar şöyledir:

- a) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı,
- b) Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı,
- c) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül MTB prob karışımı,
- d) Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül MTB prob karışımı.

Optimum derişimde prob oligonükleotit taşıyan altın nanoprob lar ayrı ayrı yukarıda anlatılan immobilizasyon işlemi uygulanarak hazırlanmıştır. Birinde GOR prob oligonükleotiti diğ erinde MTB prob oligonükleotiti taşıyan iki farklı nanopartikül yaklaşık eşit hacimde olacak şekilde karıştırılarak mikroemülsiyon karışımı hazırlanmıştır. İlk olarak oluşturulan bu mikroemülsiyon karışımlarının UV-görünür bölge spektrofotometresi ile maksimum absorbans yaptığı dalga boyları belirlenmiştir. Karışım içindeki her bir nanoprob un kendine özgü plasmon piki verip vermediği araştırılmıştır. Daha sonra bu mikroemülsiyon karışımı 10000 rpm’de çöktürülerek hibridizasyon bufferı içinde dağıtılmıştır.

Nanoprob lardan birinin hedefini içeren belli derişimdeki hedef oligonükleotit çözeltisi eklenerek 25 °C’ de 12 saat inkübe edilerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. İnkübasyon sonrası hibridize olmayan oligonükleotitler 10000 rpm’de santrifüjlenerek ayrılmıştır. Çöken kısım tekrar PBS bufferında dağıtılarak hedefin probunu taşıyan nanopartikülün plasmon pikinde hibridizasyon sonucu dalga boyu kayması olup olmadığı araştırılmıştır. Hedefin probunu taşımayan nanopartikülün plasmon pikinde herhangi bir değışimin olup olmadığı incelenmiştir. Bu şekilde mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmaya çalışılmıştır.

3.3.3. SPR Destekli Elipsometre Çalışmaları

SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında taşıyıcı destek materyali olarak kırılma indisi bilinen BK7 cam slaytlar kullanılmış ve daha sonraki modifikasyonlar yapılmadan önce yüzey homojenliğini sağlamak için yüzeylerin immobilizasyon işlemlerinde sorun yaratacak organik kirliliklerden arındırılması gerekmektedir. Bunun için önce cam slaytlar deiyonize su ve etanolla birkaç kez yıkanıp, yüzeydeki kirlilikleri ve pürüzlülükleri gidermek amacıyla 1:3 oranında derişik HNO₃ ve H₂O içeren çözeltide 30 dakika boyunca kaynama sıcaklığında bekletilmesiyle temizlenmiştir. Bu işlemden sonra yüzeyler tekrar etanolla yıkanmış ve azot akımında kurutulmuştur. Son olarak, altın nanopartikül immobilize edilecek cam slaytlar vakum altında doğrudan oksijen gazı ya da havanın oksijenini kullanarak oluşturulan plazma (Diener, Tetra, Clairton, PA, ABD) cihazında 30 dakika bekletilmiştir.

3.3.3.1. Cam Slayt Yüzeyine Altın Nanopartiküllerin İmmobilizasyonu

Yukarıda anlatılan işlemlerden geçmiş cam slaytların yüzeyinin silanlanması için hacimce %5'lik 6-Merkaptoaminopropilmetoksisilan (MPTS) içeren etanol çözeltisinde 3 saat oda sıcaklığında karanlıkta bekletilmiştir. Tekrar etanol ve saf su ile yıkama işlemlerinden sonra azot akımında kurutulmuştur. Silanlanmış cam yüzeylerindeki tiyol uç gruplarından altın nanopartiküllerin tiyol grubuna olan afinitesinden faydalanarak immobilizasyonu gerçekleştirilmiştir. İmmobilizasyon için nanopartiküllerin cam yüzeyleri üzerinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra cam slaytlar su ile yıkanıp azotla kurutularak yüzeye bağlanmamış altın nanopartikülleri uzaklaştırılmıştır. Dört farklı derişimde altın nanopartikül yukarıdaki yöntemle hazırlanmış cam slaytlara immobilize edilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle yüzey üzerinde tek tabaka oluşturacak şekilde optimum nanopartikül derişimi belirlenmiştir. Daha sonra optimum derişimde cam yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiş altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlar, SPR esaslı elipsometrik biyosensörlerde sensör yüzeyi olarak kullanılmıştır.

3.3.3.2. Altın Nanopartikül Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması

Sensör yüzeyine immobilize olan oligonükleotid problemlerin daha sonraki hedef dizileri ile eşleşme aşamasında en iyi sonucu verebilmeleri için ne kadar sıklıkta ve miktarda bağlanmalarının araştırılması için sensör yüzeyine farklı derişimlerdeki problemlerin immobilizasyonu incelenerek optimum prob derişimi belirlenmiştir. Bu çalışmalarda *M. gordonae* patojenine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotid probu (GOR) olarak 5'-HS-(CH₂)₆-(T)₁₅ CAC CCT CGG GTG CTG TC-3' dizisi kullanılmıştır. GOR prob derişim değerleri daha önce grubumuzda altın film kaplı cam slaytlar üzerine GOR prob oligonükleotitin bağlanması konusunda çalışmış olan Mehmet Duman'ın doktora tez çalışmasına dayanılarak 0.5-2.0 µM aralığı olarak seçilmiştir [Duman, 2008]. Immobilizasyon işlemi sırasında kullanılan tampon çözelti, bağlanmada etkili olduğu için çalışmanın bu aşamasında nanopartikül bağlanmış cam slayt yüzeyine uygun prob immobilizasyonu sağlayacak tampon çözeltisi literatür taraması sonucunda 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH₂PO₄) tamponu olarak belirlenmiştir. Bu işlem için sırası ile optimum altın nanopartikül derişimindeki cam slayt SPR akış hücresine yerleştirilmiştir. SPR akış hücresine sırasıyla ilk 30 dakika 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH₂PO₄) tampon çözeltisi ve farklı derişimlerdeki (0.5-2.0 µM) GOR prob çözeltileri oda sıcaklığında akış hücresinden 10.2 µl/dakika akış hızında geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. Her bir derişimdeki kalınlıklar elipsometre ile ölçülmüş elde edilen kalınlık değerleri ile kinetik bağlanma sonuçları birlikte değerlendirilerek optimum prob derişim değeri belirlenmiştir.

3.3.3.3. Altın Nanopartikül Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotit Dizisinin Hedef ile Hibridizasyonu

Optimum prob derişimi belirlendikten sonra yüzeye immobilize olan optimum prob derişimindeki oligonükleotitin daha sonraki hedef dizisi ile eşleşmenin en iyi gözleendiği optimum hedef oligonükleotit derişimi incelenmiştir. GOR prob oligonükleotitin eşlenik hedef dizisi olarak da 5'-GA CAG CAC CCG AGG GTG-3' sırası kullanılmıştır.

Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.5-2.0 µM) GOR probunun eşlenik dizisi olan oligonükleotit çözeltileri gönderilerek

eşleşme sonucunda oluşan kalınlık değişim değerleri ölçülmüştür. Bu işlem için sırası ile yüzeye altın nanopartikül takılmış cam slayt SPR akış hücreğine yerleştirilerek 30 dakika 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltisi ve optimum derişimde GOR prob çözeltisi 10.2 $\mu\text{l}/\text{dakika}$ akış hızında akış hücreğinden geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. Tiyol modifiye tek sarmal oligonükleotid problemlerin altın yüzeye hem tiyol gruplarındaki sülfür atomundan kovalent olarak hem de bazı durumlarda nükleotidlerin yapılarında bulunan amin gruplarından özgün olmadan yüzeye yapışıp hedef dizileri ile eşleşmeyi sağlayan amin gruplarının kapalı olmasından dolayı hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Bu nedenle prob oligonükleotitlerin hedef dizileri ile eşleşmelerinin en etkili şekilde olmasını sağlamak için bloklama ajanı olan 1 mM'lık 1-merkapt-6-hekzanol (MCH) çözeltisi 30 dakika geçirilerek özgün bağlanmayan oligonükleotid problemler sensör yüzeyinden uzaklaştırılmıştır.

Sensör yüzeyine optimum derişimde prob ve bloklama ajanı immobilizasyonu sonrası yüzeydeki problemler hedef dizileri ile eşleşmeye hazır duruma gelmiştir. Uygun eşleşmeyi sağlayacak tampon çözeltisi, pH ve sıcaklık parametreleri Mehmet Duman'ın doktora tezi temel alınarak, hibridizasyon tampon çözeltisi pH 7.4 fosfat tamponu (20 mM Na_2HPO_4 , 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, %0.005 Tween 20) ve eşleşme sıcaklığı ise oda sıcaklığı (25°C) olarak belirlenmiştir. Daha sonra akış hücreğinden 15 dakika hibridizasyon tampon çözeltisi ve 0.5-2.0 μM derişimlerinde hazırlanmış GOR hedef oligonükleotit çözeltisi sırasıyla geçirilerek dengeye gelene kadar ölçümler alınmıştır. Eşleşme sonrası sensör yüzeyinde eşleşmeden kaynaklanan ortalama kalınlık değişimi bölüm 3.1.1' de belirtildiği şekilde "nulling" elipsometre ile ölçülmüştür.

Son olarak da SPR destekli elipsometrik sensörünün seçiciliğini incelemek amacıyla optimum derişimde prob immobilize edilmiş cam slayta optimum hedef oligonükleotit derişiminde fakat immobilize edilmiş problemlerin eşleniği olmayan bir oligonükleotit çözeltisi gönderilmiştir. Bu çalışmada da yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış olup eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi olarak 5'-C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC-3' sırası kullanılmıştır.

Prob immobilizasyonu, bloklama işlemi ve problemlerin hedef dizileriyle eşleşmesi sonrası özgün olmayan etkileşimlerden dolayı sensör yüzeyine tutunan oligonükleotit

dizileri ve MCH molekülleri, kullanıldıkları tampon çözeltiler ile yıkanarak uzaklaştırılmıştır. Bu işlem tüm SPR destekli elipsometre sensörünün hazırlanması ve kullanılması sırasında gerçekleşen tüm basamaklarda özgün olmayan etkileşimlerin yüzeyden uzaklaştırılması için kullanılmıştır.

SPR destekli elipsometrik sensör çalışması, 13 nm ortalama partikül çapına sahip küresel altın nanopartikül, uzunluğu 54 nm çapı 15 nm (uzunluk/çap oranı 3.5) olan altın nanoçubuk, uzunluğu 54 nm çapı 21 nm (uzunluk/çap oranı 2.6) olan altın nanoçubuk, ortalama çapı 87 nm olan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül olmak üzere dört tip nanopartikül için yapılmıştır. Hepsinde de *M. Gordonae* bakterisine özgü prob ve hedef oligonükleotiti kullanılmıştır.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Nanoteknoloji, tıpta devrim yaratma potansiyeline sahip yeni bir alan olarak ifade edilmektedir. Bu alanın kalbi, nanometre boyutunda nanoyapıların oluşturulup bunların boyutuna bağlı olarak gösterdikleri çeşitli eşsiz fiziksel ve kimyasal özelliklerinin kullanılmasına dayanmaktadır.

Nanopartiküller, yüksek yüzey alanının yanında farklı optik, elektronik, manyetik ve floresan özelliklere sahip olmalarından dolayı birçok uygulama alanına sahip üstün malzemelerdir. Manyetik nanopartiküller, altın ve gümüş gibi metalik nanopartiküller ve floresan özellik gösteren yarı iletken nanokristaller (Kuantum parçacıkları, Qdot) bunlara örnek gösterilebilir. Özellikle medikal alanda çeşitli patojenik ve genetik hastalıkların teşhis ve tanısında kullanılmak üzere tasarlanan biyosensörlerde, tümör hücrelerinin erken teşhis edilmesinde bu nanopartiküllerin manyetik, optik ve floresan özelliklerinden yararlanılmaktadır.

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tanısı, çevresel kirliliklerin ve biyolojik ajanların belirlenmesi için yüksek seçicilik ve hassasiyette optik nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle Au ve Ag gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Au nanopartiküllerin kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir. Son yıllarda DNA hibridizasyonu, antijen antibadi etkileşimi gibi moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için Au film tabakası yerine altın nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektirik sabiti ve dolayısıyla refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir altın nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Ayrıca Au ve Ag nanopartiküllerinin partikül boyuna ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler

göstermesi nedeniyle birden fazla analitin eş zamanlı tayininde yapıldığı SPR biyosensörleri de geliştirilmektedir.

Manyetik yüklü polimerik nanopartiküller, manyetik özellik taşıyan (manyetit (Fe_3O_4), maghemit (Fe_2O_3), kobalt (Co), nikel (Ni) gibi) inorganik maddeler içeren polimerik partiküllerdir. Manyetik nanopartiküllerin en önemli avantajı ortamdaki manyetik alan kullanılarak kolaylıkla ayrılabilmesidir. Bu özelliklerinden dolayı birçok biyomedikal uygulamalarda kullanımı artmaktadır. Bu amaçla manyetik özellik taşıyan inorganik maddeler ile yüklü sentetik (polistiren, polivinilalkol, poliakrilamid, poliakrilik asit gibi) ve doğal (kitosan, aljinat, dekstran gibi) polimerik partiküller üretilmekte ve bunları ticari olarak bulunabilmektedir. Manyetik nanopartiküller, manyetik hücre ayrılması ve saflaştırılması, ilaç salımı, manyetik hedefleme (ilaç ve radyofarmasetikler), immünotestler, moleküler biyoloji, RNA-DNA saflaştırılması, Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) ve diagnostik kitler gibi çeşitli biyomedikal uygulamalarda kullanılmaktadır. Son zamanlarda özellikle gen terapisi uygulamalarında kullanılan plasmid DNA gibi genetik materyallerin yüksek saflıkta ve etkin konformasyonunu kaybetmeden elde edilmesi için çeşitli saflaştırma sistemleri geliştirilmektedir. Bu amaçla mevcut saflaştırma kitlerine alternatif olarak basit, ucuz ve birçok saflaştırma basamağı gerektirmeden sadece dışarıdan bir manyetik alan kullanılarak süperparamanyetik nanopartiküllerin kullanıldığı sistemlere olan ilgi artmıştır.

Altın nanoyapıların süspanse olduğu çözeltiler boyut ve geometrik şekillerine bağlı olarak güçlü plasmon bandları göstermektedirler (Perez-Juste, 2005). Altın nanoyapıların biyolojik reseptör (antibadi, oligonükleotit) molekülleri ile aktivasyonu sonucu dielektrik özelliklerinin değişimine bağlı olarak plasmon dalga boylarında red-shift denilen dalga boyu kaymasına neden olmaktadır. Bu özelliklerine dayanan birçok uygulamalar bulunmaktadır (Nath, 2004; Yonzon, 2004; Haes, 2002; Lee, 2005). Süspanسیون esaslı immünoassay geliştirmek amacıyla küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki antibadinin antijenle etkileşimi sonucu refraktif indeksinin dolayısıyla plasmon spektrumundaki değişim araştırılmıştır (Englebienne, 1998; Englebienne, 2000). Hedef molekülün bağlandığı plasmon spektrumundaki dalga boyu kayması ya da belli bir dalga boyundaki absorpsiyon yoğunluğunun değişimi ile analiz edilmekte olup dalga boyu kaymasının incelenmesinin daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Yu,2006). Altın nanoçubuklar hem aksenel hemde

radyal yönde plasmon bandı göstermektedirler. Özellikle aksel yöndeki plasmon dalga boyları buldukları ortamın dielektrik özelliklerinin değişimine daha duyarlıdır. El-Sayed ve arkadaşları altın nanoçubukların “aspect ratio” oranlarındaki en ufak bir değişikliğin çözelti renginde ve plasmon spektrumunda değişikliğe neden olduğunu belirtmişlerdir. Literatürde altın nanoçubukların bu özelliklerinden yararlanılarak farklı özelliklerdeki nanoçubuklarla birden fazla analitin eş zamanlı tayin edildiği multipleks biyosensörleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Wang ve arkadaşları E. coli and anti-S. Typhimurium patojenik bakterilerine özgü antibadillerle hazırladıkları altın nanoçubuk problemlerin ilgili antijenleri ile etkileşimi sonucu aksel plasmon dalga boyu kaymalarını inceleyerek patojenleri tayin etmişlerdir (Wang, 2008).

Sunulan bu çalışmada üç farklı nanopartikül üretilmesi amaçlanmıştır. Bunlardan birincisi son yıllarda çok yoğun bir şekilde araştırmalar yapılan, özellikle nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan ve kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) bağlanabilen altın nanopartiküllerdir. Bunların farklı boyut ve şekillerde üretilmeleri, hem mikroemülsiyonlar ve hem de cam taşıyıcı yüzeylere tek tabakalı adsorbe edilerek, alternatif DNA tanı kitleri ve nanoarrayler geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Tez kapsamındaki çalışmalarda nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) takılabilen küresel ve çubuk formunda altın nanopartikül ve nanoçubuklar, çekirdek/kabuk formunda altın kaplı manyetik nanopartiküller (Fe_3O_4/Au) olmak üzere üç farklı nanopartikülün sentez ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. Daha sonra bu nanopartiküllerin mikroemülsiyon fazda tanı kitleri ya da nanoarray sistemlerinde ve cam gibi taşıyıcı yüzeylere adsorbe edilerek SPR destekli elipsometrik biyosensörlerinde kullanılabilirlikleri olmak üzere iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Mikroemülsiyon fazda tanı kiti ya da nanoarray çalışmalarında seçilen dört tip altın nanopartiküllerin yüzeyine tiyollu oligonükleotitler immobilize edilerek nanopropalar hazırlanmıştır. Bu çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) ve *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır. Öncelikle sentezlenen farklı şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin optik özellikleri incelenip yüzeylerine farklı derişimlerde prob oligonükleotitler immobilize edilerek optik

özelliklerindeki değişimler incelenmiştir. Daha sonra prob takılı bu altın nanopartiküller farklı derişimlerde hedef (komplementer) oligonükleotidleri ile etkileştirilerek, optik özelliğindeki değişimler izlenerek hibridizasyonun olup olmadığı izlenmiştir. Ayrıca sistemin hassasiyetini araştırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin eşleniği olmayan bir oligonükleotit ile etkileştirilerek hem dalga boylarındaki kayma hem de fluoresan sinyal şiddetindeki değişimler incelenmiştir. En son aşamada yüzeyinde farklı problemler takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar ("nanoarrayler") hazırlanmıştır. Bu mikroemülsiyon karışımlarına sadece birinin hedefini içeren oligonükleotit çözeltisi eklenerek hedef oligonükleotitin ilgili probunu içeren nanopartikülün plasmon dalga boyundaki kaymalar incelenmiştir. Bu şekilde altın nanopartiküllerin (farklı şekil ve boyutta) optik özelliklerinden faydalanarak mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmuştur.

SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında öncelikle taşıyıcı destek materyali olarak kullanılacak cam slaytlar öngürülmüş uygun yöntemle temizlenmiştir. Temizlenmiş cam slaytlar 6-Merkaptopropilmetoksisilan (MPTS) çözeltisiyle silanize edilip tiyol uç grubundan dört tip altın nanopartikülün kimyasal olarak immobilizasyonu sağlanmıştır. Farklı derişimlerde (0.25-1.0 (%v/v)) dört tip altın nanopartikülün cam yüzeyine immobilize edilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle cam slayt yüzeyini tek tabaka kaplıyacak şekilde optimum nanopartikül derişimi belirlenmiştir. Daha sonra optimum derişimde cam yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiş altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlar, SPR sisteminde taşıyıcı matriks olarak kullanılmıştır. Bu şekilde hazırlanmış altın nanopartiküllerle genişletilmiş cam slaytlara dört farklı derişimde (0.25-2.0 μM) *M. Gordonae* patojenik bakterisine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum prob derişimi belirlenmiştir. Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış cam slaytlara daha sonra dört farklı derişimde problemlerin hedefi olan oligonükleotitler göndererek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle hibridizasyon sonucundaki kalınlık değişimi incelenmiştir. Ayrıca optimum hedef oligonükleotit derişiminde hedef olmayan oligonükleotit çözeltisi gönderilerek sistemin seçiciliği incelenmiştir.

Üç farklı nanopartikülün sentezi, karakterizasyonu ve bunların nanotıp uygulamaları çalışmaları aşağıda ayrı bölümler altında sunulup tartışılmıştır.

4.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi ve Karakterizasyonu

4.1.1. Küresel Altın Nanopartiküllerin Sentezi

Nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan farklı boyutta küresel altın nanopartikülleri Turkevich-Frens yöntemi olarak adlandırılan sitratla indirgeme yöntemiyle üretilmiştir. Bu bölümde küresel altın nanopartiküllerin üretimi için izlenen metot şöyledir: İlk olarak sentez sırasında kullanılacak cam malzemeler kral suyu çözeltisinden geçirilerek saf su ile yıkanmıştır. 75 mg tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) denilen altın tuzu 250 ml deionize su içinde çözünerek (0.88 mM) çözelti geri soğutucu altında yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. İndirgenme ajanı olarak kullanılan trisodyum sitrattan ağırlıkça %1 oranında sitrat içeren 26.25 ml'lik indirgeme çözeltisi hazırlanarak kaynama noktasına gelmiş altın tuzu çözeltisine hızlıca ilave edilmiştir. Çözeltinin ilave edilmesiyle ilk 15 dakika içinde renk sırasıyla sarıdan mora, griye ve kırmızıya dönüşmüştür. Aynı sıcaklıkta 15 dakika daha karıştırılarak küresel altın nanopartikülleri sentezlenmiştir. Oda sıcaklığına soğutulmuş nanopartiküller büyük agregatları uzaklaştırmak ve sterilize etmek için 0.22 μm 'lık filtreden geçirilmiştir. Sentezlenen altın nanopartikülleri 10000 rpm'de santrifüjlenerek su ile üç defa yıkanarak $+4^\circ\text{C}$ 'de buzdolabında karanlıkta saklanmıştır.

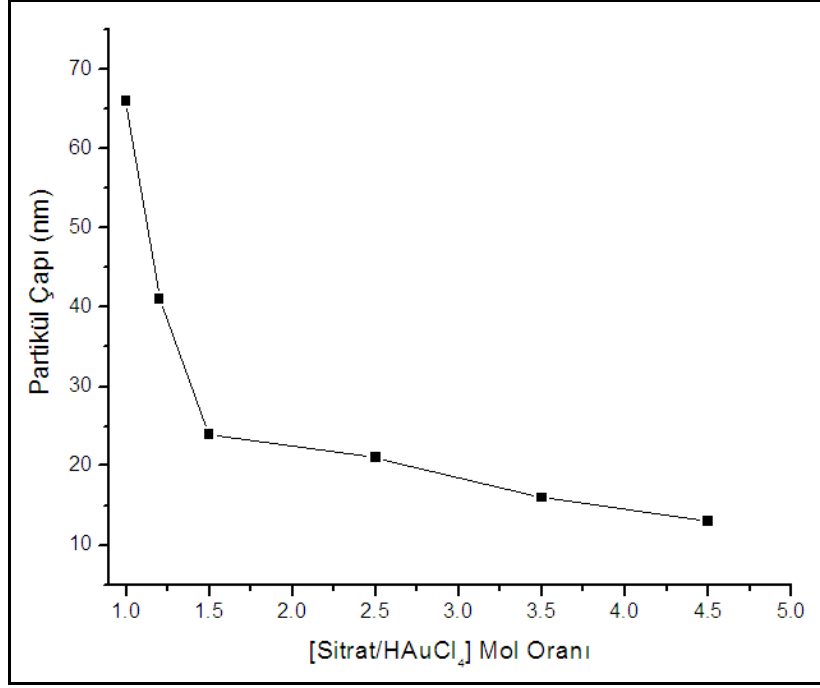
Altın nanopartikülün boyutu indirgeyici/stabilizör ajan (trisodyum sitrat) ve altın (III) tuz türevleri (hidrojen/sodyum tetraklorat(III)) arasındaki oranla kontrol edilebilmektedir. Altın nanopartiküller boyutuna bağlı olarak farklı optik özellikler gösterdiği için tez kapsamında farklı boylarda altın nanopartiküller üretebilmek için altın tuzu mol miktarı sabit tutulup trisodyum sitrat mol değeri değiştirilerek bir seri deney yapılmıştır. Trisodyum sitrat/ HAuCl_4 mol oranı 1.0- 4.5 arasında değiştirilerek trisodyum sitrat miktarının optik özelliklerine, partikül boy ve boy dağılımına etkileri incelenmiştir. Çizelge 4.1'de farklı trisodyum sitrat/ HAuCl_4 mol oranında üretilen küresel altın nanopartiküllerin boy, boy dağılımı, zeta potansiyel ve radyal plasmon dalga boyları gibi özellikleri verilmiştir. Şekil 4.1'de trisodyum sitrat/ HAuCl_4 mol oranına karşı ortalama partikül çapı değişimi gösterilmiştir. Ayrıca Şekil 4.2'de farklı

sitrat/HAuCl₄ mol oranında üretilen altın nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir.

Çizelge 4.1. Farklı trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranında üretilen küresel altın nanopartiküllerin özellikleri.

| Örnek No | [Sitrat/HAuCl ₄] Mol oranı | λ_{max} (nm) | Ortalama Partikül çapı (nm) | Heterojenlik İndeksi (PI) | Zeta Potansiyeli (mV) |
|----------|--|----------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 4.5 | 519 | 13 | 1.420 | -32.3 |
| 2 | 3.5 | 522 | 16 | 1.527 | -31.7 |
| 3 | 2.5 | 525 | 21 | 1.457 | -28.9 |
| 4 | 1.5 | 527 | 26 | 1.580 | -26.8 |
| 5 | 1.2 | 530 | 41 | 1.745 | -25.0 |
| 6 | 1.0 | 545 | 66 | 1.756 | -24.5 |

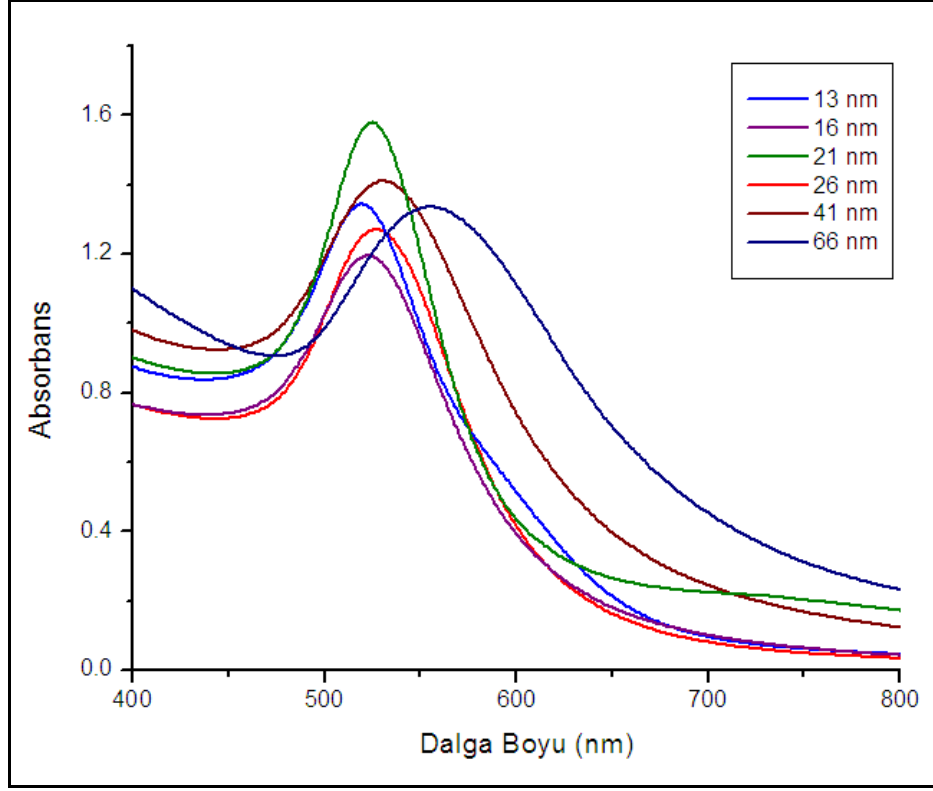
Altın nanopartiküller boyutuna bağlı olarak farklı radyal plasmon dalga boyu vermektedirler. Altın nanopartikülün boyutu ise indirgeyici alan olarak kullanılan trisodyum sitrat ve altın tuzu arasındaki oranla kontrol edilmektedir. Çizelge 4.1 ve Şekil 4.1'de görüldüğü gibi trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı arttıkça üretilen altın nanopartiküllerin çapı azalmıştır. Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 4.5 iken 13 nm bu oran 1.0'e düşürüldüğünde 66 nm çapında küresel altın nanopartiküller elde edilmiştir. Altın nanopartikül boyu arttıkça heterojenlik indeksinde arttığı görülmüştür. Ayrıca zeta potansiyel değerlerine bakıldığında küresel altın nanopartiküllerin negatif yüklü olduğu belirlenmiştir. Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı azaldıkça partikül boyu artmış ve buna bağlı olarak yüzey yüklerinin azaldığı görülmüş olup zeta potansiyel değerleri -32.3 mV ile -24.5 mV değerinde değişmiştir. Şekil 4.1'de trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranına karşı ortalama partikül çapı değişimi gösterilmiştir.



Şekil 4.1. Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranına karşı ortalama partikül çapı değişimi.

Trisodyum sitrat, Au(III) altın tuzunu indirgemek amacıyla kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada altın tuzu miktarı sabit tutulup sitrat miktarı değiştirilmiş olup trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranına azaldığında sitrat miktarı azalmaktadır. Bu sitrat miktarı da daha çok miktarda altın tuzunu indirgeyemediğinden partikül boyunun arttığı görülmüştür. Şekil 4.1’de görüldüğü gibi trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 1.5’den daha büyük oranlarda ortalama partikül boyunda büyük bir değişim olmadığı görülmüştür. Fakat bu mol oranı 1.5’den biraz az azaltıldığında bile partikül boyunda büyük bir artışın olduğu görülmüştür. Örneğin trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 1.5 iken 26 nm çapında nanopartikül elde edilirken bu oran 1.2’ye düşürüldüğünde partikül çapı yaklaşık 2 katı artarak 41 nm olarak ölçülmüştür. Nidhi ve arkadaşları trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 4.6 iken 12.8 nm, bu oran 1.14 olduğunda 48 nm ortalama partikül çapında küresel altın nanopartiküller elde etmiş olup, sitrat miktarı azaldıkça daha büyük partiküllerin elde edildiğini rapor etmişlerdir (Nidhi, 2004). Yapılan bu çalışmayla literatür ile aynı sonuçlar elde edilmiştir.

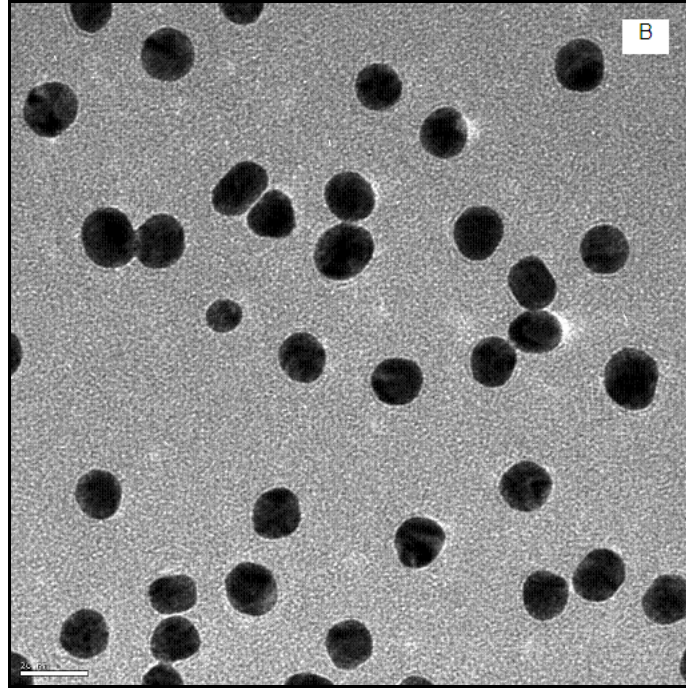
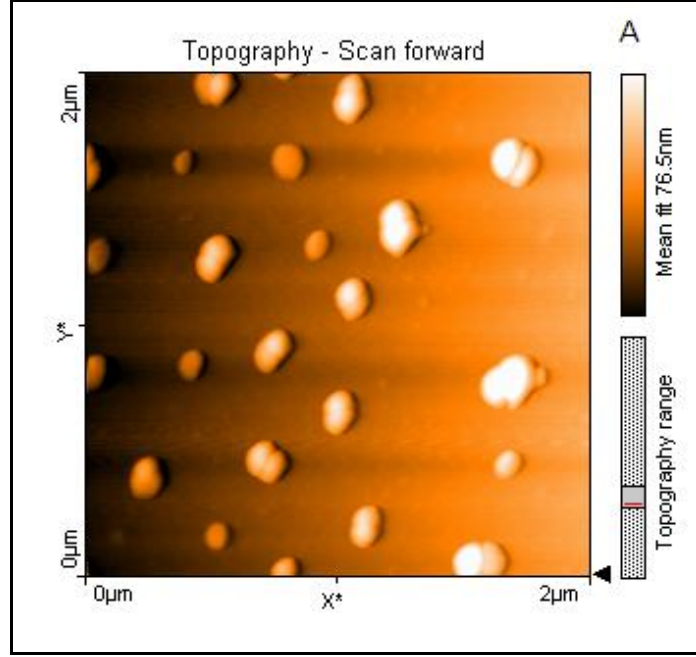
Altın nanopartiküller boyuna bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleri nedeniyle Şekil 4.2’de farklı sitrat/HAuCl₄ mol oranında üretilen altın nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.2. Farklı sitrat/HAuCl₄ mol oranında üretilen altın nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Küresel altın nanopartiküller sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermektedirler. Şekil 4.2’de görüldüğü gibi altın nanopartiküllerin partikül çapı arttıkça radyal plasmon dalga boylarında arttığı görülmüştür (Çizelge 4.1). Ortalama partikül çapı 13 nm olan altın nanopartikül 519 nm’de plasmon dalga boyu verirken partikül çapı 66 nm’ye arttığında plasmon dalga boyu 545 nm olarak ölçülmüştür. Partikül boyu arttıkça dalga boyu kayması (red-shift) olduğu görülmüştür. Literatür ile aynı sonuçlar elde edilmiştir (Nidhi, 2004; Kim, 2006).

Yapılan çalışmalar sonucu Çizelge 4.1’deki 1 nolu örneğin TEM görüntüsü, 6 nolu örneğinde AFM görüntüsü Şekil 4.3 A ve B’ de verilmiştir.



Şekil 4.3. A) 6 nolu küresel altın nanopartikülün AFM görüntüsü B) 1 nolu küresel altın nanopartikülün TEM görüntüsü (skala bar 20 nm'dir).

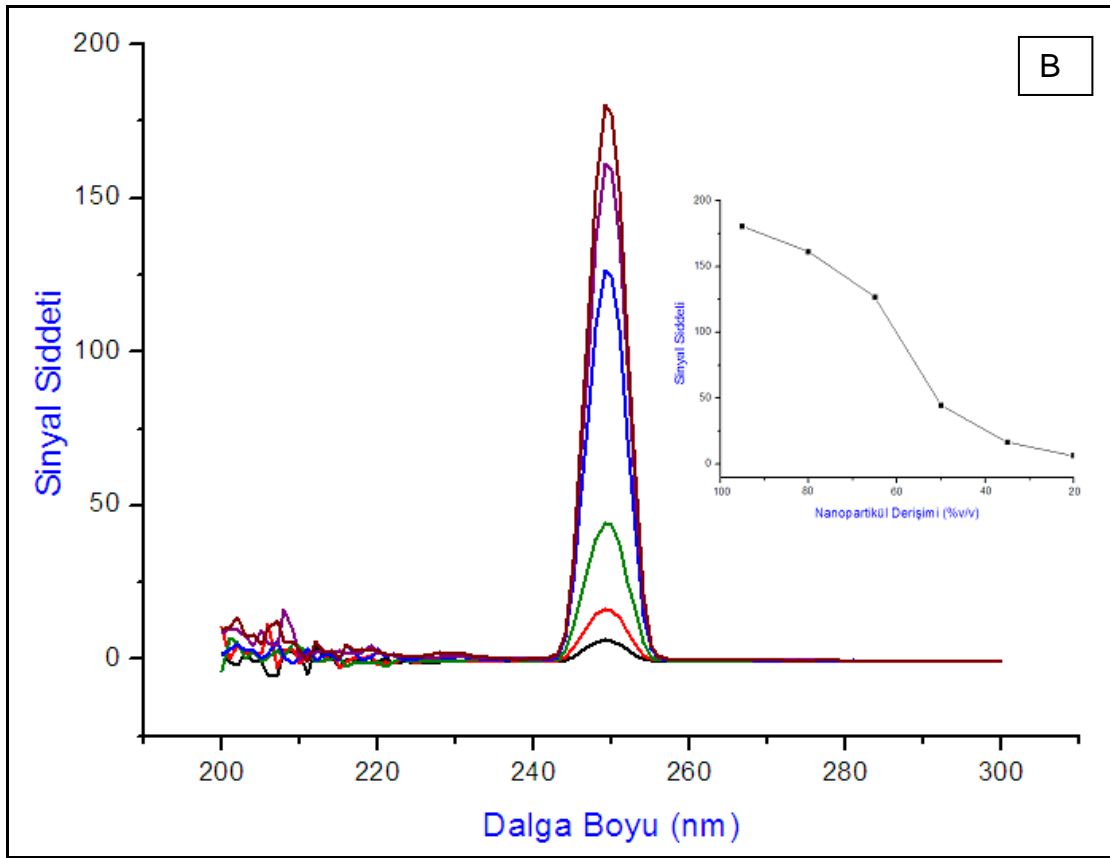
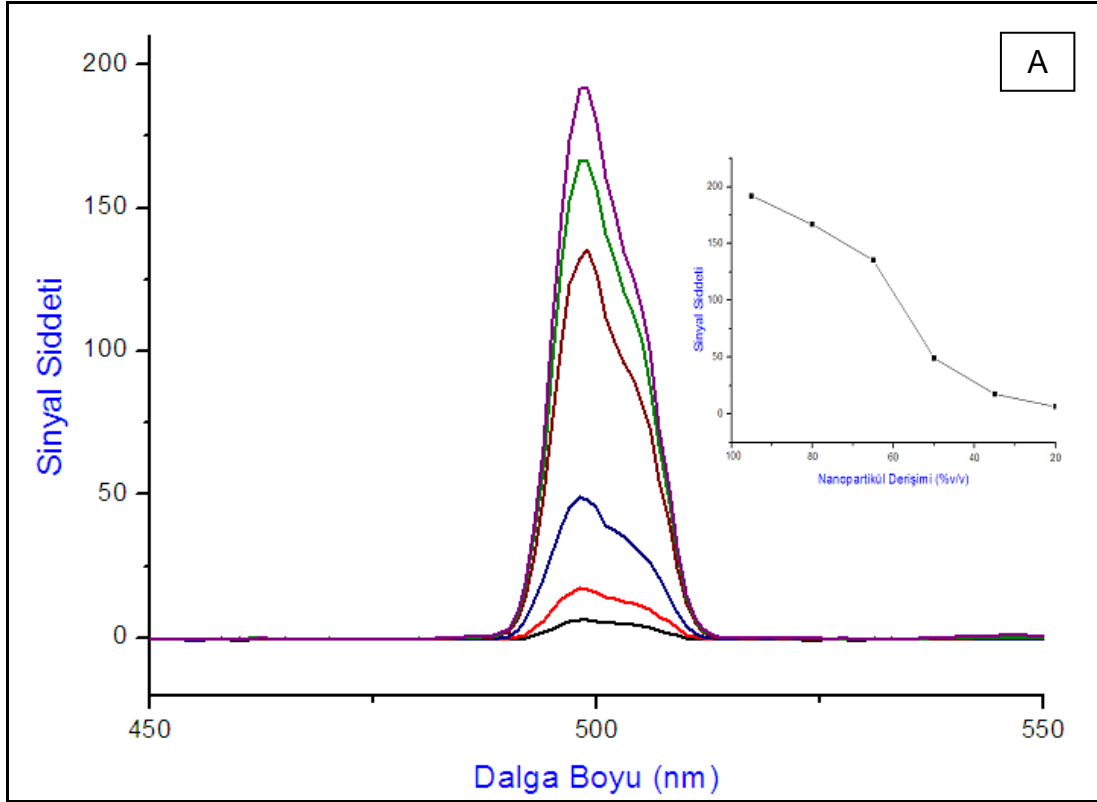
Şekil 4.3. A ve B'de görüldüğü gibi altın nanopartiküllerin küresel şekilde olduğu ve partikül boyu arttıkça partiküllerin bir araya geldiği görülmüştür. Trisodyum sitrat indirgeme ajanının yanı sıra altın nanopartikül stabilizatörü olarak ta kullanılmaktadır. Dolayısıyla sitrat miktarı azaldıkça partikül boyunu arttı ve partiküllerin bir araya

geldiği söylenbilir. Ayrıca sitrat miktarı azaldıkça partiküllerin eş boyutlu olmayıp boy dağılımını gösterdiği de görülmektedir (izelge 4.1).

4.1.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.2.1. Floresan zellikleri

Tez kapsamında üretilen ortalama partikül çapı 13 nm olan küresel altın nanopartiküllerin floresan özelliği incelenmiştir. Floresan özelliklerini incelemek için Floresan spektrofotometre cihazı kullanılmış olup uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 400-600 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu nanopartikül için maksimum emisyon dalga boyu bulunmuştur. Nanopartikül için bulunan emisyon dalga boyu sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 200-300 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılarak emisyon, uyarılma dalga boyları ve floresan sinyal şiddeti değerleri belirlenmiştir. Farklı derişimlerde altın nanopartiküller hazırlayarak derişim ile floresan sinyal şiddetindeki değerimler incelenmiştir. şekil 4.4'de küresel altın nanopartikülün emisyon ve uyarılma dalga boylarına karşılık floresan sinyal şiddeti spektrumları verilmiştir. Ayrıca şekil 4.4 içinde farklı derişimde hazırlanmış altın nanopartiküllerin derişime karşılık floresan sinyal şiddeti grafikleri gösterilmiştir.

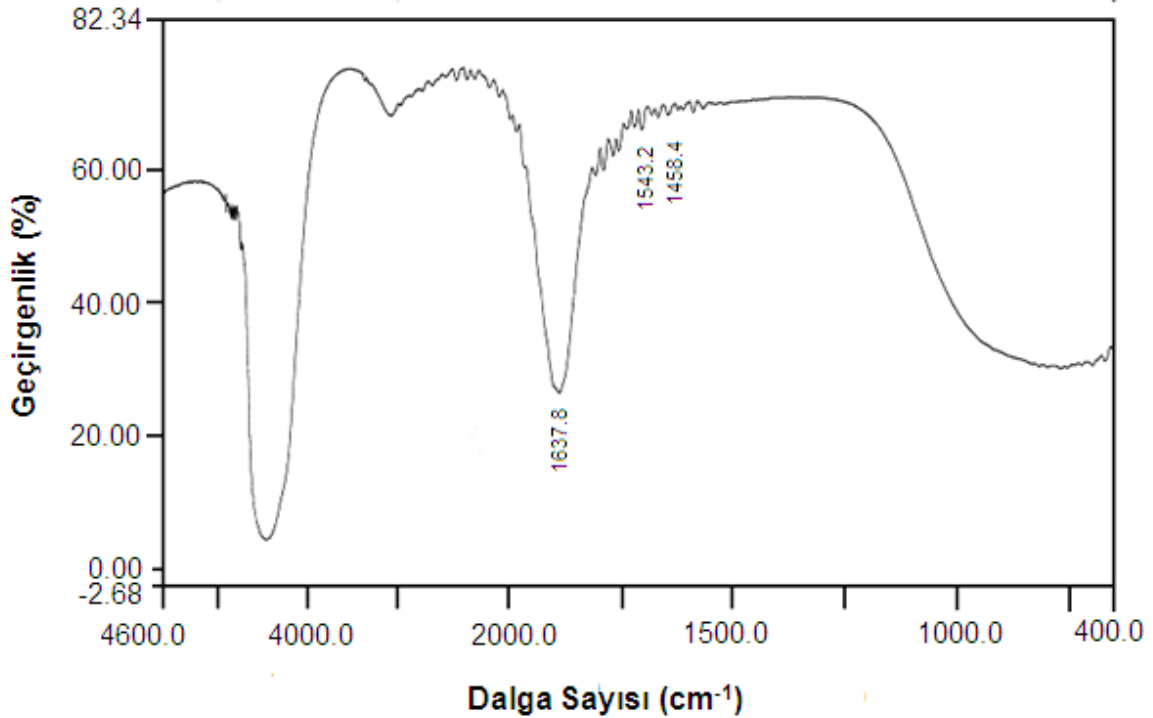


Şekil 4.4. Küresel altın nanopartiküllerin A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları.

Şekil 4.4'de görüldüğü üzere altın nanopartiküller 249 nm'de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Floresan sinyal şiddetlerine bakıldığında altın nanopartiküller 170 civarında bir sinyal şiddeti vermiştir. Altın nanopartiküllerin floresan özellikleri altın nanoçubuklar ile kıyaslandığında; altın nanoçubuklar uzunluğuna bağlı olarak 650 ve 1000 civarında sinyal şiddeti vermişlerdir. Buna göre altın nanoçubukların altın nanopartiküllere göre daha iyi floresan özellik gösterdiği söylenebilir. Ayrıca altın nanopartiküllerin derişimi azaldıkça floresan sinyal şiddeti azalmıştır.

4.1.2.2. FTIR analizi

Altın nanopartiküllerin kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Şekil 4.5'de tipik bir FTIR spektrumu verilmiştir. Spektrumdaki altını temsil eden karakteristik pikler ise Çizelge 4.2'de sunulmaktadır. Şekil 4.5'de görüldüğü gibi indirgeme ajanı olarak kullanılan trisodyum sitrat yapısındaki C=O gerilme titreşimi ve CH₂-O deformasyon ile ilgili karakteristik pikleri 1543 ve 1458 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenmiştir. 1637 cm⁻¹ dalga sayısındaki pik tri sodyum sitrat bileşenlerinden karboksilat gruplarına, 3350 cm⁻¹'deki pik serbest su moleküllerine aittir. FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatürde rapor edilenlerle uyum içindedir (Nghiem, 2010; Li, 2007).



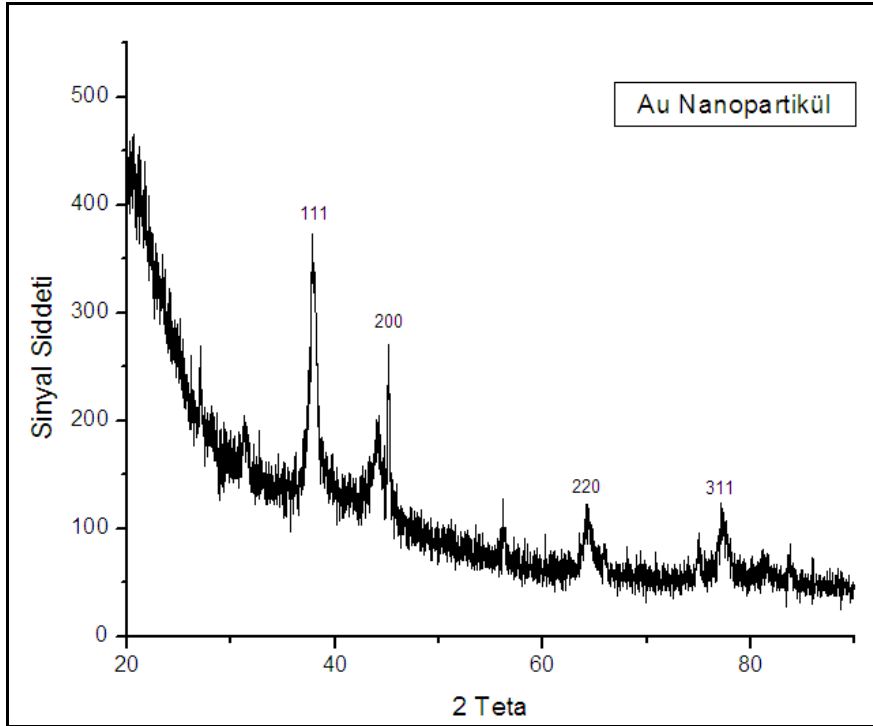
Şekil 4.5. Küresel altın nanopartikül FTIR spektrumu

Çizelge 4.2. Küresel altın nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler

| Dalga Sayısı (cm ⁻¹) | Karakteristik pik |
|----------------------------------|---------------------------------|
| 3550 | OH gerilimi |
| 1637 | Karboksilat grupları |
| 1543 | -CH ₂ –O deformasyon |
| 1458 | -C=O gerilimi |

4.1.2.3. X-Işınları kırılması (X-RD) analizi

Sentezlenen altın nanopartiküllerin kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış ve ilgili spekturum Şekil 4.6'da sunulmuştur. Altın kristalleri için verilmiş ASTM kartları (PDF 98-000-0230) kullanılarak altın kristallerine ait piklerin yerleri belirlenmiştir.

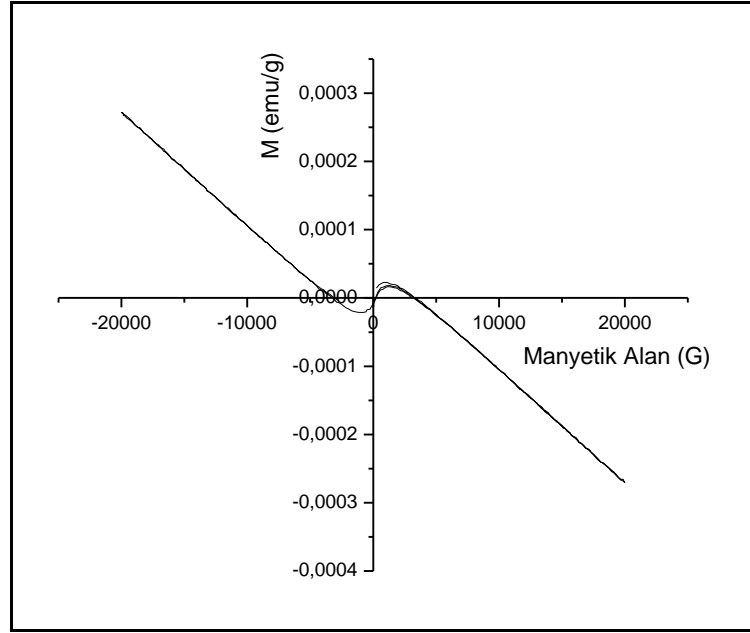


Şekil 4.6. Küresel altın naopartiküllerin tipik bir X-RD spekturumu.

Altın nanopartiküllerin X-RD spektrumundaki piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Altının kristal yapısına özgü (111), (200) (220) ve (311) pikleri sırasıyla 37, 43, 63 ve 77 iki teta değerlerinde gözlenmiştir. Literatürle benzer X-RD karakterizasyon sonuçları elde edilmiştir (Jafari, 2010; Silva, 2010; Mandal, 2005).

4.1.2.4. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında sentezlenen altın nanopartiküllerin manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiştir. Bir manyetik alan içindeki nanoçubukların manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Küresel altın nanopartiküllerin manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi Şekil 4.7'de gösterilmiştir.



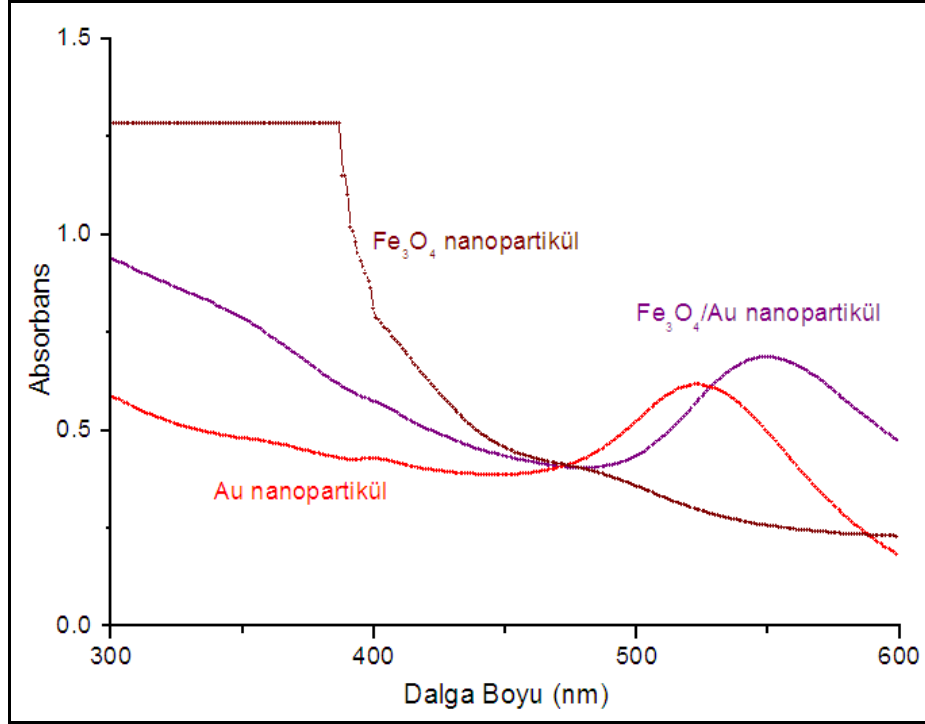
Şekil 4.7. Küresel altın nanopartiküllerin mıknatıslık eğrileri

Şekil 4.7'de görüldüğü üzere sentezlenen küresel altın nanopartiküllerin diyamanyetik etki gösterdiği görülmüştür. Toplam manyetik momenti sıfır veya çok küçük olan atomlar diyamanyetik davranışlar gösterirler. Altın, gümüş, bakır, elmas, grafit, bizmut gibi bazı katılar bu gruba girer. Bir manyetik alana getirilen diyamanyetik bir madde, daima alan şiddetini zayıflatacak biçimde bir etki yapar. Dolayısıyla altın nanopartiküllerin diyamanyetik malzemeler olduğu ve herhangi bir manyetik alana karşı manyetik özellik göstermediği görülmüştür.

4.1.3. Altın Kaplı Manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) Nanopartiküllerin Sentezi

Çekirdek/kabuk ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) yapısındaki nanopartiküllerin sentezi, ilk olarak manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin üretimi daha sonra bunların altın ile kaplanması olmak üzere iki aşamada gerçekleştirilmiştir. Yüksek lisans tez çalışmam sonucu elde ettiğim tecrübe ve deneyimler sonucu manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküller, Fe(II) ve Fe(III) iyonlarının NaOH gibi alkali ortamda çöktürülmesiyle üretilmiştir. İkinci aşamada, 1.2 ml tetrametil amonyum ile stabilize edilmiş okside Fe_3O_4 nanopartikülleri 200 ml deionize su içinde süspansiyon edilip, 0.7 ml 155.2 mM'lık trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek sitrat iyonlarının OH^- iyonları ile değişmesi için 15 dakika sonike edilmiştir. Daha sonra çözelti yüksek karıştırma hızında kaynama noktasına kadar ısıtılmıştır. Çözelti ilk kaynama noktasına ulaştığında etrafını altınla kaplamak için Au^{3+} iyonlarının Fe_3O_4 nanopartiküllerinin etrafında indirgenmesi için 10 ml 10 mM'lık tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ilave edilerek 15 dakika kaynama noktasında karıştırılmıştır. 15 dakika sonra çözelti oda sıcaklığına gelinceye kadar yüksek hızda karıştırmaya devam edilmiştir. Başlangıçta açık sarı olan çözelti rengi en son kırmızı kahve olmuştur. Elde edilen nanopartiküller 10000 rpm'de santrifüjlenerek mıknatıs yardımıyla manyetik olan nanopartiküller ile manyetik olmayanlar birbirinden ayrılmıştır. Bu şekilde manyetik özellik göstermeyen çekirdeğinde manyetit nanopartikülü içermeyen sadece küresel altın nanopartiküller uzaklaştırılmıştır. Bu işlem birkaç defa tekrarlanmıştır. Daha sonra altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri altın kaplı olanlardan ayırmak için her ikisi de manyetik özellik göstermesi nedeniyle manyetik ayırma yapılamamıştır. Literatürde altın ile kaplanmamış manyetit nanopartikülleri ayırmak için 1 M HCl çözeltisi ile yıkayıp birkaç kez de su ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir (Cui, 2005). Ancak Liu ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartiküllerin 2 M ve üzeri HCl çözeltisi içinde stabilitesini incelemişlerdir. Yapılan çalışma sonucu hem manyetit nanopartiküllerin hem de altın kaplı manyetik nanopartiküllerin derişik asit çözeltisi içinde hemen çözüldüğünü belirtmişlerdir (Liu, 2008). Bu nedenle altın kaplı olmayan manyetit nanopartikülleri kaplı olanlardan ayırmak için karışım 0.02 M'lık okzalat çözeltisinde 1 saat mekanik karıştırılmıştır. Okzalat çözeltisi içerisinde sadece manyetit nanopartiküllerin çözüldüğü literatürde belirtilmiştir (Goon, 2008). Tekrar su ile santrifüjleme işlemi yapılarak süpernatant kısmında çözülmüş manyetit nanopartiküllerin olması nedeniyle çöken kısımda altın kaplı manyetik nanopartiküller

mıknatis yardımıyla ortamdan uzaklaştırılmıştır. Şekil 4.8’de altın nanopartikül, manyetit (Fe_3O_4) nanopartikül ve sentezlenen altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu birlikte verilmiştir.



Şekil 4.8. Altın kaplı manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

Şekil 4.8’de altın nanopartikülü 522 nm dalga boyunda absorpsiyon verirken manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülün herhangi bir dalga boyunda absorpsiyon vermediği gözlenirken manyetit nanopartiküllerin altınla kaplanması sonucu elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülünün 547 nm dalga boyunda absorpsiyon verdiği gözlenmiştir. Dolayısıyla buna dayanarak manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplandığı söylenebilir.

Altın tuz miktarı oluşturulan manyetik altın kaplı nanopartiküllerin etrafındaki altın kabuk kalınlığını etkilemektedir. Bu nedenle yukarıdaki deneysel prosedür aynen uygulanarak HAuCl_4 miktarı 10, 15 ve 20 mM olacak şekilde üç farklı nanopartikül sentezi gerçekleştirilmiştir. HAuCl_4 miktarının partikül boyuna ve plasmon özelliğine olan etkileri incelenmiştir. Ayrıca ortalama partikül boyu 40 ve 90 nm olan Fe_3O_4

nanopartikülü kullanılarak iki farklı boyutta manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) sentezlenerek partikül boyu ve plasmon özellikleri Çizelge 4.3'de gösterilmiş olup elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumları Şekil 4.9'da verilmiştir.

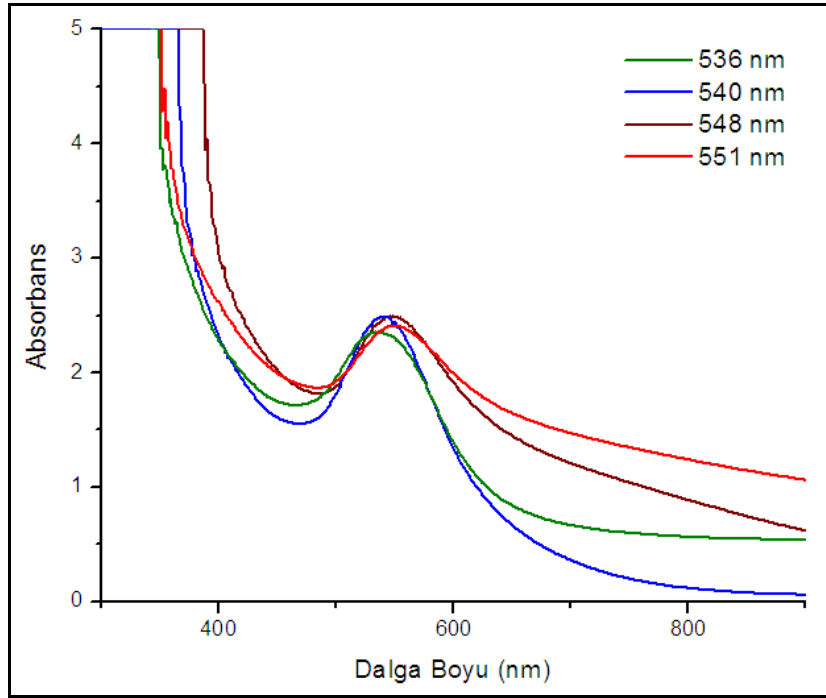
Çizelge 4.3. Farklı HAuCl_4 miktarında ve farklı ortalama partikül çapında manyetit (Fe_3O_4) ile üretilen $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin özellikleri.

| Örnek No | Fe_3O_4 çapı (nm) | $[\text{HAuCl}_4]$ mM | λ_{max} (nm) | Ortalama Partikül çapı (nm) | Heterojenlik İndeksi (PI) | Zeta Potansiyeli (mV) |
|----------|-----------------------------------|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 1 | 40 | 10 | 536 | 87 | 1.328 | -34.3 |
| 2 | 40 | 15 | 540 | 125 | 1.527 | -30.7 |
| 3 | 40 | 20 | 548 | 147 | 1.457 | -24.6 |
| 4 | 90 | 10 | 551 | 175 | 1.580 | -31.8 |

Çizelge 4.3'de görüldüğü gibi dört farklı $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü sentezlenmiştir. Bunlardan ilk üçünde ortalama partikül çapı 40 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülü kullanılarak (yukarıdaki deney prosedürü aynen uygulanmış olup) sadece altın tuz $[\text{HAuCl}_4]$ miktarı değiştirilmiştir. Altın tuz miktarı arttıkça partikül boyunun arttığı dolayısıyla plasmon dalga boyunda arttığı (sağa kaydığı) görülmüştür. Altın tuzu derişimi 10 mM iken ortalama partikül çapı 87 nm, 20 mM iken 147 nm çapında $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü elde edilmiştir. 87 nm çapındaki $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü 536 nm dalga boyunda plasmon verirken 147 nm çapındaki nanopartiküller 548 nm dalga boyunda absorpsiyon vermiştir (Şekil 4.9).

Ortalama partikül çapı 90 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülü ile elde edilen altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikülün çapı 175 nm ölçülmüş olup 551 nm dalga boyunda absorpsiyon verdiği görülmüştür. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerinin negatif yüklü olduğu ve -34.3 ile -31.8 mV aralığında zeta potansiyel ölçülmüştür.

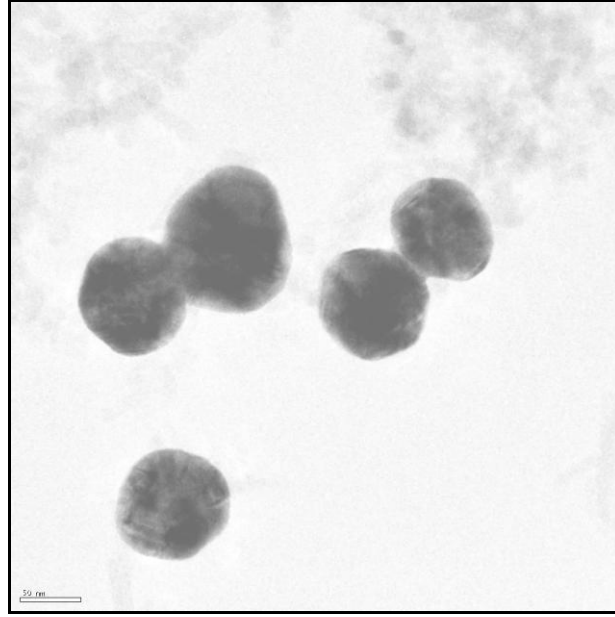
$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküller boyuna bağlı olarak farklı optik özellikler göstermeleri nedeniyle Şekil 4.9'da üretilen altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir.



Şekil 4.9. Fe₃O₄/Au nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Fe₃O₄/Au nanopartiküller sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermektedirler. Şekil 4.9'da görüldüğü gibi Fe₃O₄/Au nanopartiküllerin partikül çapı arttıkça radyal plasmon dalga boylarında arttığı görülmüştür (Çizelge 4.3).

Yapılan çalışmalar sonucu Çizelge 4.3'deki 1 nolu örneğin TEM görüntüsü Şekil 4.10'da verilmiştir. Şekil 4.10'da görüldüğü gibi Fe₃O₄/Au nanopartiküllerin küresel şekilde olduğu ve birkaç tane çekirdek/kabuk yapısında yapıların olduğu görülmektedir. Çekirdek kısmındaki manyetit (Fe₃O₄) nanopartiküllerden birkaç tane bulunduğu görülmekte olup Fe₃O₄/Au nanopartikülün ortalama partikül boyu 87 nm olarak ölçülmüştür. Çekirdek kısmını oluşturan manyetit nanopartiküllerin ortalama partikül çapı Zeta-Sizer ile 40 nm olarak ölçülmüş olup, aslında bunların 40 nm olmayıp daha küçük partikül çapında olduğu görülmüştür.

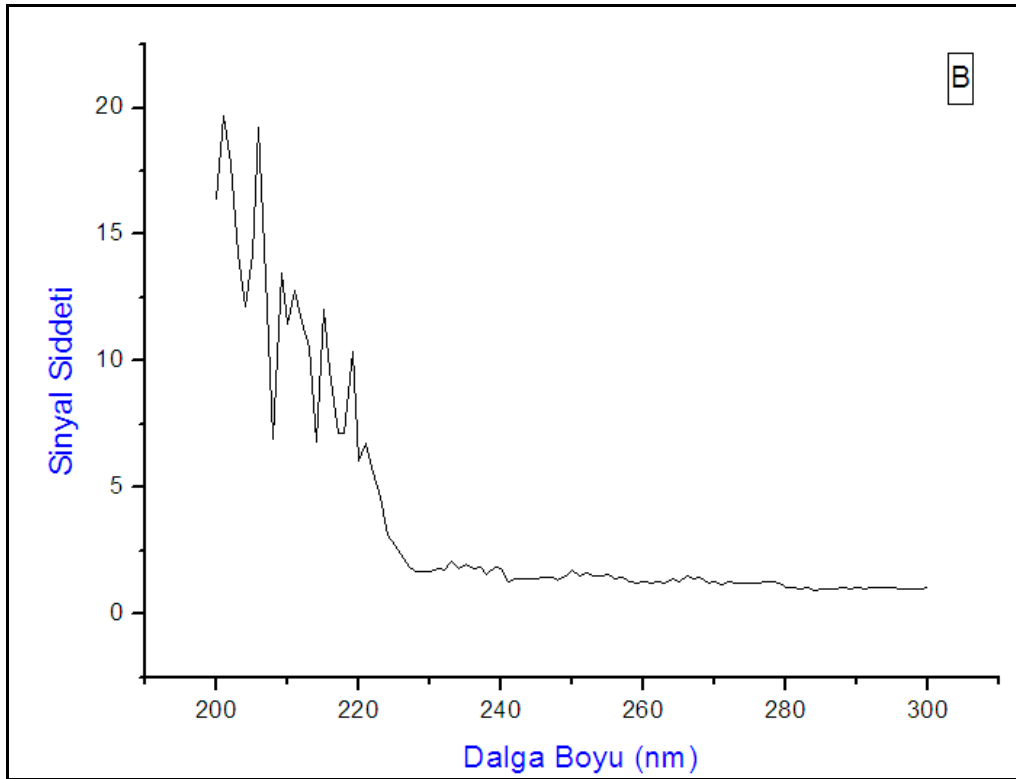
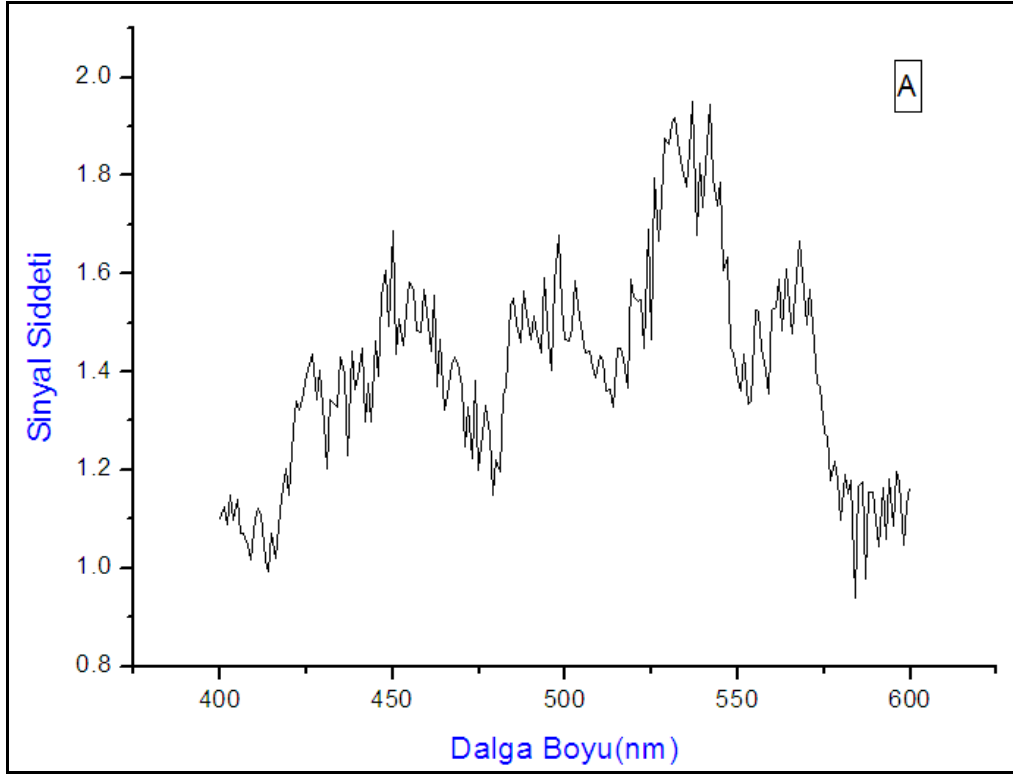


Şekil 4.10. Altın kaplı manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikülün AFM görüntüsü (skala bar 50 nm'dir).

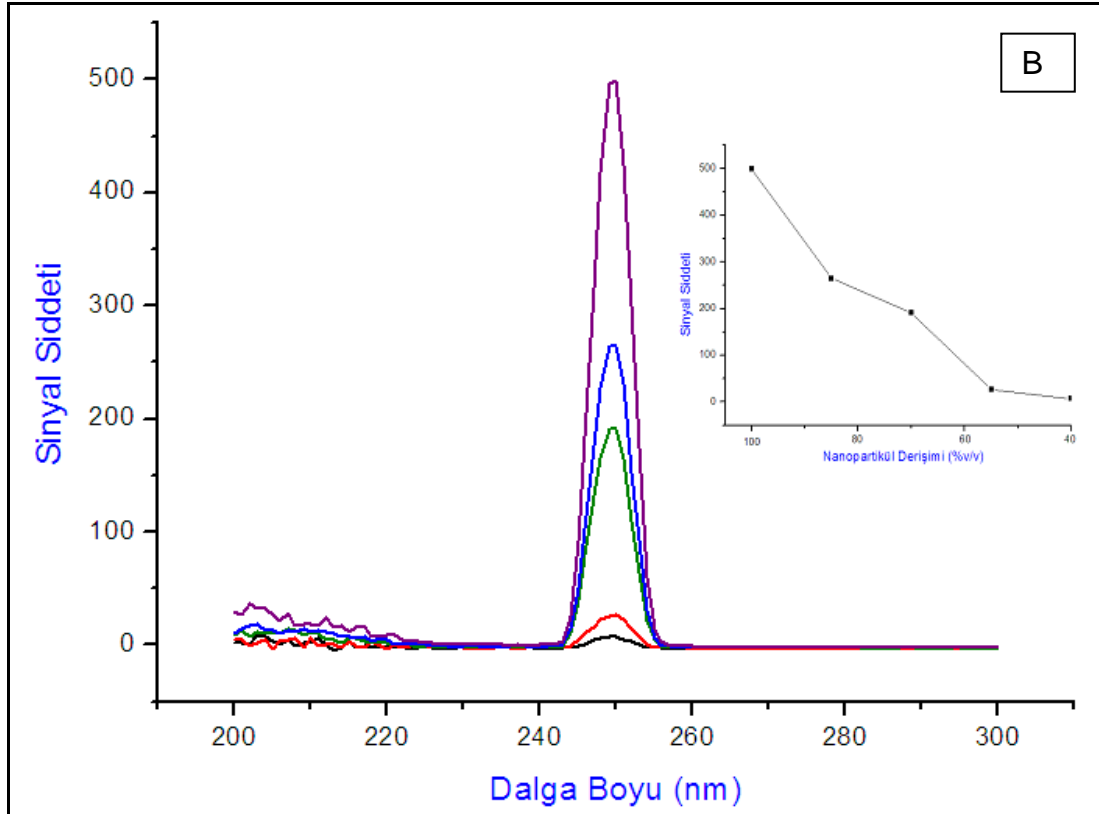
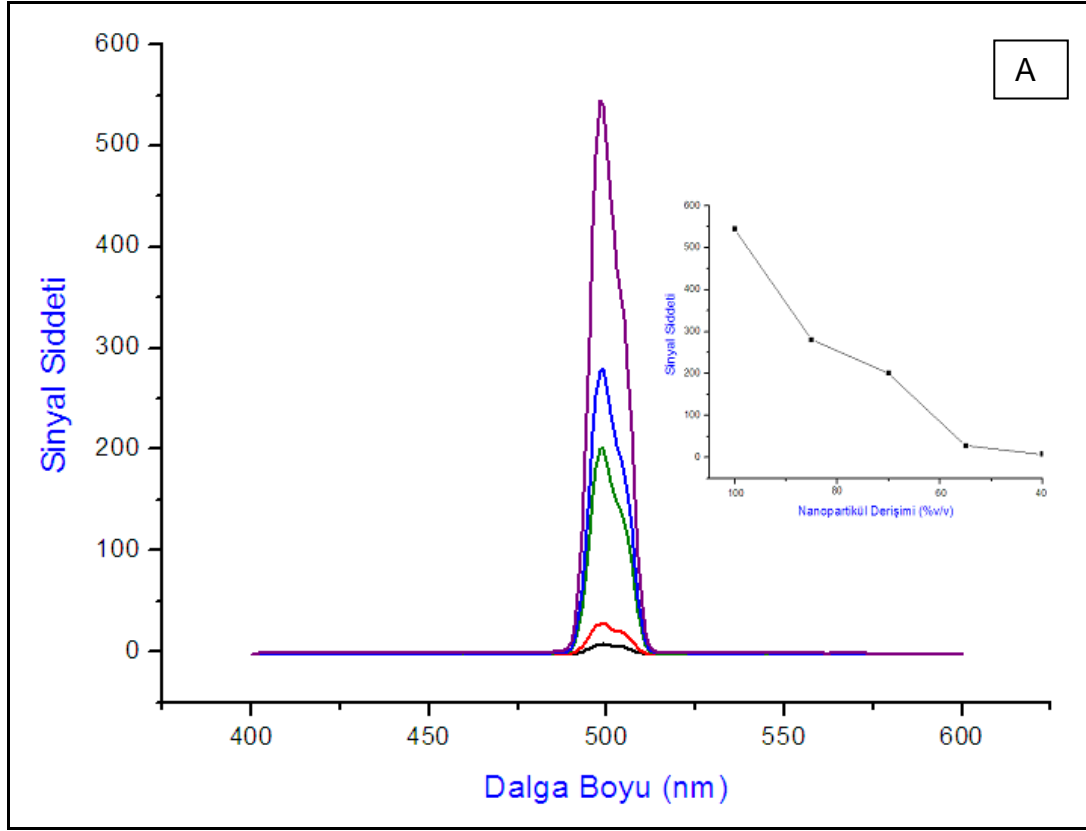
4.1.4. Altın Kaplı Manyetit ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.4.1. Floresan özellikleri

Tez kapsamında altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin floresan özelliği incelenmiştir. Floresan özelliklerini incelemek için Floresan spektrofotometre cihazı kullanılmış olup uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 400-600 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu nanopartikül için maksimum emisyon dalga boyu bulunmuştur. Nanopartikül için bulunan emisyon dalga boyu sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 200-300 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılarak emisyon, uyarılma dalga boyları ve floresan sinyal şiddeti değerleri belirlenmiştir. Farklı derişimlerde altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküller hazırlayarak derişim ile floresan sinyal şiddetindeki değişimler incelenmiştir. Şekil 4.11 A ve B'de Fe_3O_4 nanopartiküllerinin emisyon ve uyarılma dalga boylarına karşılık floresan sinyal şiddeti spektrumları, Şekil 4.12 A ve B'de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülünün emisyon ve uyarılma dalga boylarına karşılık floresan sinyal şiddeti spektrumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.12 A ve B içinde farklı derişimde hazırlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin derişime karşılık floresan sinyal şiddeti grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Fe₃O₄ nanopartikülün A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları.



Şekil 4.12. Altın kaplı manyetik (Fe₃O₄/Au) nanopartiküllerin A) emisyon B) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları.

Şekil 4.12’de görüldüğü üzere altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküller 249 nm’de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Floresan sinyal şiddetlerine bakıldığında $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküller 500 civarında bir sinyal şiddeti verirken küresel altın nanopartiküller 170 civarında sinyal şiddeti vermişlerdir. Buna göre $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin altın nanopartiküllerden daha iyi floresan özellik gösterdiği söylenebilir. Ayrıca Şekil 4.11. A ve B’ye bakıldığında manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllerin herhangi bir floresan özellik göstermediği belirlenmiştir. Bunların altın ile kaplanmasından sonraki floresan özellikleri etrafındaki altın kabuktan kaynaklanmaktadır. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerinin floresan özellik göstermelerine dayanarak manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplandığı söylenebilir.

Şekil 4.12 içinde farklı derişimlerde hazırlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin derişime karşı floresan sinyal şiddeti grafikleri verilmiştir. Şekil 4.12’den görüldüğü gibi $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin derişimi azaldıkça floresan sinyal şiddeti azalmıştır.

4.1.4.2. FTIR analizi

Araştırma kapsamında manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) kurutma sonrası FTIR spektrumları çekilmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin FTIR spektrumları sırasıyla Şekil 4.13’ A ve B’de verilmiştir. Karakterize edilen nanopartiküllerin FTIR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri Çizelge 4.4 ve 4.5’de sunulmaktadır.

Çizelge 4.4. Manyetit nanopartiküllerinin FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikler

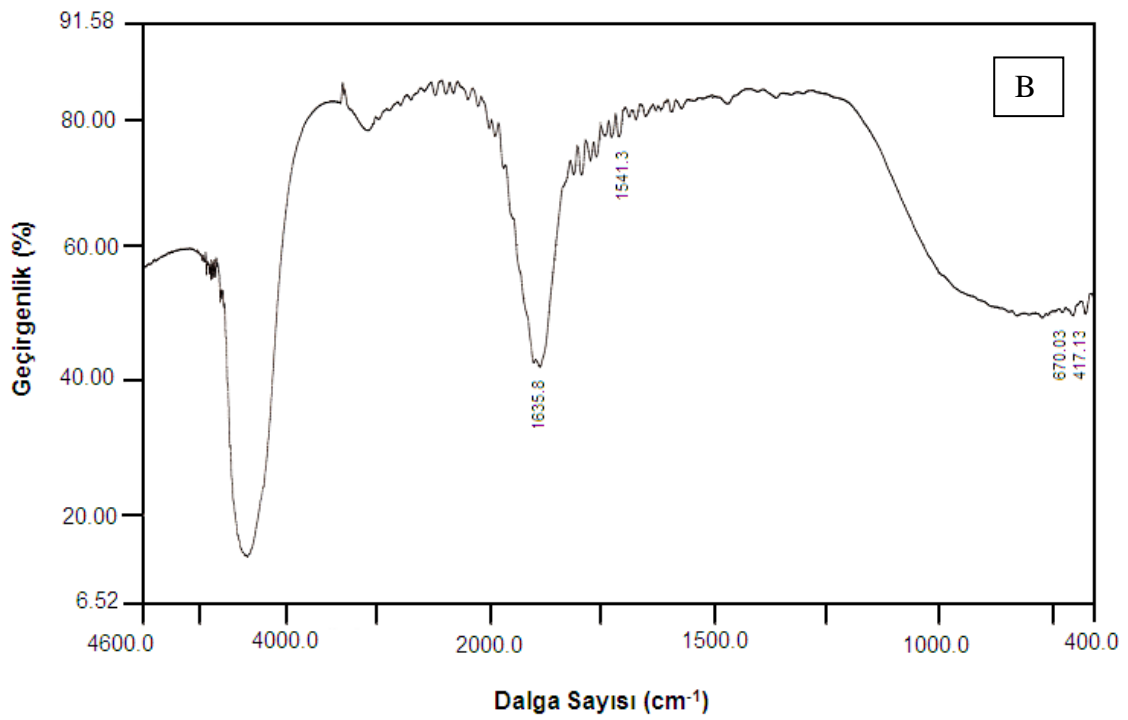
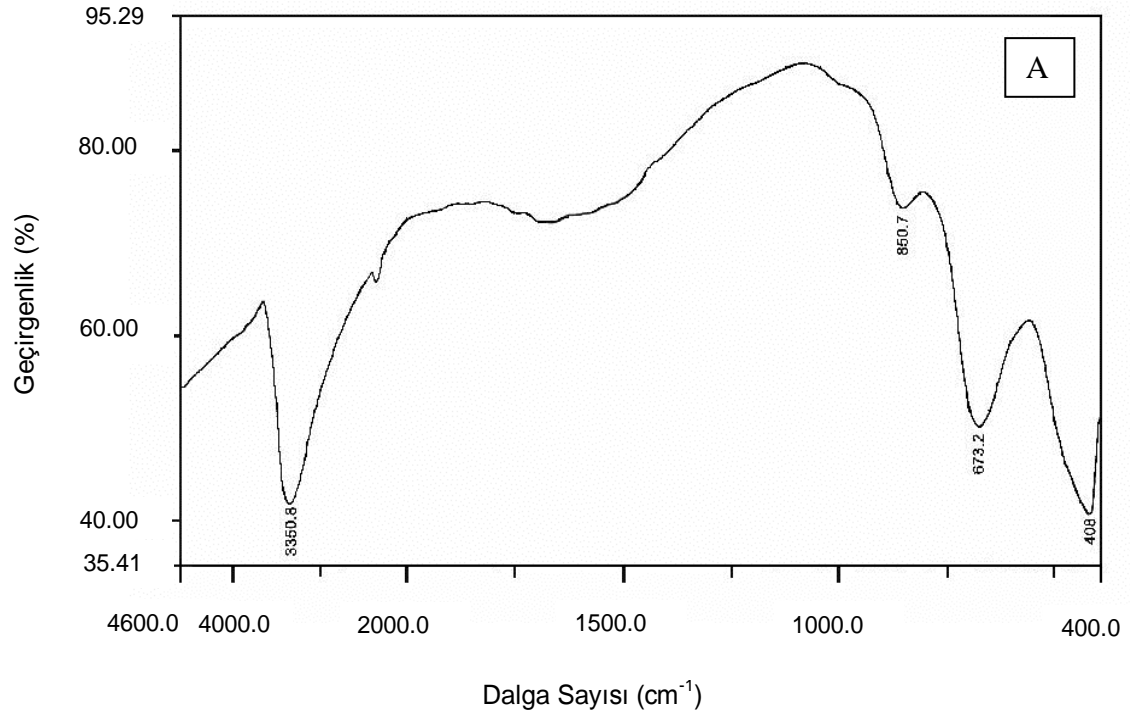
| Dalga Sayısı (cm^{-1}) | Karakteristik Pik |
|-----------------------------------|----------------------------|
| 3350 | OH^- piki |
| 673 | Fe-O gerilme titreşim modu |
| 408 | Fe-O gerilme titreşim modu |

Şekil 4.13' A'da görüldüğü gibi Fe-O gerilme titreşimi ile ilgili karakteristik pik grupları 673 ve 408 cm^{-1} dalga sayısında gözlenmiştir. Bu pikler manyetit oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O gerilimini gösteren manyetit karakteristik pikleridir. 3350 cm^{-1} 'deki pik serbest su moleküllerine aittir. FTIR spektrumunda elde edilen karakteristik pikler literatürde rapor edilenlerle uyum içindedir [Deb, P; 2001].

Çizelge 4.5. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) FTIR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.

| Dalga Sayısı (cm^{-1}) | Karakteristik pik |
|-----------------------------------|-------------------------------------|
| 3383 | OH gerilimi |
| 1635 | Karboksilat grupları |
| 1541 | $-\text{CH}_2-\text{O}$ deformasyon |
| 670.02 | Fe-O gerilimi |
| 417.13 | Fe-O gerilimi |

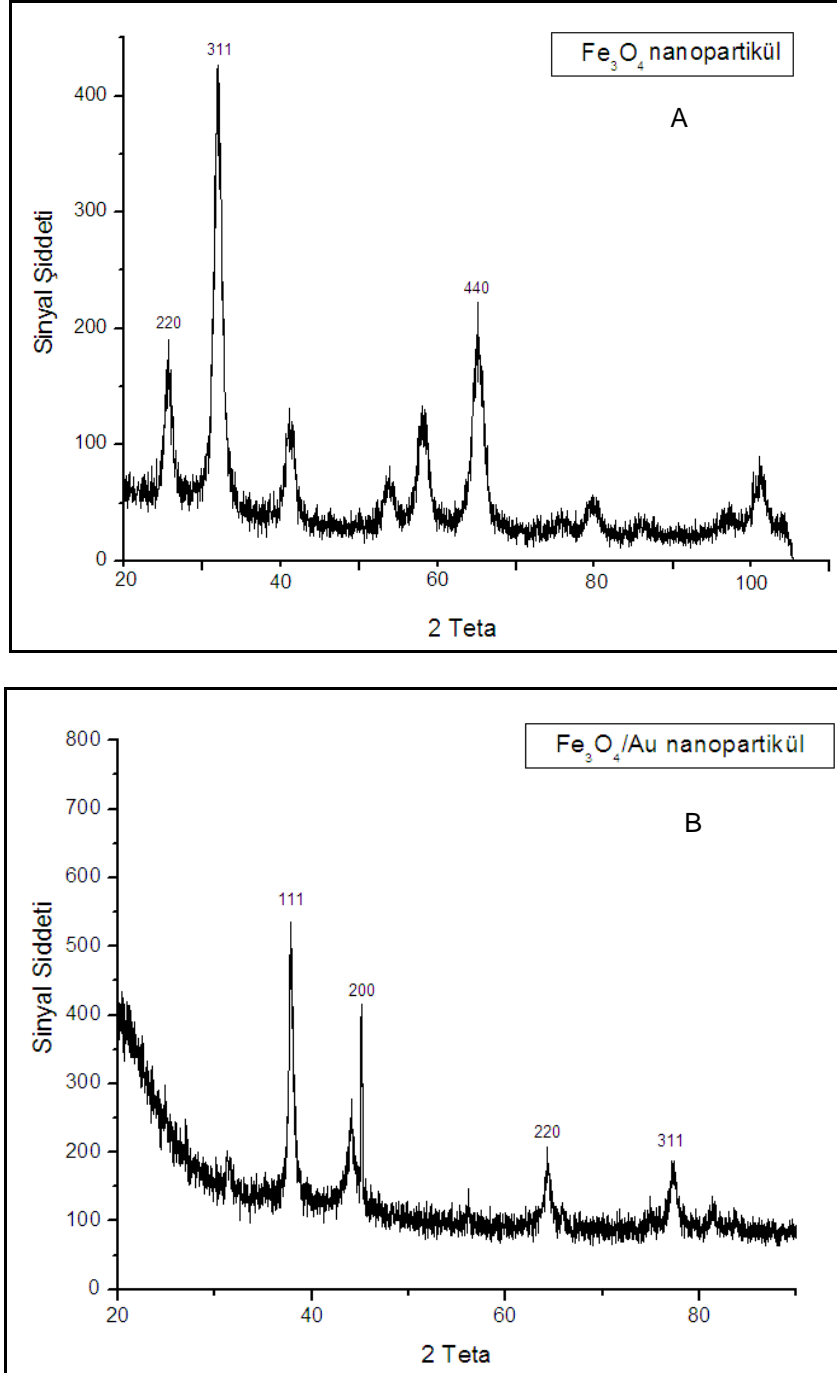
Şekil 4.13 B'de görüldüğü gibi altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) FTIR spektrumunda 670 cm^{-1} ve 417 cm^{-1} dalga sayılarında pik görülmektedir. Bu da manyetit 673 cm^{-1} ve 408 cm^{-1} dalga sayılarında oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O geriliminden kaynaklanmaktadır. FTIR spekturumuna dayanarak altın kaplı manyetik nanopartiküllerin yapısında manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllere özgü karakteristik piklerin görülmesi nedeniyle yapı içerisinde manyetit nanopartiküllerin olduğu söylenebilir. Literatürde 670 cm^{-1} ve 400 cm^{-1} dalga sayısı arasındaki piklerin Fe-O gerilim piki olduğu belirtilmiş olup literatür ile benzer sonuçlar elde edilmiştir (Mandal, 2005). 1635 ve 1541 cm^{-1} dalga sayısındaki pikler sırasıyla manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanmasında indirgeyici ajan olarak kullanılan trisodyum sitrat yapısındaki karboksilat gruplarına ve trisodyum sitrat yapısındaki CH_2-O deformasyonuna ait piklerdir.



Şekil 4.13. FTIR spekturumları: (A) Manyetit nanopartikül (Fe₃O₄); B) Altın kaplı manyetik nanopartikül (Fe₃O₄/Au)

4.1.4.3. X-Işını kırılması analizi

Sentezlenen manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış ve ilgili spekturumlar sırasıyla Şekil 4.14 A ve B'de sunulmuştur.

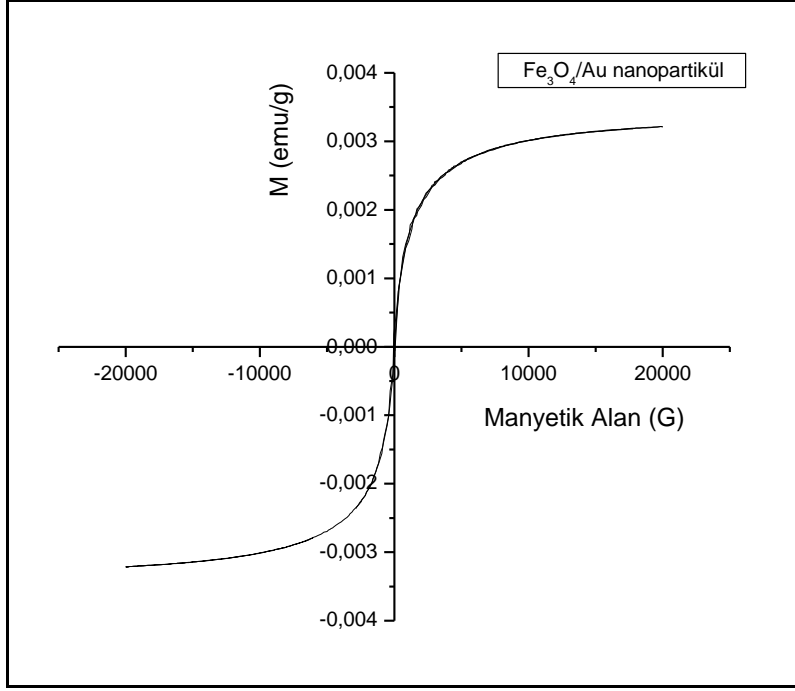


Şekil 4.14. X-RD spekturumları: (A) Manyetit nanopartikül (Fe_3O_4); B) Altın kaplı manyetik nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$)

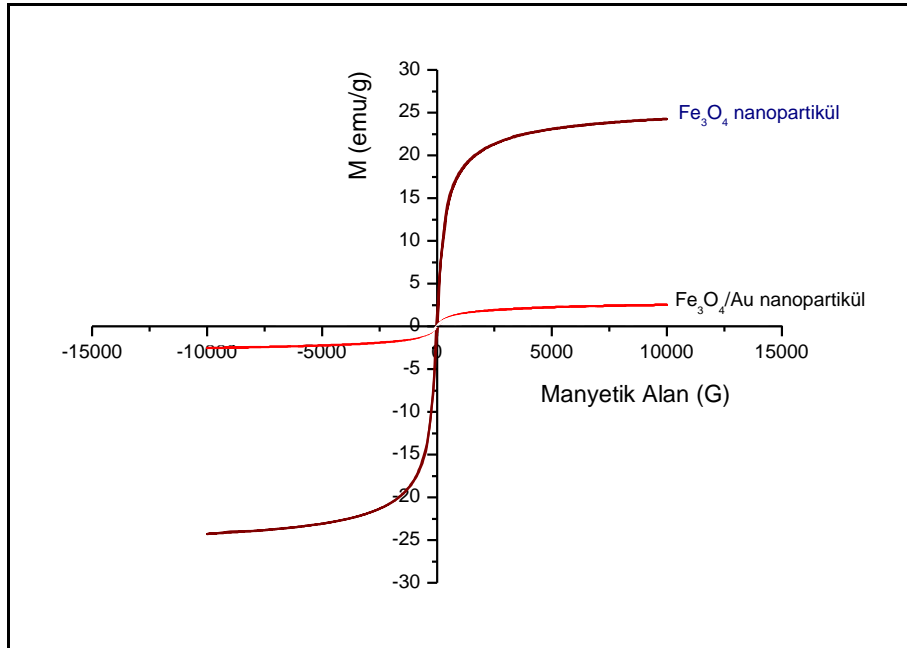
Şekil 4.14 A'da görüldüğü gibi 30, 35 ve 62 iki teta değerlerinde manyetit nanopartikülleri sırasıyla (220), (311) ve (440) kristal yapısına özgü karakteristik piklerini göstermektedir (Pita, 2008). Bu nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu elde edilen nanopartiküllerin X-RD spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.14 B), 37, 43, 63 ve 77 iki teta değerlerinde (111), (200), (220) ve (311) altının kristal yapısına özgü pikler elde edilmiştir. 37, 43 ve 77 iki teta değerlerinde manyetit nanopartikülleri herhangi bir pike sahip değilken altın ile kaplanması sonucu bu teta değerlerinde altının kristal yapısına özgü pikler gözlemlenmiştir. Dolayısıyla altın kaplı manyetik nanopartiküllerin (Fe_3O_4/Au) manyetit nanopartiküllerin kristal yapısına özgü piklerin görülmemesi nedeniyle manyetit nanopartiküllerin yüzeyinin tamamen altın ile kaplandığı söylenebilir. Liu ve arkadaşları manyetit nanopartikülleri farklı kalınlıkta altın ile kaplayarak X-RD ile kristal yapılarını incelediklerinde manyetit nanopartikülleri çok ince altın ile kaplandığında manyetite özgü pikler gözlemlenmişlerdir. Çok ince kabuk kalınlığında X-ray ışınlarının çekirdekte bulunan manyetit nanopartiküllere kadar nüfuz ettiğini dolayısıyla X-RD spektrumunda manyetite özgü (220) ve (311) piklerinin gözlemlendiğini belirtmişlerdir. Kalın bir tabaka altın ile kaplandığında ise manyetite özgü piklerin olmadığını ve kaplamasının yeterli olduğunu ifade etmişlerdir (Liu, 2008). Dolayısıyla altın kaplı manyetik nanopartiküller için elde ettiğimiz X-RD spektrumunda manyetite özgü pikler görülmediğinden kabuk kalınlığının kalın ve kaplamanın gerçekleştiği söylenebilir. Literatürle benzer sonuçlar elde edilmiştir (Jafari, 2010; Silva, 2010; Mandal, 2005).

4.1.4.4. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında sentezlenen manyetik nanopartiküllerinin manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiştir. Bir manyetik alan içindeki partiküllerin manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Şekil 4.15'de altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerinin manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi gösterilmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün manyetik özelliği ile etrafının altın kaplanması sonucu manyetik özelliğinin kolay karşılaştırılabilmesi amacıyla Şekil 4.16'da manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü ile altın kaplı manyetik nanopartikülünün manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi birlikte gösterilmiştir.



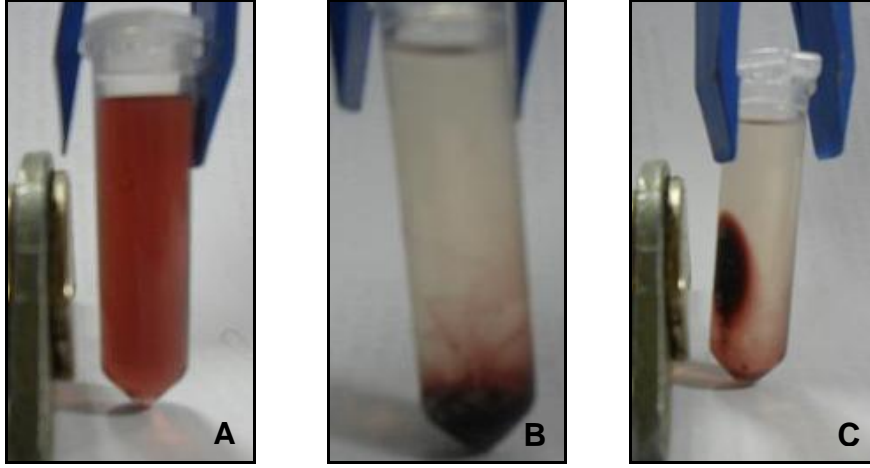
Şekil 4.15. Altın kaplı manyetik (Fe₃O₄/Au) nanopartikülünün mıknatıslık eğrisi



Şekil 4.16 Manyetit (Fe₃O₄) ve altın kaplı manyetik (Fe₃O₄/Au) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri.

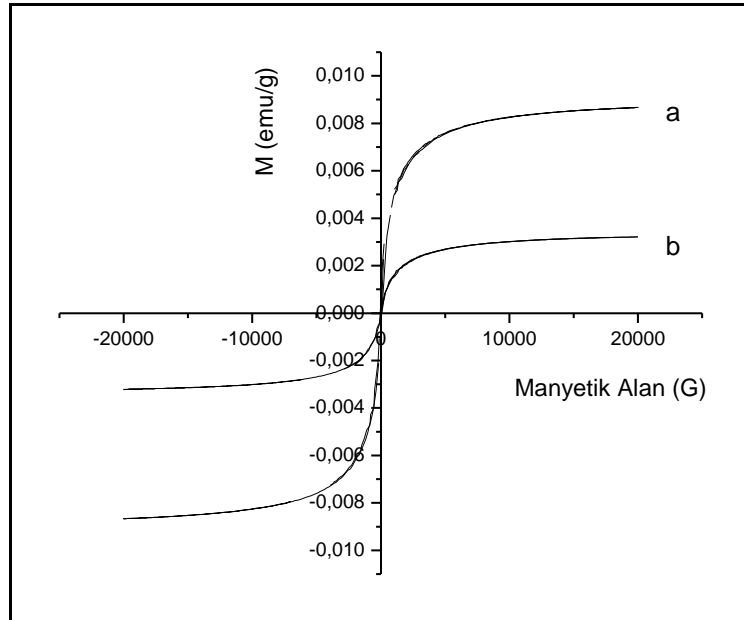
Şekil 4.16'da görüldüğü gibi manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı gösterirken altın kaplı manyetik nanopartikülü (Fe_3O_4 /Au) ise 10000 Gauss manyetik alanda 0.003 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı göstermektedir. Manyetit nanopartiküllerinin altın ile kaplanması sonucu doyunluk mıknatıslığının azaldığı görülmüştür. Dolayısıyla manyetit nanopartiküllerin etrafının altınla kaplanmasının manyetik özelliğini azalttığı söylenebilir. Jeong ve arkadaşları maghemit nanopartiküllerini altın ile kaplamadan önce 10000 (Oe) manyetik alanda 36.8 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı gösterirken altın ile kaplandıktan sonra 10000 (Oe) manyetik alanda 1.08 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı ölçmüşlerdir. Manyetik özellik gösteren nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu manyetik özelliğin azaldığını rapor etmişlerdir (Jeong, 2006). Jafari ve arkadaşları ters misel yöntemiyle 9-16 nm boyutundaki manyetit nanopartikülleri 2 nm kalınlığında altın ile kaplamışlardır. Altın ile kaplama sonucu doyunluk mıknatıslığının altın kabuk kalınlığının ince olması nedeniyle az azaldığı rapor edilmiştir (Jafari, 2010). Buna dayanarak manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu doyunluk mıknatıslığının çok azalmasına göre ürettiğimiz nanopartiküllerin etrafındaki altın kabuk kalınlığının büyük olduğu söylenebilir. Ayrıca Sun ve arkadaşları altın kaplı manyetik nanopartikülleri sentezleyip PEI ile modifiye etmişlerdir. Elde ettikleri nanopartiküllerin PEI ile modifiye edilmesi sonucu doyunluk mıknatıslığının azaldığını belirtmişlerdir (Sun, 2010).

Manyetit nanopartikülü, manyetik alana karşı mıknatıslık eğrisinde histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmektedir. Ayrıca bu nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucunda elde edilen manyetik yüklü altın nanopartiküllerinde histerisis eğrisi göstermemesinden süperparamanyetik özelliğini devam ettirdiği gözlenmiştir. Sentezlenen altın kaplı manyetik nanopartikül süspansiyonu herhangi bir manyetik alana cevap vermezken santrifüjlenip çöktürüldükten sonra uygulanan manyetik alana cevap vermektedir. Şekil 4.17'de Fe_3O_4 /Au nanopartikül süspansiyonunun çöktürülmeden ve çöktürüldükten sonraki manyetik özelliği gösterilmiştir.



Şekil 4.17. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül süspansiyonunun A) çöktürülmeden önceki B) santrifüleme ile çöktürülmesi C) çöktürüldükten sonraki manyetik özelliği.

Ayrıca tez kapsamında farklı boydaki manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu elde edilen nanopartiküllerin manyetik özelliklerindeki değişimi incelemek amacıyla ortalama 40 ve 90 nm boyuna sahip manyetit nanopartikülleri aynı yöntemle altınla kaplanmıştır. Şekil 4.18'de farklı boydaki manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu elde edilen nanopartiküllerin manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi gösterilmektedir.



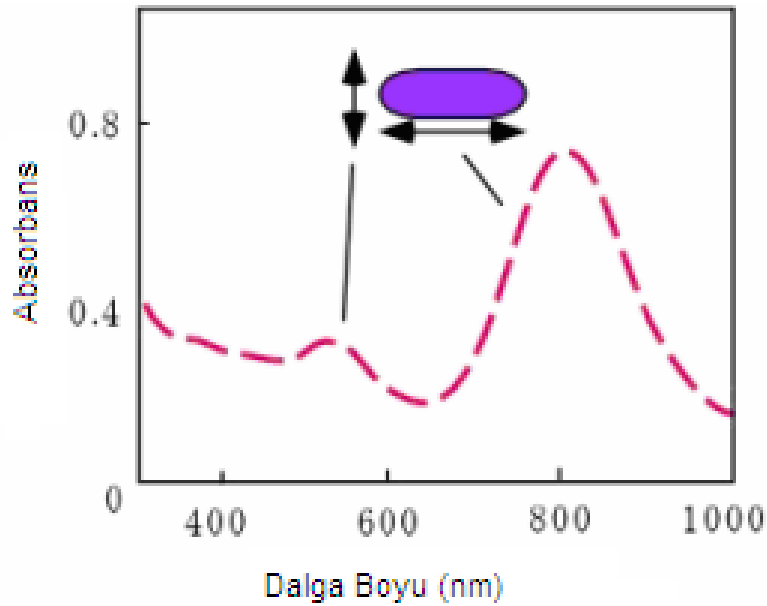
Şekil 4.18. Farklı boyda manyetit (Fe_3O_4) içeren altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerinin mıknatıslık eğrileri a) 90 nm manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül b) 40 nm manyetit içeren altın kaplı manyetik nanopartikül

Bir manyetik partiküldeki manyetik momentlerin hepsi uygulanan alan yönünde yönlendiğinde ölçülen toplam manyetik moment sabit kalır. Bu noktaya doyunluk, bu noktada ölçülen manyetik momente doyunluk mıknatıslığı, doyunluğa ulaşıldığındaki alan doyunluk manyetik alanı olarak tanımlanmaktadır. Şekil 4.18'de görüldüğü gibi 40 nm çapında manyetit içeren Fe_3O_4/Au nanopartikülü 20000 Gauss manyetik alanda 0.0030 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı gösterirken 90 nm çapında manyetit içeren Fe_3O_4/Au nanopartikülü 20000 Gauss manyetik alanda 0.0090 emu/g (Ms) doyunluk mıknatıslığı göstermiştir. Manyetik özellik kazandıran çekirdek de bulunan manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün boyunun artmasıyla doyunluk mıknatıslığının üç kat arttığı görülmüştür. İlgili literatürde partikül boyunun artmasıyla partikül içindeki manyetik birimlerin sayısının artması nedeniyle doyunluk mıknatıslığının arttığı belirtilmiştir (Liu ve ark., 2002).

Ayrıca her iki nanopartikülünde histerisis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği düşünülmektedir.

4.1.5. Altın Nanoçubukların Sentezi

Altın nanoçubuklar, Şekil 4.19’ da gösterildiği gibi iki farklı plasmon rezonansı göstermektedir. Transverse plasmon (TP) nanoçubuğun çapı boyunca uyarılmasına bağlı olarak gösterdiği küresel altın kolloidlerin plasmon rezonansına benzer rezonanstır. Diğer longitudinal plasmon (LP) denilen nanoçubuğun uzunluğu boyunca uyarılması sonucu oluşan plasmon rezonansıdır. Nanoçubukların uzunluk/çap oranı denilen “aspect ratio” değeri değiştikçe plasmon rezonans pikleride değişmektedir. Böylece farklı uzunluk ve çap oranındaki altın nanoçubuklarla görünürden yakın infrarede kadar plasmon rezonans gösteren altın nanoçubuklar elde edilebilmektedir. Uzunluk/çap oranına bağlı olarak farklı optik özellik gösteren altın nanoçubukların bu özelliklerinin kullanıldığı birçok uygulama alanı bulunmaktadır.



Şekil 4.19. Altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

Bu bölümde farklı uzunluk/çap oranında altın nanoçubukların üretilmesi ve uzunluk/çap oranına bağlı optik özelliklerindeki değişim incelenmiştir. Üretilen altın nanoçubukların nanotıp uygulamalarında kullanılmak üzere karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

Altın nanoçubukların üretimi, küresel yapıda altın çekirdeklerinin hazırlanıp bu çekirdeklerin büyütme çözeltisinde silindirik yapıya dönüştürülmesi olmak üzere iki ana procesten oluşan çekirdek geliştirme metodu (Seed Growth method) ile sentezlenmiştir. Altın nanoçubuk genel sentez reçetesi şöyledir: 7.5 ml 100 mM'lık setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) çözeltisine 250 µL 10 mM'lık tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ilave edilerek hafifçe karıştırılmıştır. 600 µl 10 mM'lık sodyum borhidrit (NaBH_4) çözeltisi hazırlanarak buzdolabında belli bir süre bekletilip karıştırılan çözeltiliye ilave edilerek 2 dakika karıştırılmıştır. Çözelti rengi açık sarıdan açık kahveye dönüşerek çekirdek (seed) çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisinin reaktif hale geçmesi için 5 saat karanlıkta bekletilmiştir. İkinci aşamada nanoçubuk geliştirme (growth) çözeltisi hazırlanmıştır. Nanoçubuk geliştirme çözeltisi, setiltrimetilamonyum bromide (CTAB), altın tuzu ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), gümüş nitrat (AgNO_3) ve askorbik asitten oluşmaktadır. 40 ml 100 mM'lık CTAB çözeltisine 1.7 ml 10 mM'lık $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilave edilip düşük karıştırma hızında karıştırılmıştır. Bu çözeltiliye önce 250 µl 10 mM'lık AgNO_3 ve daha sonra 270 µl 100 mM'lık askorbik asit eklenmiştir. Askorbik asitin eklenmesiyle çözelti rengi kahverengi sarıdan su gibi şeffaf renge dönüşmüştür. Bu şekilde hazırlanan nanoçubuk geliştirme çözeltisine daha önce hazırlanıp reaktif hale geçmesi için beklenen çekirdek çözeltisinden 420 µl eklenerek düşük karıştırma hızında karıştırılmıştır. Çekirdek çözeltisinin ilave edilmesinden 10 dakika içinde elde edilen nanoçubuğun uzunluk/çap oranına göre bir renk oluşumu gözlenmiştir. Elde edilen nanoçubuklar 30 dakika 6000 rpm'de santrifüjlenerek su ile yıkanıp çubuk şeklindeki altın nanopartiküllerden küresel formdaki altın nanopartiküller ayrılarak 0.1M'lık CTAB çözeltisi içinde süspanse edilmiştir. Bu şekilde altın nanoçubuklarda herhangi bir değişiklik olmadan aylarca saklanabilmektedir.

Literatürde küresel partiküllerin uzamasıyla çubuk yapısının oluşum mekanizmasının komplike olmasından dolayı altın nanoçubuk yapısının oluşumu tam olarak açıklanamamıştır. Reaksiyonda kullanılan HAuCl_4 , AgNO_3 , indirgeme ajanları, askorbik asit, NaBH_4 , CTAB ve çekirdek çözeltisindeki en ufak değişiklik çubuğun morfoloji ve boyutunda büyük değişikliklere neden olmaktadır. Aynı prosedüre karşın değişik renk ve boyutta dolayısıyla farklı optik özellikler gösteren altın nanoçubuklar sentezlenebilmektedir. Tez kapsamında mikroemülsiyon fazda DNA nanoarray geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle farklı boyutta altın nanoçubukların

sentezlenmesi için uzunluk/çap oranını (aspect ratio) etkileyen AgNO_3 miktarı, çekirdek çözelti miktarı, askorbik asit miktarı, surfaktant türü ve derişimi, reaksiyon sıcaklığı, farklı çekirdek çözeltilerinin ve farklı sürelerde bekletilmiş çekirdek çözeltilerin kullanılması gibi parametrelerin uzunluk/çap oranına dolayısıyla çözelti rengi ve optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir. Bu parametrelerin partikül uzunluk/çap oranına dolayısıyla optik özelliğine olan etkileri aşağıdaki alt bölümlerde ayrıntılı olarak sunulup tartışılmıştır. Aşağıda verilen alt bölümlerde bu formülasyonda yalnız bir parametre değiştirilmiş, diğerleri sabit tutulmuştur. Ayrıca üretilen altın nanoçubukların fluoresan özellikleri de incelenip, X-RD ile kristal yapısı, ATR ile kimyasal yapısı, VSM ile manyetik özellikleri karakterize edilmiştir.

4.1.5.1. Farklı çekirdek çözeltilerinin etkisi

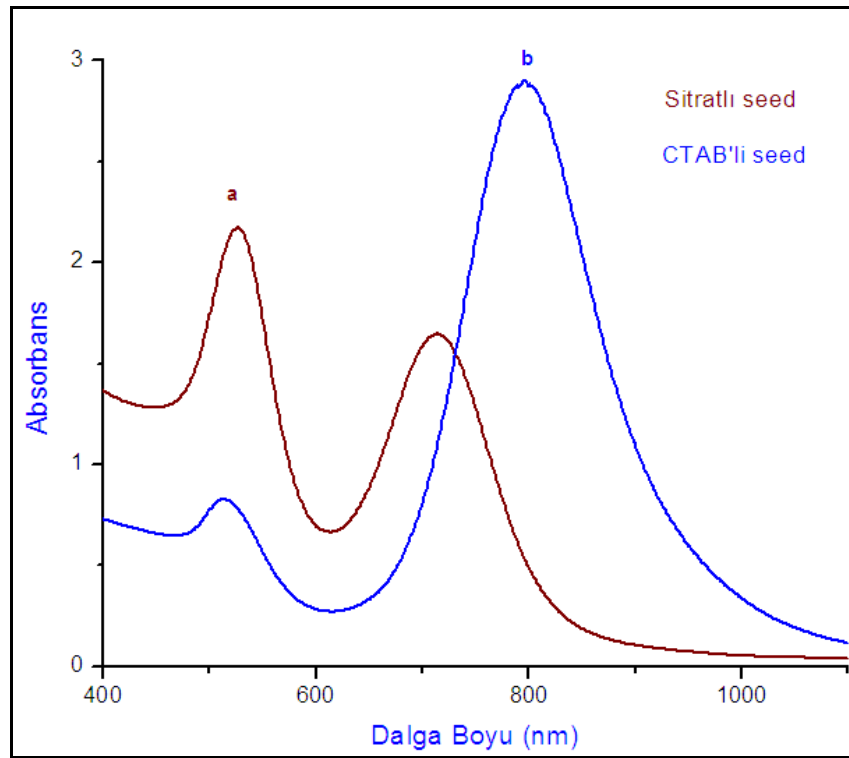
Altın nanoçubukların çekirdek geliştirilmesi yöntemiyle sentezi sırasında nanoçubukların uzunluk ve çapına etki eden faktörler arasında çekirdek çözeltisinin yapısının önemli bir rolü olmaktadır. Negatif ve pozitif yüklü olmak üzere iki tip çekirdek çözeltisi bulunmaktadır. Trisodyum sitratla hazırlanan çekirdek çözeltisi negatif, CTAB ile hazırlanan çekirdek çözeltisi pozitif yüklü olmaktadır. Çekirdek çözeltisinin oluşturulan nanoçubuğun yapısına dolayısıyla optik özelliğine olan etkisini incelemek amacıyla iki farklı çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Bunlardan bir tanesi trisodyum sitrat kullanılarak yapılan negatif yüklü çekirdek çözeltisi olup, diğeri CTAB kullanılarak hazırlanan pozitif yüklü çekirdek çözeltisidir. Aşağıda her bir çekirdek çözeltisi için sentez reçetesi verilmiştir.

Pozitif yüklü çekirdek çözeltileri: 7.5 ml 100 mM'lık setiltrimetilamonyum bromid (CTAB) çözeltisine 250 μL 10 mM'lık tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisi ilave edilerek hafifçe karıştırılmıştır. 600 μl 10 mM'lık sodyum borhidrit (NaBH_4) çözeltisi hazırlanarak buzdolabında belli bir süre bekletilip karıştırılan çözeltiliye ilave edilerek 2 dakika karıştırılmıştır. Çözelti rengi açık sarıdan açık kahveye dönüşerek çekirdek (seed) çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisinin reaktif hale geçmesi için 5 saat karanlıkta bekletilmiştir.

Negatif yüklü çekirdek çözeltisi: 10 ml 0.25 mM tetrakloraurat ($\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) çözeltisine 10 ml 0.25 mM trisodyum sitrat çözeltisi ilave edilerek hafifçe

karıştırılmıştır. 600 µl 10 mM'lık sodyum borhidrit (NaBH_4) çözeltisi hazırlanarak buzdolabında belli bir süre bekletilip karıştırılan çözeltiliye ilave edilerek 2 dakika karıştırılmıştır. Çözelti rengi açık sarıdan açık pembeye dönmüştür. Çekirdek çözeltisinin reaktif hale geçmesi için 5 saat karanlıkta bekletilmiştir.

Bu iki farklı çekirdek çözeltisi aynı geliştirme çözeltisi içinde aynı miktarlarda kullanılmıştır. Şekil 4.20 ve Şekil 4.21' de farklı çekirdek çözeltisi ile sentezlenmiş altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ile TEM görüntüleri verilmiş olup elde edilen altın nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.6' da gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu a) sitrat kaplı b) CTAB kaplı.

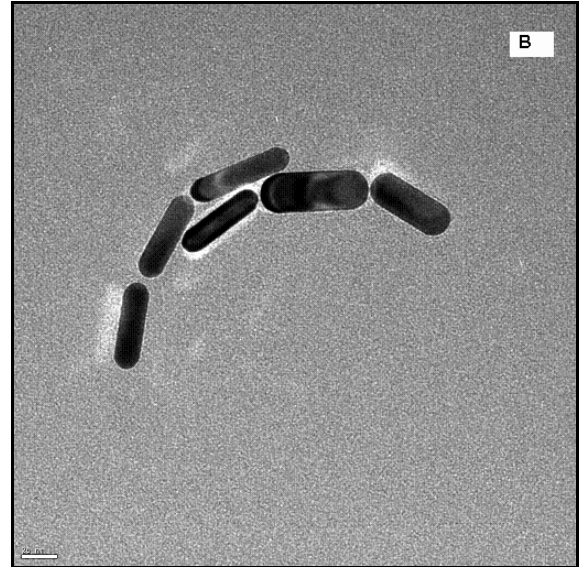
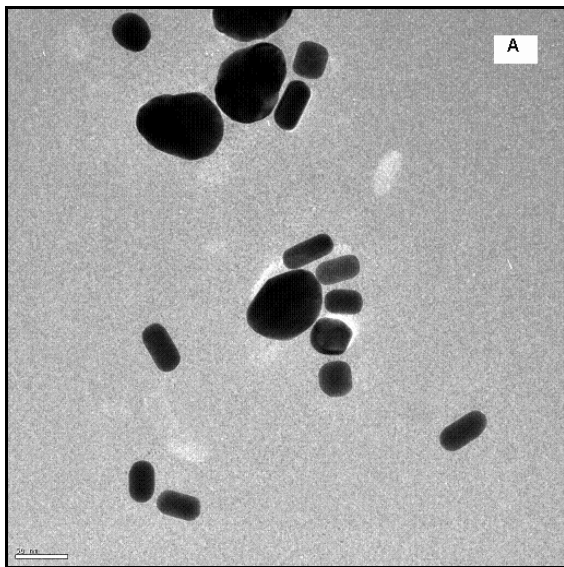
Şekil 4.20'de görüldüğü gibi CTAB kaplı çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların aksenal plasmon absorpsiyon değeri 2.8 iken sitrat kaplı çekirdek çözeltisinin aksenal absorpsiyon değeri 1.6'dır (Çizelge 4.6). Buna göre CTAB kaplı çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubukların verimi sitrat kaplı çekirdek çözeltilerine göre daha yüksek olduğu söylenebilir. Literatürde de CTAB kaplı çekirdek çözeltisindeki nanoparçacıkların daha kararlı kolloidal yapılar olmasından

dolayı CTAB kaplı çekirdek çözeltileri ile elde edilen altın nanoçubuk veriminin daha iyi olduğu rapor edilmiştir (Perez-Juste, 2005).

CTAB kaplı çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubuklar 795 nm’de aksel yönde plasmon dalga boyu verirken sitrat kaplı çekirdek çözeltisi ile elde edilen nanoçubuk ise 713 nm’de aksel plasmon vermiştir. Buna bağlı olarak CTAB kaplı çekirdekle hazırlanan altın nanoçubuk daha büyük “aspect ratio” oranı vermiş olup “aspect ratio” oranı 3.5’dir. CTAB kaplı çekirdekle daha yüksek “aspect ratio” oranında altın nanoçubukların üretileceği söylenebilir.

Çizelge 4.6. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların özellikleri.

| Çekirdek Çözeltisi | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|------------------------|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| Pozitif yüklü (CTAB) | 795 | 2.88 | 48.5 | 12.6 | 3.8 |
| Negatif yüklü (Sitrat) | 713 | 1.64 | 46.6 | 18.6 | 2.5 |
| | 527 | 2.17 | | | |



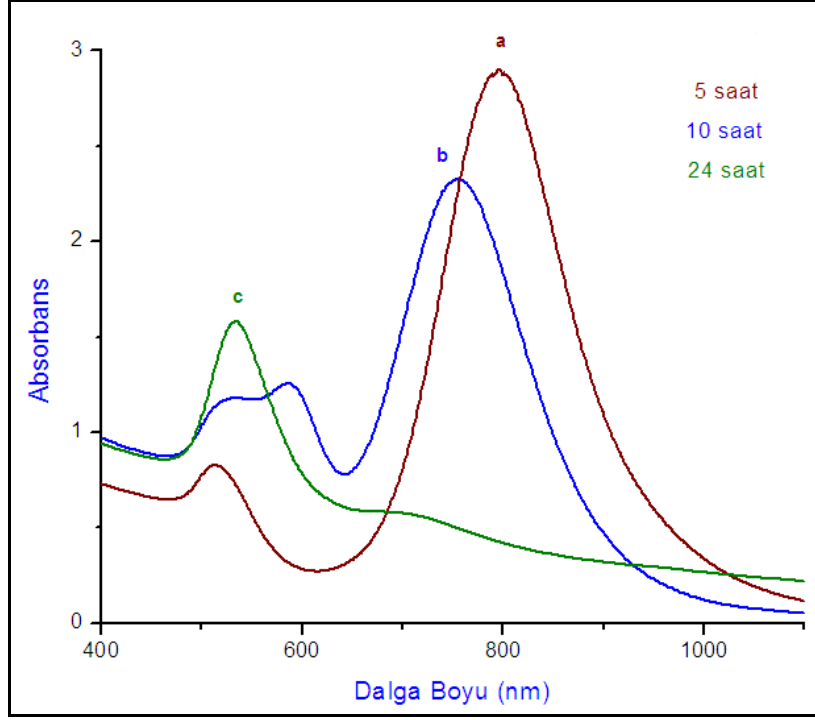
Şekil 4.21. Farklı çekirdek çözeltileri ile sentezlenen altın nanoçubukların TEM görüntüleri A) sitrat kaplı B) CTAB kaplı (A için skala bar 50 nm, B için skala bar 20 nm).

Şekil 4.21'deki TEM görüntülerinden görüldüğü gibi sitrat kaplı negatif yüklü çekirdek çözeltileri ile oluşturulan altın nanoçubukların yanı sıra küresel büyük boyutta nanopartiküllerinde olduğu görülmektedir (Şekil 4.21 A). Silindirik şekilde altın nanoçubukların sayısının az olduğu da görülmektedir. Sitrat kaplı çekirdek çözeltilerinin oluşturduğu altın nanoçubukların radyal yöndeki plasmon absorbans değerinin aksel plasmon absorbans değerinden büyük olması da bunu desteklemektedir (Çizelge 4.6). CTAB kaplı pozitif yüklü çekirdek çözeltisi ile tamamen silindirik şekilde altın nanoçubukların elde edildiği görülmüştür (Şekil 4.21 B).

Yapılan çalışma sonucu en iyi çekirdek çözeltisinin CTAB kaplı pozitif yüklü çekirdek çözeltisi olduğu belirlenmiştir. Bu nedenle bundan sonraki çalışmalarda CTAB kaplı çekirdek çözeltileri kullanılmıştır.

4.1.5.2. Farklı sürede bekletilmiş çekirdek çözeltilerinin etkisi

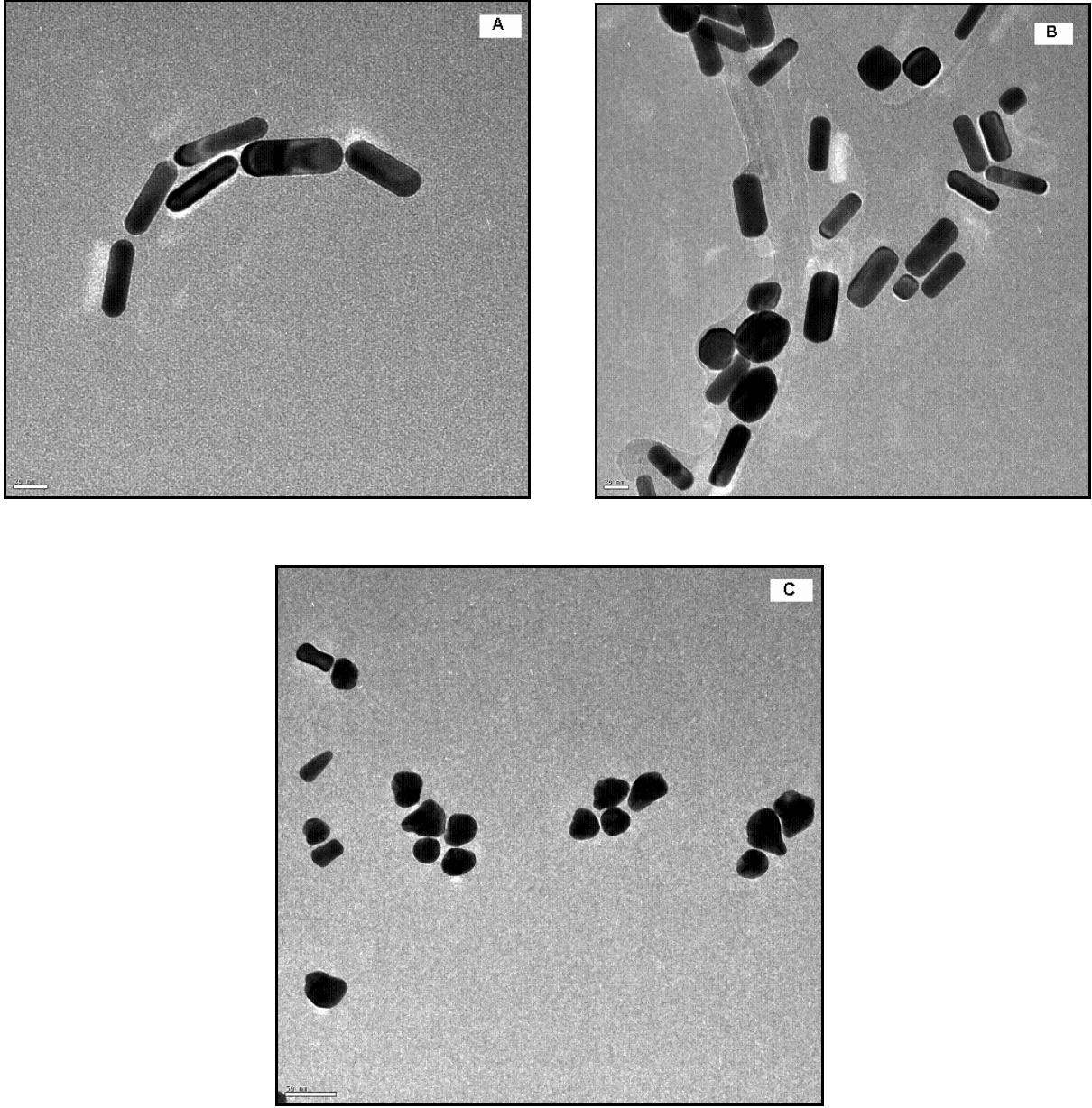
Çekirdek çözeltisindeki en ufak değişiklik çubuğun morfoloji ve boyutunda büyük değişikliklere neden olmaktadır. Altın nanoçubuk sentezinin ilk aşamasında hazırlanan çekirdek çözeltilerin reaktif hale gelmesi için belli bir süre karanlıkta bekletilmektedir. Bu süreye "aging" zamanı denilmektedir. Farklı "aging" sürelerinde bekletilen çekirdek çözeltileri ile altın nanoçubuk oluşturularak uzunluk/çap oranına dolayısıyla optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir. Bu amaçla altın nanoçubuk genel sentez reçetesindeki çekirdek hazırlama yöntemi aynen uygulanmış olup, çözeltinin aktif hale gelmesi için 5, 10 ve 24 saat olmak üzere üç farklı "aging" zamanında bekletilmiş çekirdek çözeltileri kullanılarak altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Şekil 4.22 ve 4.23' de sırasıyla farklı "aging" sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ile TEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.22. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 5 saat b) 10 saat c) 24 saat.

Şekil 4.22'deki farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumlarına bakıldığında aging süresi arttıkça eksenel yöndeki plasmon dalga boylarının azaldığı görülmüştür. 5 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubuk radyal yönde 513 nm eksenel yönde 795 nm de plasmon dalga boyları vermektedir. 10 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubuk ise radyal yönde 527 nm ve 586 nm de eksenel yönde 756 nm plasmon dalga boyu göstermekte olup radyal yönde iki plasmon piki gösterdiği görülmüştür. Şekil 4.23 B'deki TEM görüntüsüne bakıldığında nanoçubuk yapılarının yanı sıra nanoküp yapılarının da oluştuğu görülmektedir. 586 nm'deki bu ikinci plasmon piki altın nanoküplerin dipolar rezonansından kaynaklanmakta olup nanoküp yapılarının da oluştuğunu göstermektedir. 24 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubuk 534 nm de yüksek absorbans değerinde tek bir pik göstermiştir. Bu da yapıda silindirik yapının hemen hemen hiç olmadığını ve şekilsiz yapıların oluşmasından kaynaklanmaktadır. Çizelge 4.7'deki eksenel yöndeki plasmon absorbans değerlerine bakıldığında aging süresi arttıkça absorbans değerlerinin azaldığı görülmüştür. Buna dayanarak aging süresi

arttığında üretilen altın nanoçubukların verimlerinin azaldığı söylenebilir. Ayrıca 10 ve 24 saat aging edilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların radyal yöndeki plasmon absorbanans değerlerinin 5 saat aging edilmiş çekirdek çözeltilisine göre arttığı görülmüştür. Bu da 5 saatten büyük sürelerde aging edilmiş çekirdek çözeltileriyle elde edilen altın nanoçubuk çözeltilerinde silindirik yapıların veriminin az olduğunu ve daha çok şekilsiz ve küp şeklinde altın nanoyapıların oluştuğunu göstermektedir. TEM görüntüleri de bunları desteklemektedir. Literatürde de buna benzer sonuçlar elde edilmiştir. Aging süresi arttıkça çekirdek çözeltilisindeki küresel altın nanoparçacıklarının boyutu artmaktadır. Jiang ve arkadaşları 2 saat aging edilmiş çekirdek çözeltilerindeki altın parçacıklarının 3.5 nm olduğunu aging süresinin artması sonucu bu parçacıkların boyutunun artıp daha uniform çapa sahip küresel nanopartiküller haline geldiğini TEM görüntüleri ile rapor etmişlerdir (Jiang, 2007). Çekirdek çözelti içersindeki nanoparçacıkların boyutunun artmasıyla oluşturulan nanoçubukların hem morfolojisinin hem de boyutlarının dolayısıyla optik özelliklerinin değiştiği belirtilmiştir (Perez-Juste, 2005).



Şekil 4.23. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) 5 saat B) 10 saat C) 24 saat. (Skala bar 20 nm'dir).

5 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisiyle hazırlanan altın nanoçubukların şekilleri belirgin silindirik yapıdadırlar (Şekil 4.23 A). 10 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisiyle hazırlanan altın nanoçubukların şekil 4.23 B' de görülen TEM görüntülerine göre silindirik yapının yanı sıra kübik ve küresel şekilde yapılarında

oluştugu görülmüştür. 24 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisi ile elde edilen nanoçubukların TEM görüntüsünde de silindirik yapı tamamen oluşmayıp çok sayıda sivri uçlu şekilsiz yapı oluşmuştur (Şekil 4.23 C). 24 saat aging edilmiş çekirdek çözeltisiyle oluşturulan altın nanoçubuğun UV/vis absorpsiyon spektrumunda da silindirik yapıya özgü aksenal plasmon piki görülmemiş sadece 688 nm'de çok küçük burun oluşmuştur (Şekil 4.22). Bu pikte şekil 4.23 C'de görülen sivri uçlu şekilsiz yapılar ve az sayıdaki dambıl şeklindeki yapılardan kaynaklanmaktadır. Buna göre yüksek verimde ve silindirik yapıda altın nanoçubuk sentezi için çekirdek çözeltisinin 5 saat aging edilmesinin yeterli olduğu sonucuna varılmıştır.

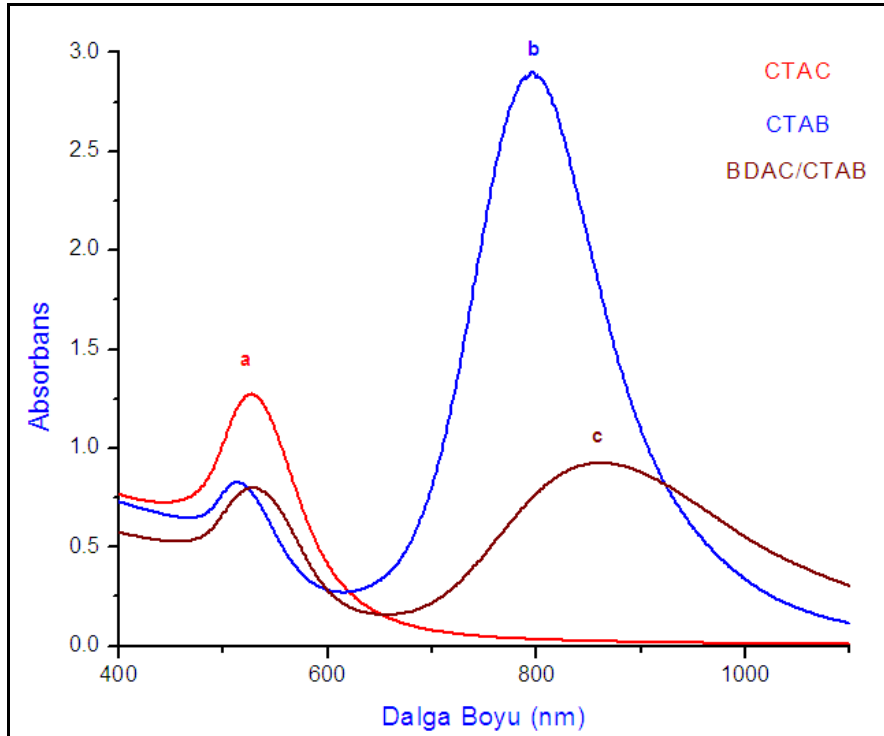
Çizelge 4.7. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanmış altın nanoçubukların özellikleri.

| Aging Süresi (saat) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|---------------------|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 5 | 795 | 2.89 | 48.5 | 12.6 | 3.8 |
| | 513 | 0.82 | | | |
| 10 | 756 | 2.33 | 44.6 | 14.5 | 3.0 |
| | 586 | 1.25 | | | |
| | 527 | 1.18 | | | |
| 24 | 688 | 0.57 | - | 21 | - |
| | 534 | 1.57 | | | |

Çizelge 4.7' ye bakıldığında 5 saat aging süresinde 3.8 aspect ratio oranına sahip nanoçubuklar elde edilirken 10 saat aging süresinde bu oran 3.0'a düşmüştür. Aging süresi arttığında nanoçubukların boyunun kısalıp çapının arttığı dolayısıyla uzunluk/çap oranının azaldığı görülmüştür. Aspect ratio oranının azalması çekirdek çözeltilerinin içindeki reaktif nanoparçacıklarının boyutlarının aging süresiyle artmasından kaynaklanmaktadır.

4.1.5.3. Sürfaktant türü ve derişimi

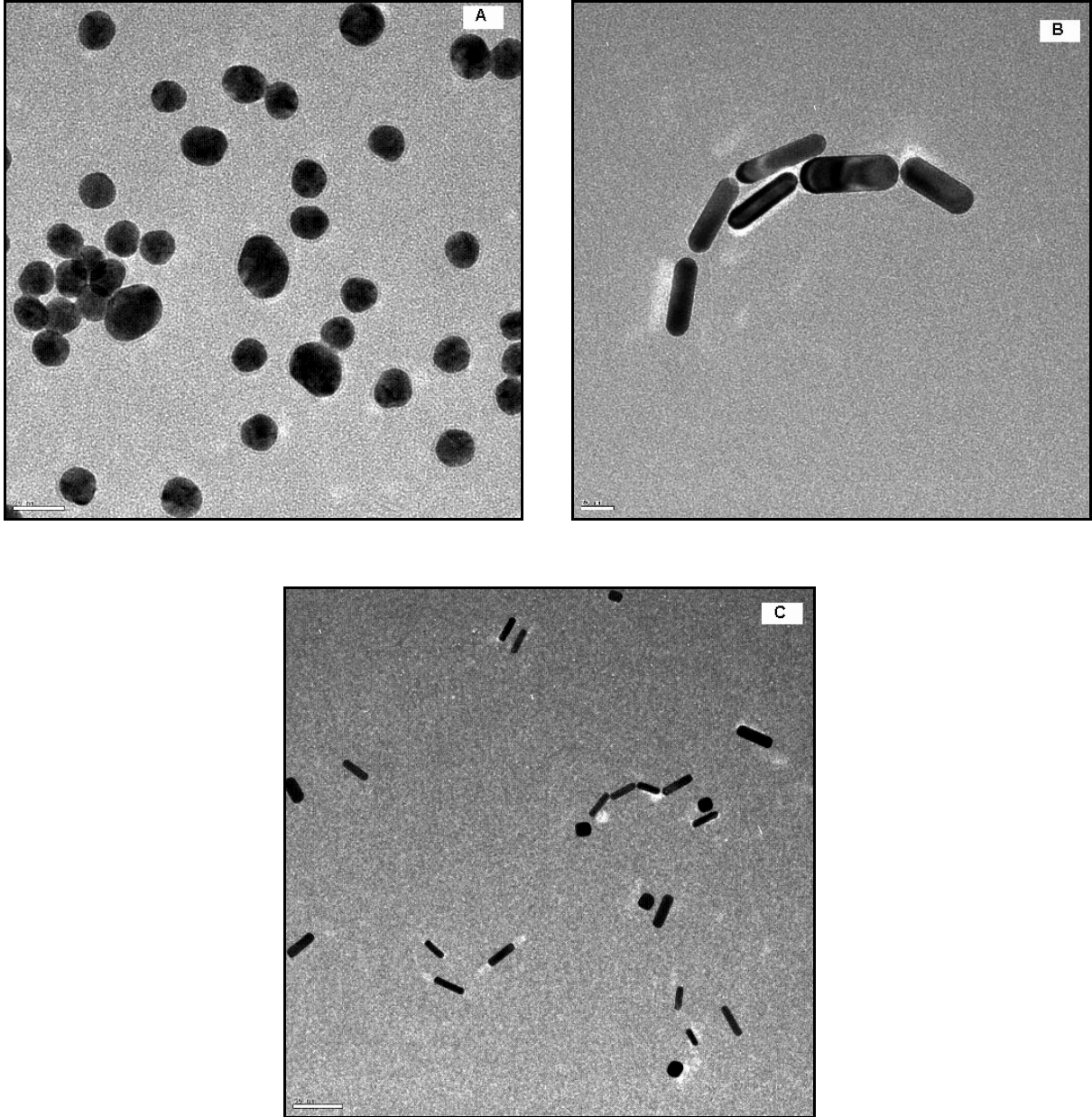
Surfaktant türü altın nanoçubukların gelişiminde önemli bir rol oynamaktadır. Özellikle kullanılan surfaktantın karbon zincirinin uzunluğu oluşturulacak olan nanoçubuğun verimini, uzunluğunu dolayısıyla aspect ratio oranını etkilemektedir. Kullanılan surfaktantın karbon zincirinin uzunluğu arttıkça nanoçubuğun aspect ratio oranının ve veriminin arttığı literatürde ifade edilmiştir (Gao, 2003). Tez kapsamında surfaktant türünün nanoçubuğun verimine ve aspect ratio oranına etkisini incelemek amacıyla CTAB (setil trimetilamonyum bromid), CTAC (setil trimetilamonyum klorid) ve BDAC/CTAB (benzildimetilamonyum klorid/ setil trimetilamonyum bromid) ikili surfaktant karışımı olmak üzere üç farklı surfaktant kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. Altın nanoçubuk genel sentez reçetesi aynen uygulanmış olup sadece surfaktant türleri değiştirilmiştir. BDAC/CTAB surfaktant karışımı ile yapılan sentezde BDAC/ CTAB derişim oranı 1 olacak şekilde üretim yapılmıştır. Şekil 4.24 ve Şekil 25' de farklı surfaktant türleri ile elde edilen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ile TEM görüntüleri verilmiştir.



Şekil 4.24. Farklı surfaktant türleri ile elde edilen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) CTAC b) CTAB c) BDAC/CTAB.

Şekil 4.24'de görüldüğü gibi CTAC surfaktantı ile oluşturulan altın nanoçubukların eksenel dalga boyunda plasmon vermeyip sadece radyal yönde 528 nm'de plasmon dalga boyu oluşturmaktadır. Buna göre CTAC surfaktantıyla silindirik yapıda altın nanoçubukların elde edilmediği sadece küresel altın nanopartiküllerin oluştuğu görülmüştür. Şekil 4.25 A'daki TEM görüntüsünde de silindirik yapıların olmadığı görülmektedir. CTAC surfaktantı CTAB surfaktantı ile aynı hidrofobik baş gruba sahip olup sadece Br⁻ yerine Cl⁻ iyonu içermektedir. Ama CTAC surfaktantı ile nanoçubuk yapılar elde edilememiştir. Buna dayanarak surfaktantın yapısındaki Br⁻ iyonunun bile altın nanoçubuk oluşumuna etkisinin büyük olduğu söylenebilir. Literatürde Br⁻ iyonlarının Cl⁻ iyonuna göre daha iyi çubuk oluşumunu sağlayan bir ajan olduğu belirtilmiştir (Sharma, 2009; Perez-Juste, 2005). CTAB surfaktantı ile yapılan sentez sonucu altın nanoçubuklar radyal yönde 512 nm, eksenel yönde 795 nm plasmon dalga boyları vermektedir. BDAC/CTAB ikili surfaktant karışımıyla elde edilen altın nanoçubuk radyal yönde 530 nm eksenel yönde 856 nm de plasmon dalga boyu göstermekte olup eksenel plasmon dalga boyunda 61 nm'lik bir kayma olmuştur. Dolayısıyla bu ikili surfaktant karışımıyla daha yüksek aspect ratio oranında altın nanoçubukların oluşturulabileceği söylenebilir. Altın nanoçubuk oluşum mekanizmasına göre CTAB surfaktant monomerleri altın nanoçubukların eksenel yöndeki yüzeylerine radyal yöndeki yüzeylerine göre daha yüksek affinite göstermelerinden dolayı yan yüzeylere adsorbe olmaktadır. BDAC surfaktant monomerleri ise altın nanoçubukların radyal yöndeki yüzeylerine daha çok adsorbe olmaktadır. Surfaktant monomerlerindeki Br⁻ ve Cl⁻ iyonları nanoçubuk sentezi sırasında ilave edilen AgNO₃ molekülü ile Ag-Cl ve Ag-Br çiftleri oluşturmaktadır. Ag-Cl çifti Ag-Br çiftine göre daha zayıf olduğu için altın nanoçubuğun eksenel yöndeki gelişim hızı radyal yöndeki gelişim hızından büyük olması nedeniyle bu ikili surfaktant karışımıyla yüksek aspect ratio oranında altın nanoçubuklar elde edilmiştir. Fakat eksenel plasmon absorpsiyon değerlerine bakıldığında BDAC/CTAB surfaktant karışımının absorpsiyon değerinin düşük olması nedeniyle daha az verimde nanoçubuklar elde edilmiştir. Literatürde de aynı sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir. Ayrıca BDAC surfaktantının tek başına kullanılmasıyla altın nanoçubukların oluşturulamadığı belirtilmiştir. (Nikoobakht, 2003; Torigoe, 1992). Gao ve arkadaşları farklı zincir uzunluğunda alkil trimetilamoniyum bromid (C_nTAB, n=10,12,16 ve 18) ve setilpridinium klorür (C₁₆PC) ile altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirmişlerdir. Zincir

uzunluğu arttıkça aspect ratio oranının arttığını belirtmişlerdir. C₁₆PC surfaktantının setilpridinium baş grubunun CTAB'e göre büyük olması, çok anizotropik olması ve yüklü iyonlarının farklı olması nedeniyle çubuk şeklinin haricinde küresel, üçgen ve şekilsiz partiküllerin elde edildiği rapor edilmiştir (Gao, 2003). Yapılan bu çalışmalar sonucunda en iyi surfaktantın CTAB olduğu sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.25. Farklı surfaktant türleri ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) CTAC B) CTAB C) BDAC/CTAB. (A ve B için skala bar 20 nm, C için skala bar 50 nm'dir).

Şekil 4.25'deki TEM görüntülerine bakıldığında CTAC surfaktantı ile ortalama çapı 24 nm olan irili ufaklı küresel yapıda altın nanopartiküllerin üretildiği görülmektedir (Şekil 4.25 A). Şekil 4.25 B ve C' de ise CTAB surfaktantıyla ortalama uzunluğu 48.5 nm ve çapı 12.6 nm, ikili surfaktan karışımı ile ortalama uzunluğu 34.6 nm ve çapı 6.2 nm olan silindirik yapıların oluştuğu görülmektedir. Farklı surfaktant türleri ile elde edilen nanoçubukları daha iyi kıyaslayabilmek için nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.8'de verilmiştir.

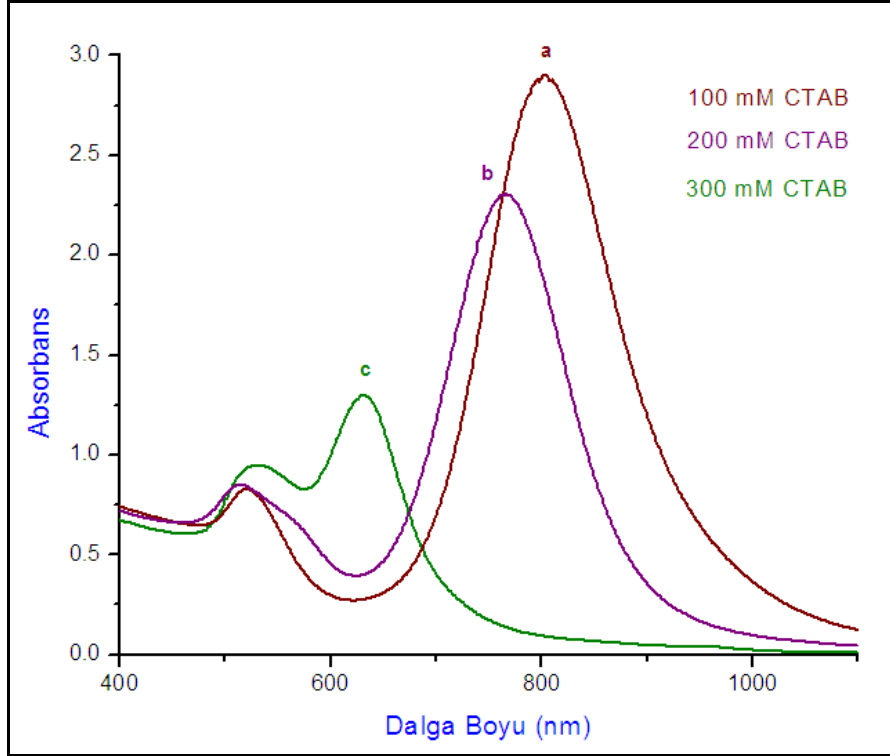
Çizelge 4.8. Farklı surfaktant türleri ile elde edilen altın nanoçubukların özellikleri.

| Surfaktant Türü | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|-----------------|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| CTAC | 528 | 1.27 | - | 24 | - |
| | 515 | 0.82 | | | |
| CTAB | 795 | 2.89 | 48.5 | 12.6 | 3.8 |
| | 512 | 0.82 | | | |
| BDAC/CTAB | 856 | 0.92 | 34.6 | 6.2 | 5.6 |
| | 530 | 0.79 | | | |

Çizelge 4.8' den CTAB surfaktantı ile uzunluk/çap oranı 3.8, BDAC/CTAB surfaktantı ile uzunluk/çap oranı 5.6 olan altın nanoçubukların elde edildiği ve ikili surfaktant karışımı ile aspect ratio oranının arttığı görülmektedir.

Surfaktant (CTAB) derişiminin oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranına olan etkisini incelemek için geliştirme çözeltilisindeki CTAB derişimi değiştirilerek altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Literatürde optimum CTAB/HAuCl₄ molar oranının dar bir aralıkta olduğu ve bu oranın 10'dan küçük olduğunda çökme olduğu belirtilmiştir (Perez-Juste, 2005; Jana, 2001). Çökme olmaması için bu oran 10'dan büyük olacak şekilde CTAB derişimi kullanılmıştır. Altın nanoçubuk genel sentez reçetesindeki bütün parametreler aynen uygulanmış olup sadece geliştirme çözeltilisinde kullanılan CTAB surfaktant çözelti derişimi 100 mM; 200 mM ve 300 mM olacak şekilde üç farklı sentez gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.26 ve Şekil 4.27'de farklı CTAB derişiminde üretilen

altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ve TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca farklı CTAB miktarlarında oluşturulan altın nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.9' da gösterilmiştir.



Şekil 4.26. Farklı CTAB miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 100 mM b) 200 mM c) 300 mM.

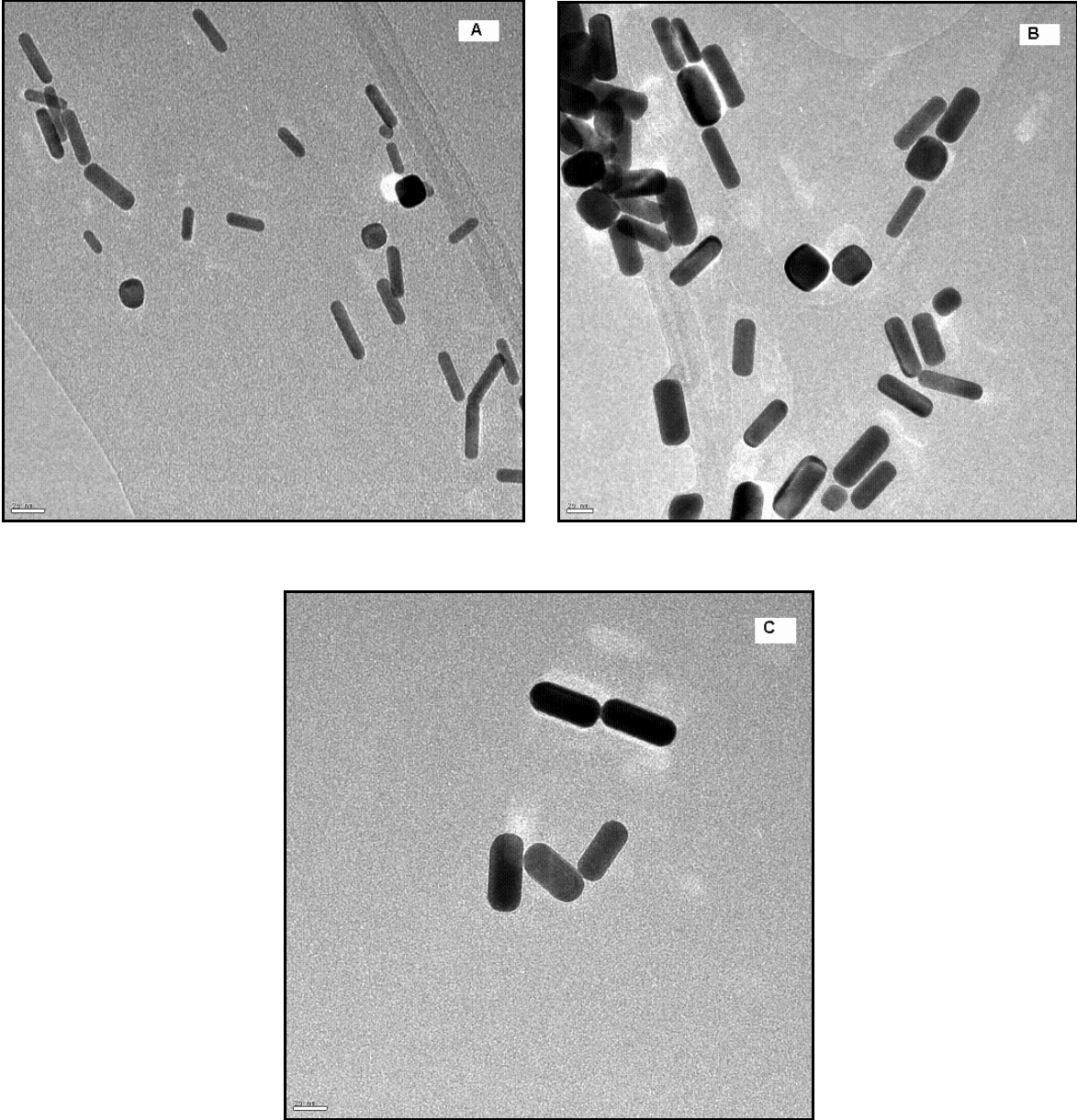
Şekil 4.26'da görüldüğü gibi 100 mM derişimde CTAB kullanıldığında elde edilen altın nanoçubuk aksenal yönde 803 nm plasmon dalga boyu verirken, CTAB derişimi üç kat artırıldığında aksenal yönde 631 nm de plasmon dalga boyu göstermiştir. Görüldüğü gibi surfaktant derişiminin üç kat artırılmasıyla aksenal plasmon dalga boyunun azaldığı görülmüştür. CTAB derişimi arttıkça oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranının azaldığı görülmüştür. CTAB surfaktantı altın nanoçubuk gelişimi sırasında su içinde çubuk şeklinde misel yapılar oluşturmaktadır. Altın nanopartikül yüzeyinde surfaktantın oluşturduğu yapı hem altın nanoçubuk oluşumu boyunca kararlılığı sağlarken hem de nanoçubuğun uzamasına neden olmaktadır. Dolayısıyla surfaktant derişimi arttıkça su da oluşturulan çubuk şeklindeki misellerin boyutu artmaktadır. Buna bağlı olarak oluşturulan altın nanoçubukların uzunluğunun dolayısıyla aspect ratio oranlarının artması beklenmektedir. Fakat

beklenenin tam tersine surfaktant derişimi arttıkça aspect ratio oranının azaldığı görülmüştür. Bu da kullanılan askorbik asit miktarının sabit olmasından dolayı fazla miktarda CTAB surfaktantının oluşturduğu uzun nanoçubuk misellerini yeterince indirgeyememesinden kaynaklandığı söylenebilir. Çizelge 4.9'a bakıldığında surfaktant miktarı arttıkça elde edilen nanoçubukların ortalama uzunluğunun 27 nm'den 46 nm arttığı görülmüştür. Bu da surfaktant miktarı arttıkça uzun nanoçubuk misellerin oluştuğunu desteklemektedir. Ortalama çap değeri ise 6 nm'den 17 nm artarak askorbik asit miktarının yeterli olmamasından dolayı gelişim yönü çap yönünde olmuştur. Bu nedenle de aspect ratio oranı azalmıştır denilebilir. Altın nanoçubuk gelişiminde CTAB derişiminin kritik olduğu literatürde de belirtilmiş olup surfaktant derişiminin aspect ratio oranına etkisi hakkında herhangi bir bilgi rapor edilmemiştir.

Çizelge 4.9. Farklı CTAB miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların özellikleri.

| CTAB (mM) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|-----------|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 100 | 803 | 2.89 | 27.3 | 6.1 | 4.4 |
| | 519 | 0.83 | | | |
| 200 | 764 | 2.31 | 34.2 | 8.9 | 3.8 |
| | 516 | 0.85 | | | |
| 300 | 631 | 1.31 | 46.5 | 17.1 | 2.7 |
| | 527 | 0.95 | | | |

Çizelge 4.9'da görüldüğü üzere surfaktant derişimi arttıkça aksel plasmon absorbans değeri 2.89'dan 1.31'e azalmış dolayısıyla veriminde azaldığı söylenebilir. 100 mM surfaktant değerinde aspect ratio oranı 4.4 iken surfaktant değeri üç kat artırıldığında 2.7 olarak belirlenmiştir.

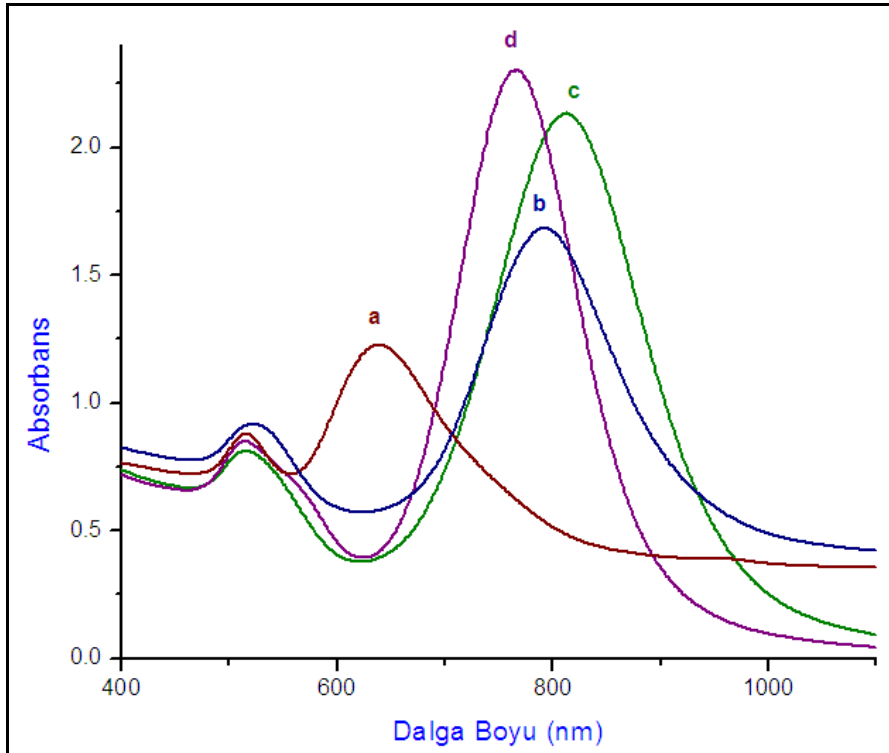


Şekil 4.27. Farklı surfaktant miktarları ile hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. A) 100 mM B) 200 mM C) 300 mM. (Skala bar 20 nm'dir).

Şekil 4.27'deki TEM görüntülerine bakıldığında her üç surfaktant derişiminde silindir şeklinde nanoçubukların oluştuğu görülmektedir. Ayrıca Şekil 4.27 A ve B'de az miktarda da olsa kübik yapıların oluştuğu görülmüştür.

4.1.5.4. AgNO₃ miktarı

Altın nanoçubuk sentezinde gümüş nitratin (AgNO₃) kullanılması hem altın nanoçubukların verimini, uzunluk/çap oranını hem de altın nanoçubuk oluşum mekanizmasını ve buna bağlı olarak kristal yapısını da etkilemektedir. Altın nanoçubuk geliştirme çözeltilerinde kullanılan AgNO₃ miktarının oluşturulan altın nanoçubukların verimine ve aspect ratio oranına dolayısıyla optik özelliğine olan etkisini incelemek amacıyla dört farklı miktarda AgNO₃ kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. Altın nanoçubuk genel sentez reçetesi aynen uygulanmış olup sadece 10 µM'lık AgNO₃ çözeltisinden 125 µl; 250 µl; 375 µl ve 500 µl AgNO₃ ilave edilerek dört farklı altın nanoçubuk üretilmiştir. Şekil 4.28 ve Şekil 4.29'da farklı miktarlarda AgNO₃ kullanılmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ve TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca AgNO₃ miktarının oluşturulan altın nanoçubukların özelliklerine olan etkisini kıyaslayabilmek amacıyla elde edilen nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.10'da gösterilmiştir.

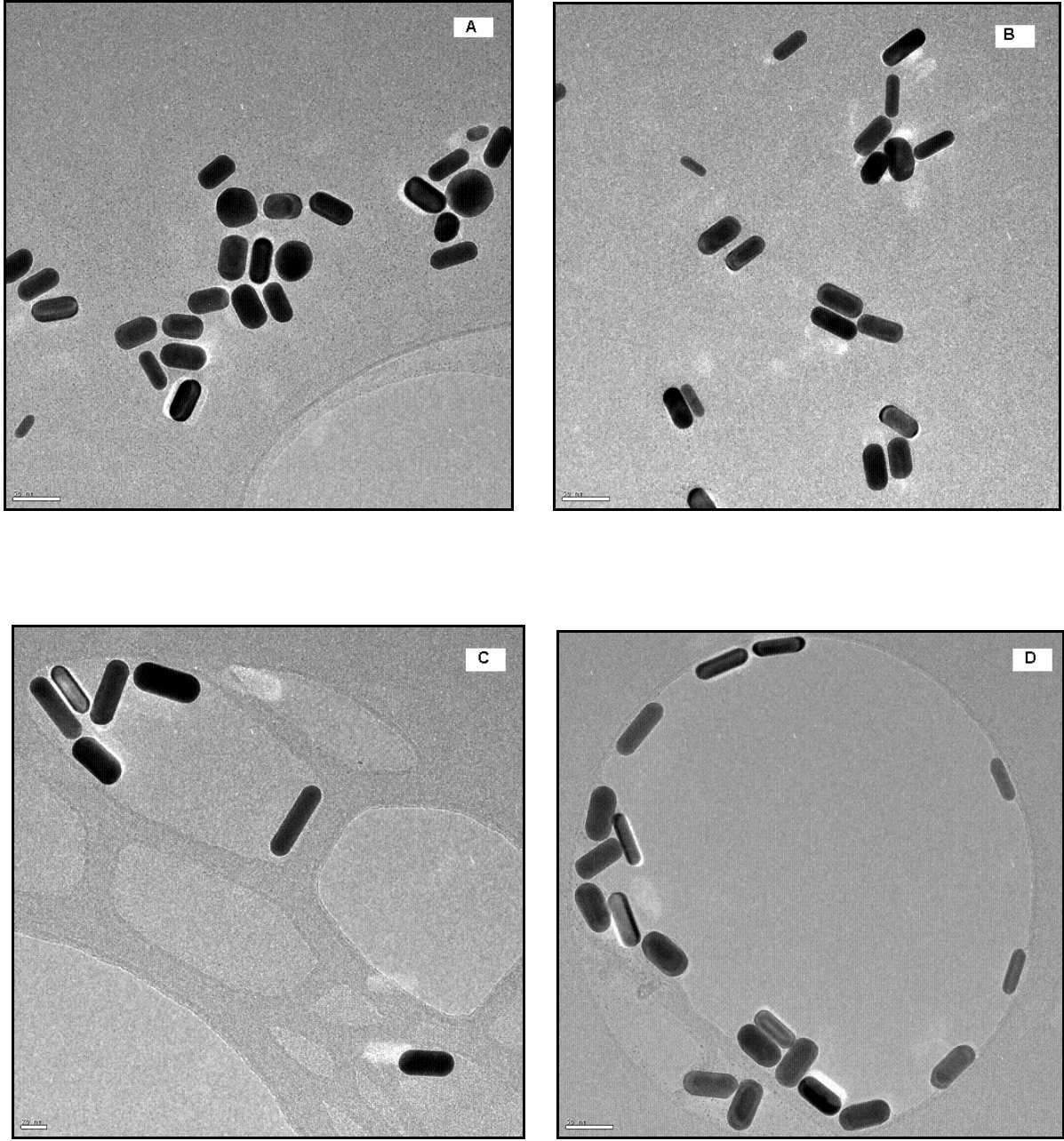


Şekil 4.28. Farklı AgNO₃ miktarlarında elde edilmiş altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 125 µl b) 250 µl c) 375 µl d) 500 µl.

Şekil 4.28’de görüldüğü gibi AgNO_3 miktarı arttıkça altın nanoçubukların eksenel plasmon absorpsiyon değerlerine bakarak nanoçubuk oluşum veriminin arttığı görülmektedir (Çizelge 4.10). AgNO_3 miktarı 125 μl ; 250 μl ; 375 μl için eksenel plasmon dalga boyları sırasıyla 639, 792 ve 813 nm olarak ölçülmüştür. AgNO_3 miktarı arttıkça eksenel yöndeki plasmon dalga boyları artarken 500 μl AgNO_3 eklendiğinde eksenel yöndeki plasmon dalga boyu 766 nm ölçülmüş olup tekrar azalmıştır. Literatürde AgNO_3 miktarı arttıkça nanoçubuk veriminin arttığı ve aspect ratio oranının da arttığı belirtilmiştir. Fakat kritik bir Ag^+ iyonu miktarından daha büyük miktarlarda aspect ratio oranının tekrar azaldığı rapor edilmiştir (Perez-Juste, 2005; Afshar, 2007). Yapılan bu çalışma ile kritik AgNO_3 miktarının 375 μl ’den sonra olduğunu söyleyebiliriz. AgNO_3 nanoçubuk oluşumunu yavaşlatmakta olup gümüş nitratla aspect ratio oranı daha iyi kontrol edilebilmektedir. Gümüş nitrat, altın nanopartikülün yüzey yapısına spesifik surfaktant gibi davranmaktadır. Gümüş iyonları seçici olarak altın nanoçubuğun (110) yüzeyine deposite olmakta ve bu da bu yüzeyin gelişimini yavaşlatmaktadır. AgNO_3 miktarı kritik bir değeri aştığında CTAB surfaktantların adsorbe olduğu yerlere ondan önce adsorbe olarak nanoçubuğun eksenel yönde gelişimini yavaşlatarak aspect ratio oranını azaltmaktadır. Literatürde AgNO_3 kullanmadan altın nanoçubuk üretim yöntemleri de bulunmaktadır. AgNO_3 kullanılmadan oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranlarının daha büyük olduğu fakat verimin çok düşük olduğu belirtilmiştir (Sharma, 2009).

Çizelge 4.10. Farklı miktarlarda AgNO_3 kullanılmış altın nanoçubukların özellikleri.

| AgNO_3 Miktarı (μl) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|--|----------------|-----------|--------------------------|----------------------|----------------------------|
| 125 | 639 | 1.26 | 42.3 | 17.8 | 2.3 |
| | 515 | 0.82 | | | |
| 250 | 792 | 1.68 | 48.1 | 13.4 | 3.5 |
| | 522 | 1.91 | | | |
| 375 | 813 | 2.13 | 53.4 | 13 | 4.1 |
| | 515 | 0.81 | | | |
| 500 | 766 | 2.31 | 57.0 | 18 | 3.2 |
| | 514 | 0.80 | | | |



Şekil 4.29. Farklı miktarlarda AgNO_3 kullanılmış altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 125 μl b) 250 μl c) 375 μl d) 500 μl . (A, B ve D'de skala bar 50 nm, C'de 20 nm'dir).

Farklı AgNO_3 miktarlarında hazırlanan altın nanoçubukların TEM görüntülerine bakıldığında hepsinde silindirik nanoçubukların oluştuğu görülmektedir (Şekil 4.29). 125 μl AgNO_3 kullanıldığında uzunluğu kısa ve çapı büyük silindirik yapılar varken (Şekil 4.29 A) AgNO_3 miktarı arttıkça uzunluğu artmış çapı küçülmüş silindirik yapılar

oluşmuştur (Şekil 4.29 C). 500 µl AgNO₃ kullanılmış altın nanoçubukların TEM görüntüsüne bakıldığında ise uzunluğu biraz artmış çapı büyümüş nanoçubuklar elde edilmiştir (Şekil 4.29 D). AgNO₃ miktarları arttıkça nanoçubukların ortalama uzunlukları 42 nm'den 57 nm'ye artmıştır (Çizelge 4.10). Ortalama çaplarında ise AgNO₃ miktarları 125 µl'den 375 µl'ye kadar artırıldığında 17 nm'den 13 nm'ye düşmüştür. 500 µl'de ise ortalama çapın 18 nm'ye arttığı görülmüştür. Çizelge 4.10'dan 125 µl'den 375 µl'ye kadar aspect ratio oranının 2.3' den 4.1'e arttığı görülmektedir. 500 µl'de ise aspect ratio oranı tekrar 3.2' ye düşmüştür. Buna göre uyguladığımız sentez reçetesinde kritik AgNO₃ miktarının 375 µl' den sonra olduğu ve bu değerden fazla AgNO₃ miktarlarında çapı büyüyen dolayısıyla aspect ratio oranı azalan altın nanoçubukların sentezlenebileceği söylenebilir.

4.1.5.5. Askorbik asit miktarı

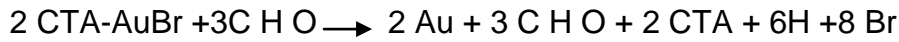
Çekirdek geliştirme yöntemiyle altın nanoçubuk üretme prosesindeki en önemli basamaklardan biri oluşturulacak olan nanoçubukların özelliklerini belirleyen indirgeme ajanının türü ve indirgeme reaksiyonunun hızı dolayısıyla indirgeme ajanının derişimidir. Silindirik şekilde yapıların oluşabilmesi için kullanılacak olan indirgeme ajanının kuvvetli olmayıp zayıf bir indirgeme ajanı olması gerekmektedir. Literatürde zayıf bir indirgeme ajanı olan askorbik asit kullanılmaktadır. Yapılan çalışmada da indirgeme ajanı olarak askorbik asit kullanılmıştır. İndirgeme hızının oluşturulan altın nanoçubukların yapısına olan etkisini daha iyi anlayabilmek amacıyla indirgeme reaksiyonu aşağıda verilmiştir.

Altın iyonlarının askorbik asit ile indirgenme reaksiyonları:

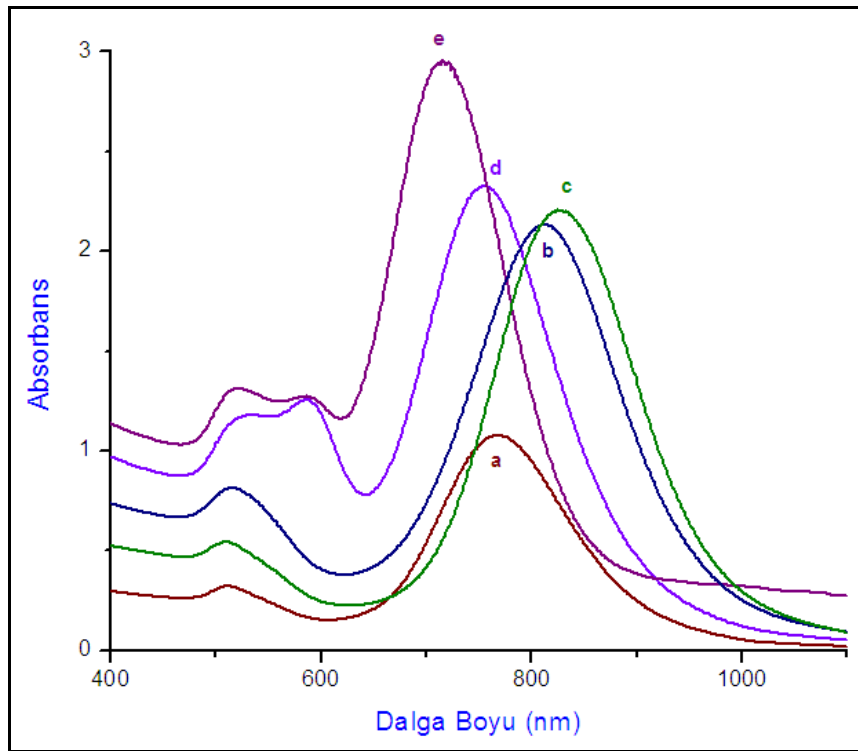


Birinci indirgeme reaksiyonu metalomiseller ile sınırlandırılmış olup ikinci indirgeme reaksiyonu çekirdek çözeltisinin ilave edilmesiyle başlamaktadır.

Toplu reaksiyon:



Askorbik asit (AA) derişiminin altın nanoçubukların oluşumuna etkisini incelemek amacıyla 100 µM'lık askorbik asit çözeltilisinden 135 µl; 270 µl; 540 µl; 675 µl ve 810 µl olmak üzere beş farklı miktarda kullanılarak altın nanoçubuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Yapılan sentezlerde daha önce verilmiş olan altın nanoçubuk genel sentez reçetesi kullanılmış olup diğer deneysel koşulların hepsi aynı tutulmuştur. Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ve TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca askorbik asit miktarının oluşturulan altın nanoçubukların özelliklerine olan etkisini kıyaslayabilmek amacıyla elde edilen nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.11'de gösterilmiştir.



Şekil 4.30. Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 135 µl b) 270 µl c) 540 µl d) 675 µl e) 810 µl.

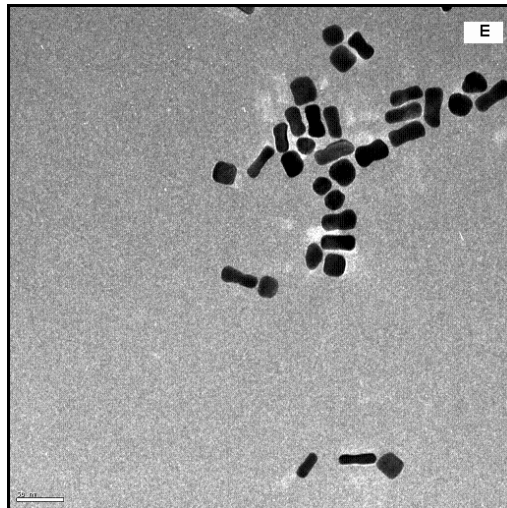
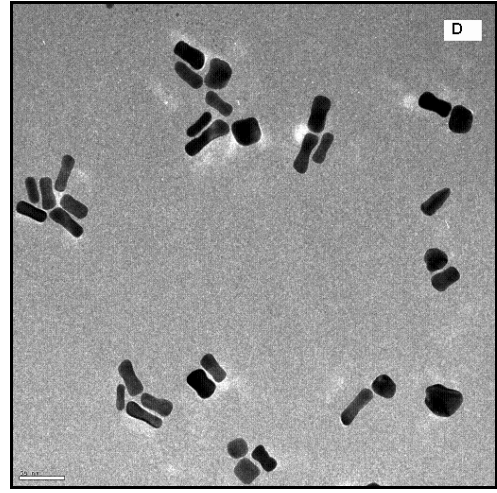
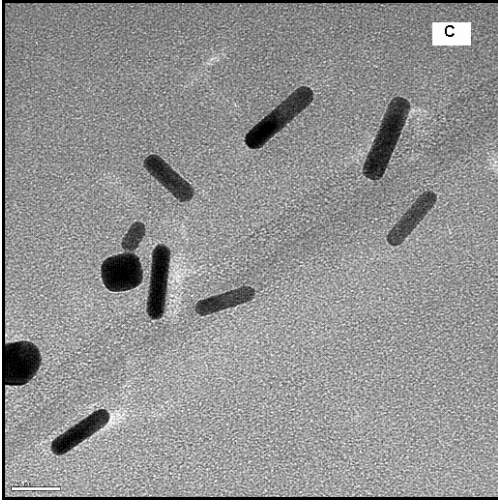
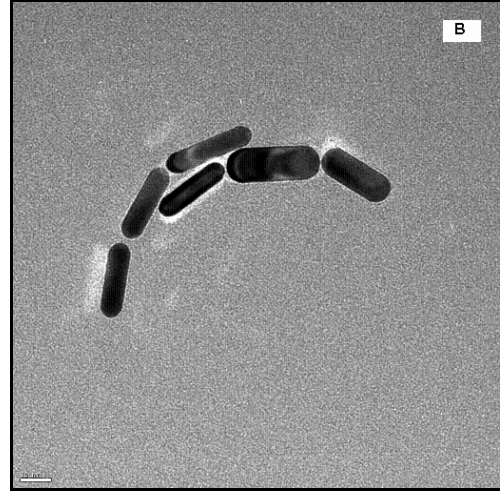
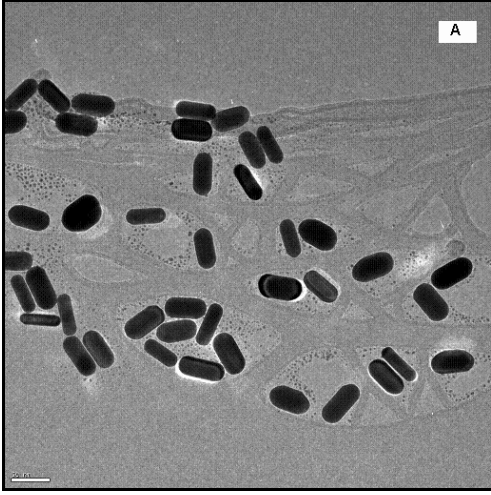
Şekil 4.30'da görüldüğü gibi askorbik asit miktarı arttıkça aksenal plasmon dalga boylarındaki absorpsiyon değerleri 1.07'den 2.9'a artmıştır. Dolayısıyla askorbik asit

miktarı arttıkça altın nanoçubuk oluşum veriminin de arttığı söylenebilir. Ayrıca askorbik asit miktarının 135 µl'den 540 µl'ye artırılmasıyla aksenel plasmon dalga boyunun 768 nm'den 828 nm'ye arttığı dolayısıyla uzunluk/çap oranının da arttığı görülmüştür. 540 µl'den daha büyük askorbik asit miktarlarında ise aksenel plasmon dalga boyları daha küçük dalga boylarına kaymış olup 756 ve 717 nm olarak ölçülmüştür. 540 µl'den daha büyük askorbik asit miktarlarında elde edilen altın nanoçubukların uzunluk/çap oranları azalmıştır.

Çizelge 4.11. Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların özellikleri.

| AA Miktarı (µl) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|-----------------|--------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 135 | 768 | 1.07 | 49.2 | 15 | 3.3 |
| | 511 | 0.32 | | | |
| 270 | 813 | 2.13 | 48.5 | 12.3 | 3.9 |
| | 514 | 0.81 | | | |
| 540 | 828 | 2.20 | 35.3 | 7.6 | 4.6 |
| | 508 | 0.55 | | | |
| 675 | 756 | 2.33 | 33.8 | 10.7 | 3.1 |
| | 587 | 1.26 | | | |
| | 514 | 0.80 | | | |
| 810 | 717 | 2.9 | 36.1 | 12.6 | 2.8 |
| | 588 | 1.27 | | | |
| | 519 | 1.3 | | | |

Çizelge 4.11'den görüldüğü üzere 135 µl'den 540 µl'ye kadar askorbik asit miktarının artırılmasıyla aspect ratio oranının 3.3' den 4.6'ya arttığı görülmüştür. 540 µl'den daha büyük miktarlarda ise aspect ratio oranı tekrar 2.8' e düşmüştür.



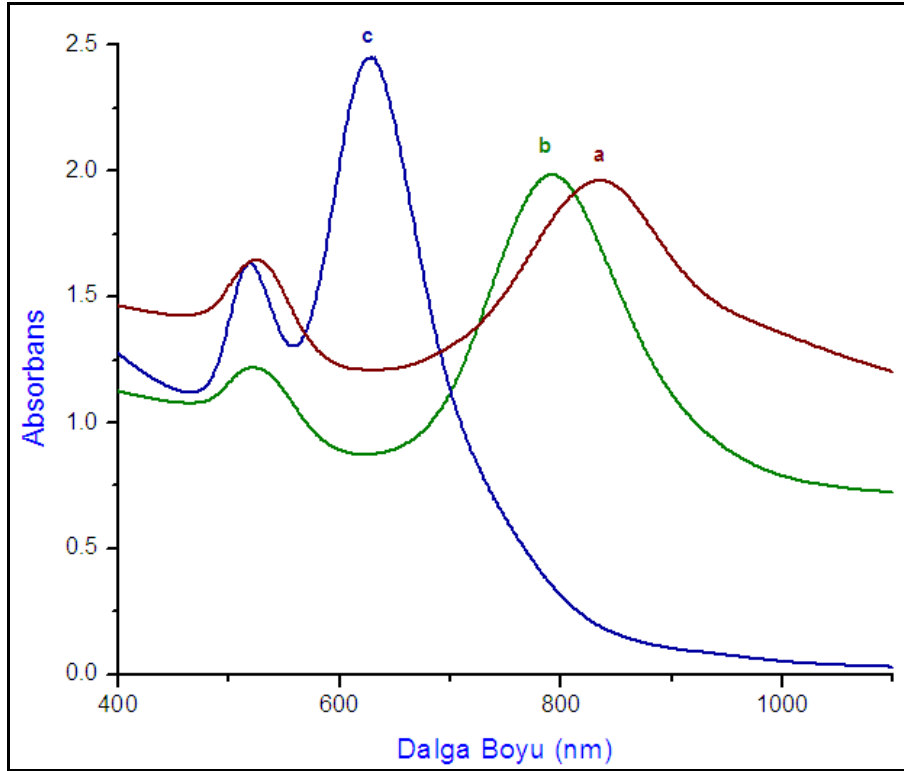
Şekil 4.31. Farklı miktarlarda askorbik asit kullanılmış altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 135 μ l b) 270 μ l c) 540 μ l d) 675 μ l e) 810 μ l. (A, D ve E'de skala bar 50 nm, B ve C'de 20 nm'dir).

Askorbik asit miktarının nanoçubuk morfolojisine olan etkisi Şekil 4.31’de verilen TEM görüntülerinde görülmektedir. 135 µl’den 540 µl’ye kadar askorbik asit kullanıldığında silindirik şekilde nanoçubukların olduğu (Şekil 4.31 A,B,C), 540 µl’den fazla miktarlarda askorbik asit kullanıldığında ise dambıl şeklinde yapıların (Şekil 4.31 D,E) oluştuğu görülmüştür. Şekil 4.31 A’da nanoçubukların etrafında küçük küresel partiküller bulunmaktadır. Askorbik asit miktarı az olduğu için çekirdek çözeltisi içindeki bir kısım nanoparçacık indirgenememiştir. Nanoçubukların etrafındaki bu küresel partiküller çekirdek çözeltisi içindeki indirgenememiş nanoparçacıkları göstermektedir. Çizelge 4.11’e bakıldığında askorbik asit miktarı arttıkça nanoçubuğun ortalama uzunluk değerinin 49 nm’den 36 nm’ye azaldığı görülmektedir. Ortalama çap değerleri ise 540 µl’ye kadar azalırken askorbik asit miktarı 540 µl’den büyük olduğunda çap tekrar artmaya başlamıştır. Dolayısıyla askorbik asit miktarı 540 µl’den büyük olduğunda nanoçubuğun çapı yönünde büyüme gösterdiği söylenebilir. Hatta bu değerden sonra artık yapının merkeze doğru bir inceleme göstererek dambıl şeklinde yapılar oluşturduğu Şekil 4.31 D ve E’de görülmektedir. Ayrıca 540 µl ’den daha büyük askorbik asit miktarlarında elde edilen nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumlarında da 587 nm dalga boyunda pikler görülmektedir (Şekil 4.30). Bu da oluşan dambıl şeklindeki yapılardan kaynaklanan plasmon pikleridir. İndirgeme hızı indirgeme ajanının derişimine bağlıdır. Askorbik asit miktarı arttıkça indirgeme daha hızlı olup, surfaktant madde nanoçubuğun gelişim yönünü sınırlamadan önce indirgeme reaksiyonu gerçekleşir. Surfaktant maddenin nanoçubuğun yüzeyine adsorpsiyonu altın prekürsörün indirgemesine karşı yarışmaktadır. İndirgeme ajanı derişimi arttığında altın prekürsörlerin indirgenmesi daha hızlı olacağından dambıl şeklinde nanoçubukların elde edildiği literatürde rapor edilmiştir (Sharma, 2006) .

4.1.5.6. Çekirdek çözelti miktarı

Altın nanoçubuk sentezindeki en son aşama daha önce hazırlanan çekirdek çözeltisinin belli bir aging süresinden sonra geliştirme çözeltisine ilave edilmesidir. Çekirdek çözeltisinin ilave edilmesiyle geliştirme çözeltisinde bulunan askorbik asit ile Au^{1+} ’in Au^0 indirgeme reaksiyonu başlamaktadır. Çekirdek çözelti miktarının oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranlarına olan etkisini incelemek

amacıyla daha önce hazırlanan ve 5 saat reaktif hale gelmesi için beklenen çekirdek çözeltisinden 210 µl; 420 µl ve 840 µl olmak üzere üç farklı miktarda çekirdek çözeltisi kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. Altın nanoçubuk genel sentez reçetesi aynen uygulanmıştır. Şekil 4.32 ve Şekil 4.33'de farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ve TEM görüntüleri verilmiştir. Ayrıca farklı çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların özellikleri Çizelge 4.12'de gösterilmiştir.



Şekil 4.32. Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) 210 µl b) 420 µl c) 840 µl.

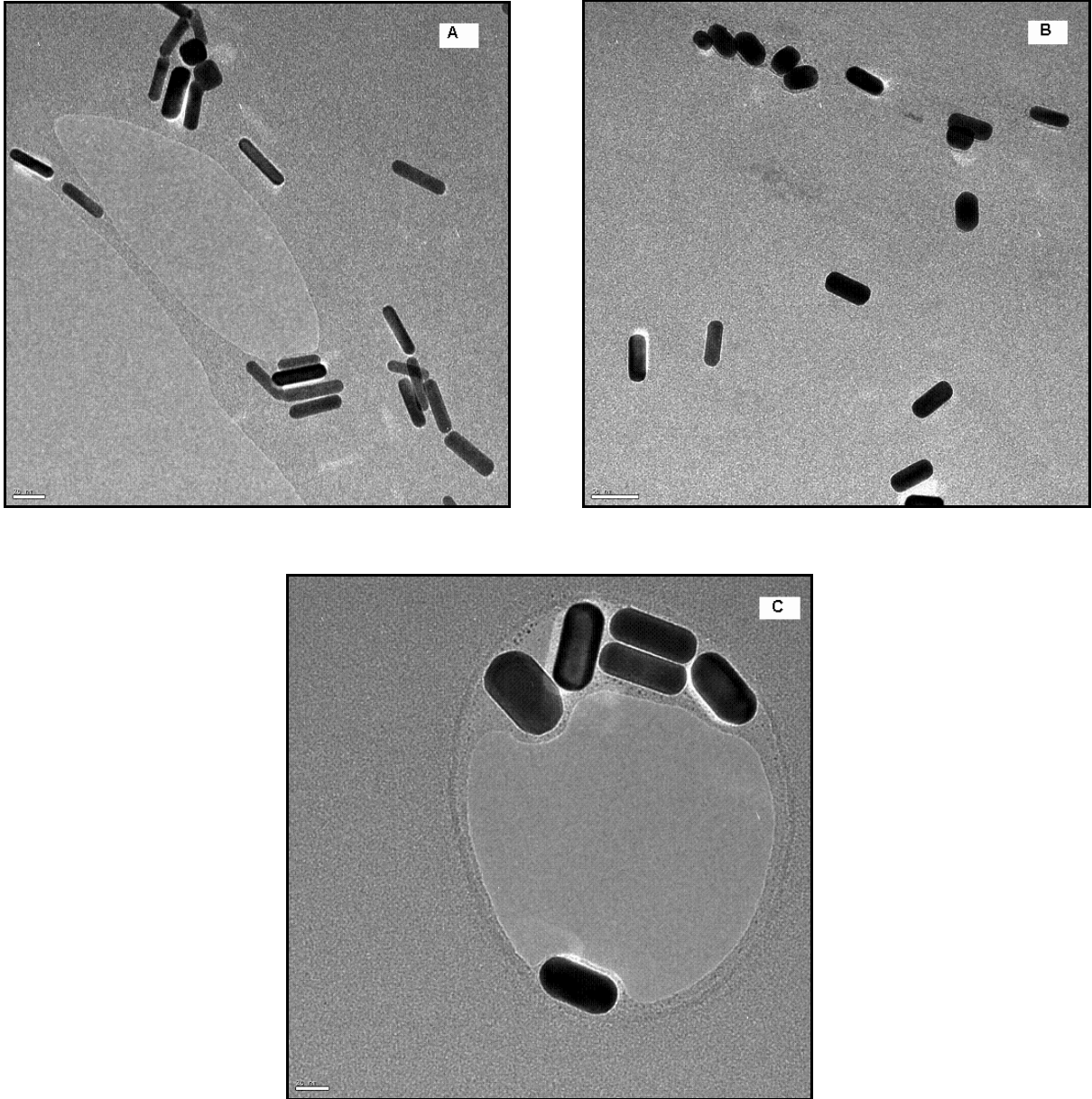
Şekil 4.32'de görüldüğü üzere çekirdek çözelti miktarı arttıkça altın nanoçubukların aksel yöndeki plasmon dalga boylarının dolayısıyla aspect ratio oranlarının azaldığı görülmüştür. 210 µl çekirdek çözeltisiyle elde edilen altın nanoçubuğun aksel yöndeki plasmon dalga boyu 836 nm iken dört kat fazla çekirdek çözeltisinin kullanıldığı altın nanoçubuğun aksel plasmon dalga boyu 629 nm'dir. Çekirdek çözelti miktarı arttıkça aksel plasmon dalga boyu küçülmekte dolayısıyla aspect ratio oranı azalmıştır. Çekirdek çözelti miktarı arttıkça içindeki çekirdek nanoparçacık sayısı artmakta ve daha uzun nanoçubuk miselleri oluşturulabilirken askorbik asit

miktarı sabit kaldığı için çapı boyunca gelişim hızı aksel yöndeki gelişim hızından daha büyük olmaktadır. Bu nedenle çekirdek çözelti miktarı arttıkça çap yönündeki büyüme nedeniyle aspect ratio oranı azalmaktadır. Literatürde de benzer sonuçların elde edildiği rapor edilmiştir Ancak sabit Ag^+ derişiminde altın nanoçubuk geliştirme çözeltisine eklenen çekirdek çözeltisinin miktarı ayarlanarak altın nanoçubukların aspect ratio oranlarının kontrol edilebileceği ifade edilmiştir (Perez-Juste, 2005).

Çizelge 4.12. Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile elde edilen altın nanoçubukların özellikleri

| Çekirdek Çöz. Miktarı (μ l) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|-------------------------------------|----------------|-----------|--------------------------|----------------------|----------------------------|
| 210 | 836 | 1.96 | 25.9 | 5.2 | 4.8 |
| | 525 | 1.64 | | | |
| 420 | 792 | 1.98 | 45.3 | 13.2 | 3.4 |
| | 520 | 1.21 | | | |
| 840 | 629 | 2.45 | 47.6 | 22.6 | 2.1 |
| | 519 | 1.63 | | | |

Çizelge 4.12'de görüldüğü üzere çekirdek çözelti miktarının artmasıyla aksel plasmon absorbans değeri 1.96'dan 2.45'e yükselmiştir. Buna dayanarak çekirdek çözelti miktarı arttıkça verimin arttığı söylenebilir. Ayrıca aspect ratio oranı da 4.8'den 2.1'e azalmıştır.



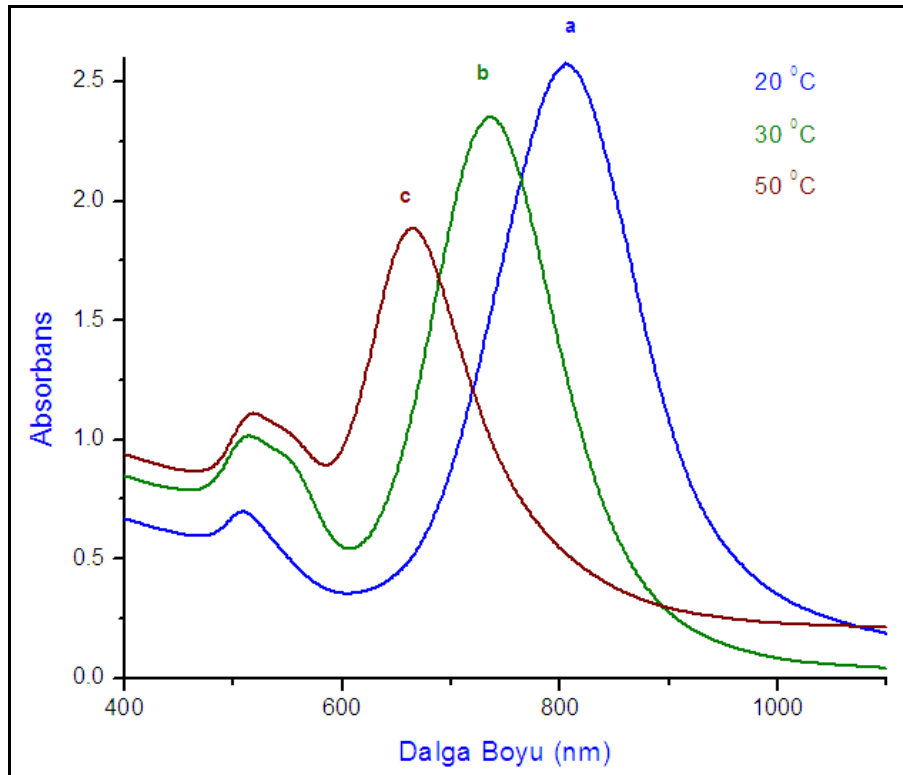
Şekil 4.33. Farklı miktarlarda çekirdek çözeltisi ile oluşturulan altın nanoçubukların TEM görüntüleri. a) 210 µl b) 420 µl c) 840 µl. (A ve C'de skala bar 20 nm, B'de ise 50 nm'dir).

Şekil 4.33'de verilen TEM görüntülerine göre her üç çekirdek çözelti miktarında silindirik şekilde nanoçubuk yapıların oluştuğu görülmüştür. Çekirdek çözelti miktarı arttıkça ortalama uzunluk değeri 25 nm'den 47 nm'ye artmıştır. Çekirdek sayısının artmasıyla oluşan nanoçubuk misellerinin artmasından kaynaklanmaktadır. Ortalama çap değerleri ise çekirdek çözelti miktarının artmasıyla 5 nm'den 22 nm'ye artmıştır. 210 µl çekirdek çözeltisi kullanıldığında yaklaşık 25 nm uzunluğunda 5 nm çapında

nanoçubuklar elde edilirken çekirdek çözelti miktarı dört kat artırıldığında uzunluğu iki kat çapı dört kat artan 47 nm uzunluğunda 22 nm çapında nanoçubuklar elde edilmiştir (Şekil 4.33 A ve C).

4.1.5.7. Reaksiyon sıcaklığının etkisi

Nanoçubuk üretimindeki reaksiyon sıcaklığının nanoçubuğun uzunluk/çap oranına ve dolayısıyla optik özelliğine olan etkisini incelemek için yapılan sentezlerde daha önce verilmiş olan altın nanoçubuk genel sentez reçetesi kullanılmış olup reaksiyon sıcaklığı hariç diğer deneysel koşulların hepsi aynı tutulmuştur. Yalnızca reaksiyon sıcaklığı 20 °C, 30 °C ve 50 °C olacak şekilde 3 farklı sıcaklıkta altın nanoçubuklar üretilmiştir. Çizelge 4.13'de farklı sıcaklıklarda sentezlenen altın nanoçubukların özellikleri verilmiştir. Şekil 4.35 ve Şekil 4.34'de sırasıyla sıcaklığın altın nanoçubukların uzunluk/çap oranına etkisini gösteren TEM görüntüleri ve optik özelliğine olan etkisini gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumu verilmiştir.



Şekil 4.34. Farklı sıcaklıklarda sentezlenen altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

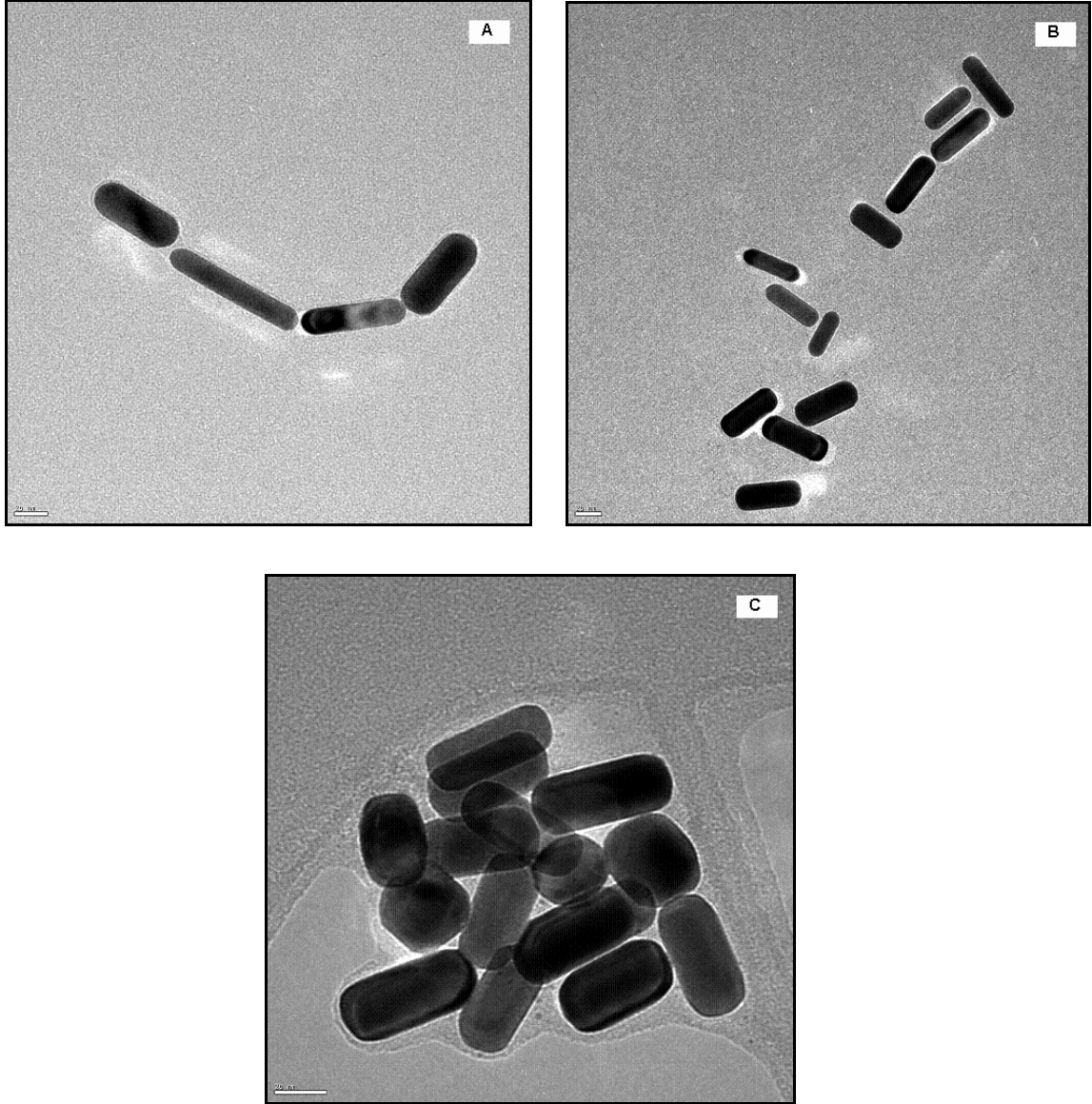
Şekil 4.34'de görüldüğü gibi 50°C sıcaklıkta elde edilen nanoçubuklar 665 nm dalga boyunda eksenel plasmon piki verirken 20 °C'de 807 nm dalga boyunda eksenel plasmon piki vermektedir. Sıcaklık arttıkça eksenel plasmon dalga boyunun azaldığı dolayısıyla uzunluk/çap oranlarında azaldığı görülmüştür. Ayrıca sıcaklık arttıkça eksenel plasmon pikinde verdiği absorbands değerleri 50 °C'de 1.88 iken 20 °C'de 2.57 'dir. Bu değerlere bakarak sıcaklık arttıkça nanoçubuk oluşum veriminin azaldığı söylenebilir.

Çizelge 4.13. Farklı sıcaklıklarda sentezlenen altın nanoçubukların özellikleri.

| Sıcaklık (°C) | λ (nm) | Absorbans | Ortalama uzunluk (nm) | Ortalama çap (nm) | Uzunluk/çap (A.R) oranı |
|---------------|----------------|-----------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| 20 | 807 | 2.57 | 62.8 | 14.7 | 4.3 |
| | 509 | 0.69 | | | |
| 30 | 738 | 2.35 | 44.7 | 15.2 | 3.0 |
| | 514 | 1.01 | | | |
| 50 | 665 | 1.88 | 41.7 | 19.7 | 2.1 |
| | 518 | 1.01 | | | |

Çizelge 4.13'de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça nanoçubukların uzunluk/çap oranı 4.3' den 2.1'e azalmıştır. Sıcaklığın artmasıyla nanoçubukların ortalama çap değerlerinin arttığı bu da uzunluk/çap oranının azalmasına neden olduğu görülmüştür. Sıcaklıkla nanoçubukların ortalama uzunluğu 62 nm'den 41 nm'ye azalırken ortalama çapı 14 nm'den 19 nm'ye artmıştır. Dolayısıyla sıcaklık arttıkça uzunluk azalırken çapın büyüdüğü söylenebilir. Düşük sıcaklıklarda indirgeme hızının azalmasına bağlı olarak nanoçubukların oluşumundaki büyümenin sadece çubuğun çapı boyunca olmasından kaynaklandığı belirtilmiştir. İlgili literatürde de sıcaklığın artmasıyla uzunluk/çap oranının azaldığı belirtilmiştir (Zijlstra, 2006). Jana ve arkadaşları çekirdek geliştirme yöntemiyle altın nanoçubuk üretiminde yüzey aktif madde olarak kullanılan CTAB misellerinin 50 °C'nin üzerindeki yüksek sıcaklıklarda bozulduğunu 50 °C'nin altındaki sıcaklıklarda oluştuğunu belirtmişlerdir. Template, metot, fotokimyasal, elektrokimyasal ve çekirdek geliştirme yöntemi gibi değişik

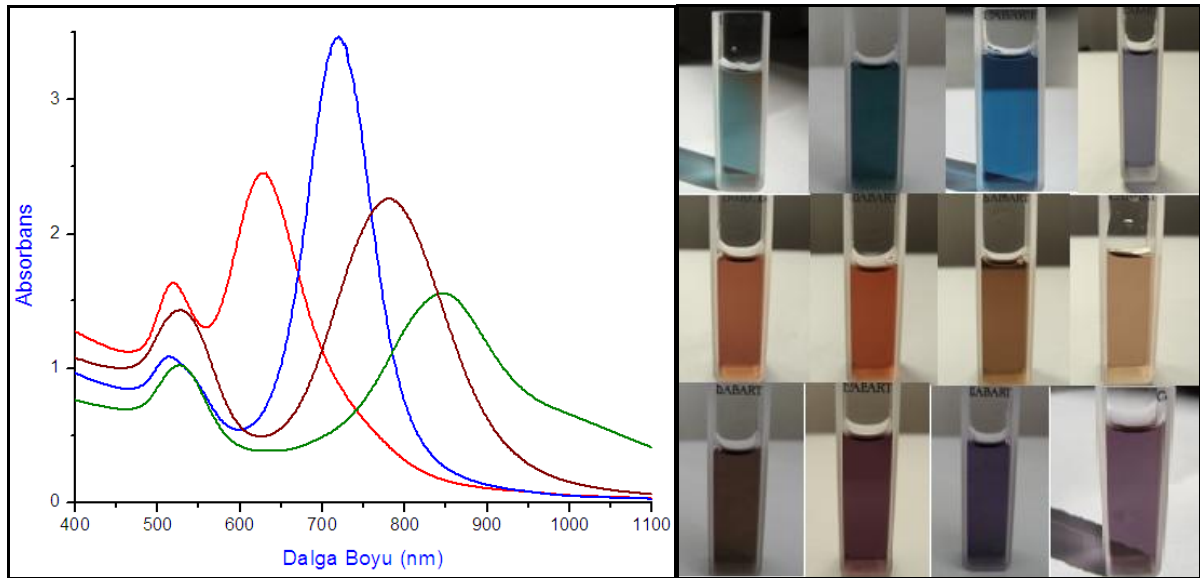
yöntemler ile üretilen altın nanoçubukların hep oda sıcaklığında yapıldığı ifade edilmiştir (Jana, 2005). Ayrıca Perez-Juste ve arkadaşları da oda sıcaklığında yüksek verimde altın nanoçubukların elde edildiğini belirtmişlerdir (Perez-Juste, 2004).



Şekil 4.35. Farklı sıcaklıklarda sentezlenen nanoçubukların TEM görüntüleri a) 20 °C b) 30 °C c) 50 °C. (Skala bar 20 nm'dir).

Şekil 35'de verilen TEM görüntülerinde her üç sıcaklıkta da silindirik şekilde altın nanoçubukların elde edildiği görülmektedir. 20 °C de uzun ve ince silindirik yapılar oluşurken 50 °C'de daha kısa ve kalın silindirik yapılar oluşmuştur.

Yapılan tüm bu çalışmalar sonucunda farklı uzunluk/çap oranına sahip farklı renkte ve farklı optik özellik gösteren altın nanoçubuklar üretilmiştir. Altın nanoçubuk sentezinde kullanılan reaktiflerin altın nanoçubukların optik özelliklerine olan etkisi incelenmiştir. Kısacası aynı deneysel koşulları sağlamamıza karşın farklı yapıda ve optik özellikte çok çeşitli nanoçubuklar elde dilmektedir. İstenilen uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuk üretiminin tekrar edilememesi büyük bir problem oluşturmaktadır. Literatürde de aynı deneysel koşullara karşın birkaç kez altın nanoçubuk sentezinde hep farklı aspect ratio oranında altın nanoçubuk oluşturulduğu rapor edilmiştir (Jiang, 2006). Şekil 4.36'da farklı optik özelliklere sahip altın nanoçubukların UV/Vis absorpsiyon spektrumları ile birlikte çözelti renkleri verilmiştir.



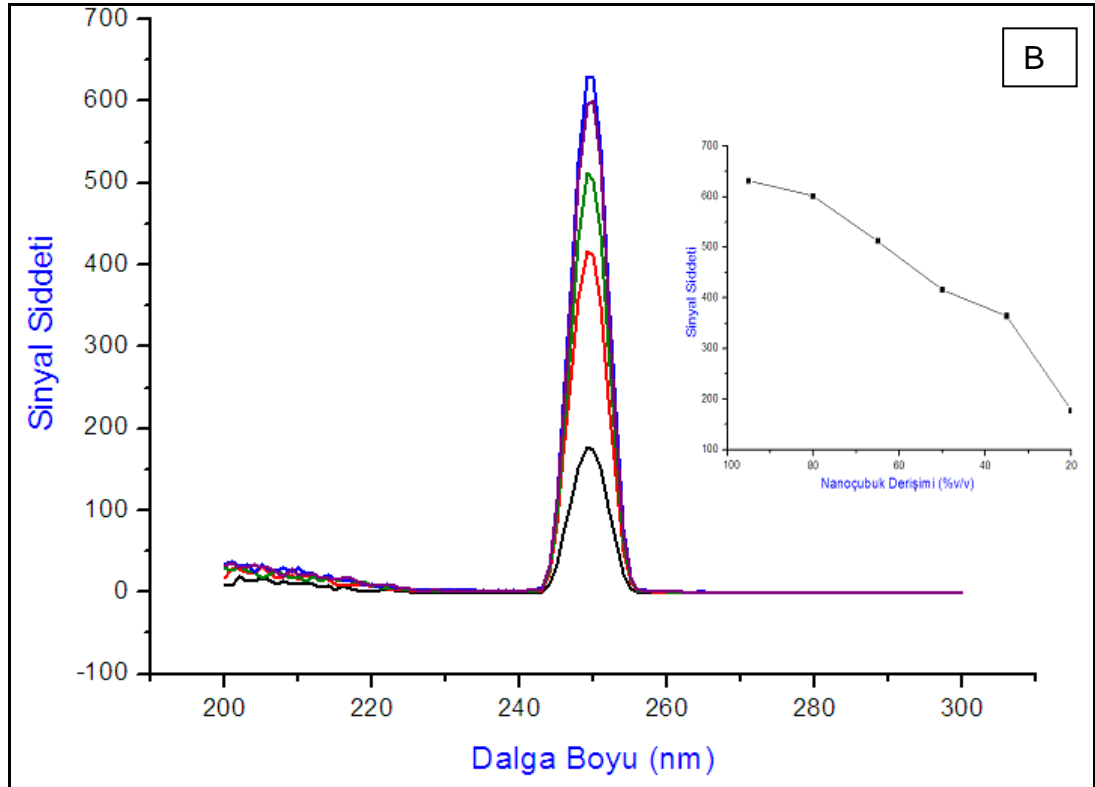
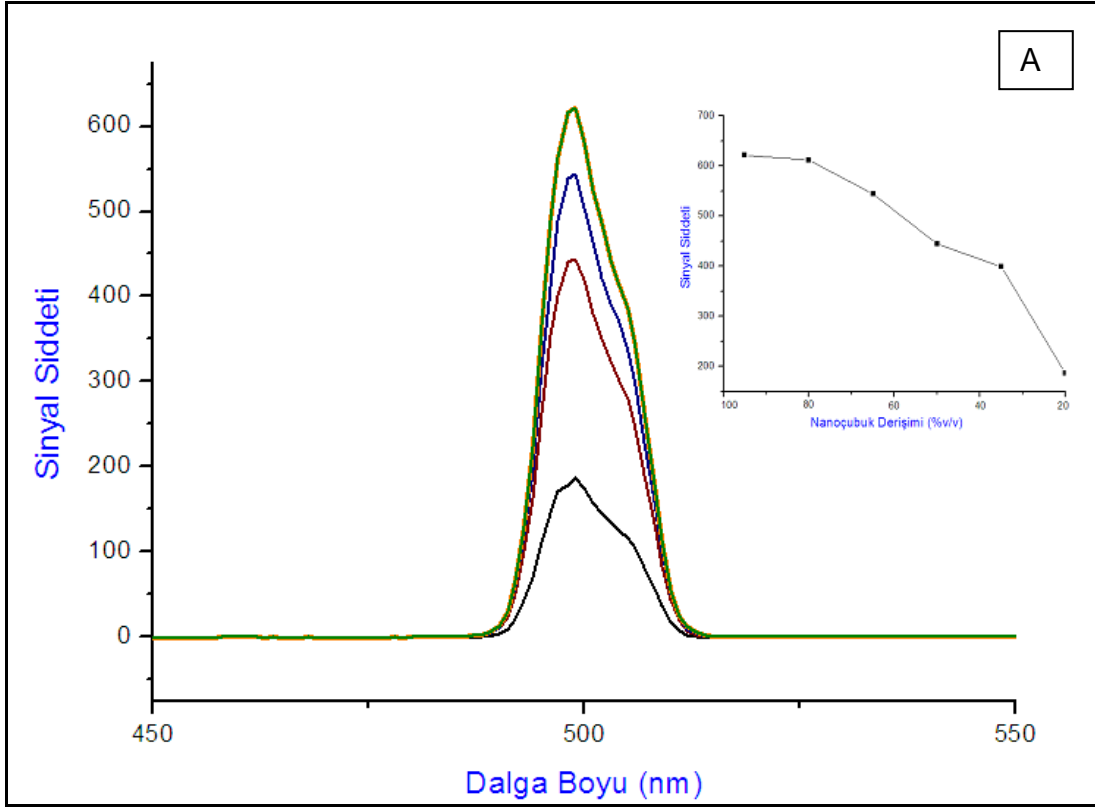
Şekil 4.36. Farklı dalga boyu aralıklarında oluşturulan altın nanoçubukların UV/Vis spektrumu ve çözelti renkleri.

Çözelti rengi kırmızımsı kahve olanların aksel plasmon dalga boyları mavi ve mavinin tonları rengindeki çözeltilerden daha büyük olduğu görülmüştür. Çözelti rengi mavi ve tonları olan altın nanoçubukların aspect ratio oranları düşükken bu oran arttıkça çözelti rengi kırmızımsı kahve ve açık kahveye dönmektedir. Bu şekilde aksel plasmon dalga boyu 600-900 nm aralığında aspect ratio oranı 2.0-5.0 aralığında olan gök kuşağı şeklinde farklı optik özelliklere sahip altın nanoçubuklar elde edilebilmiştir.

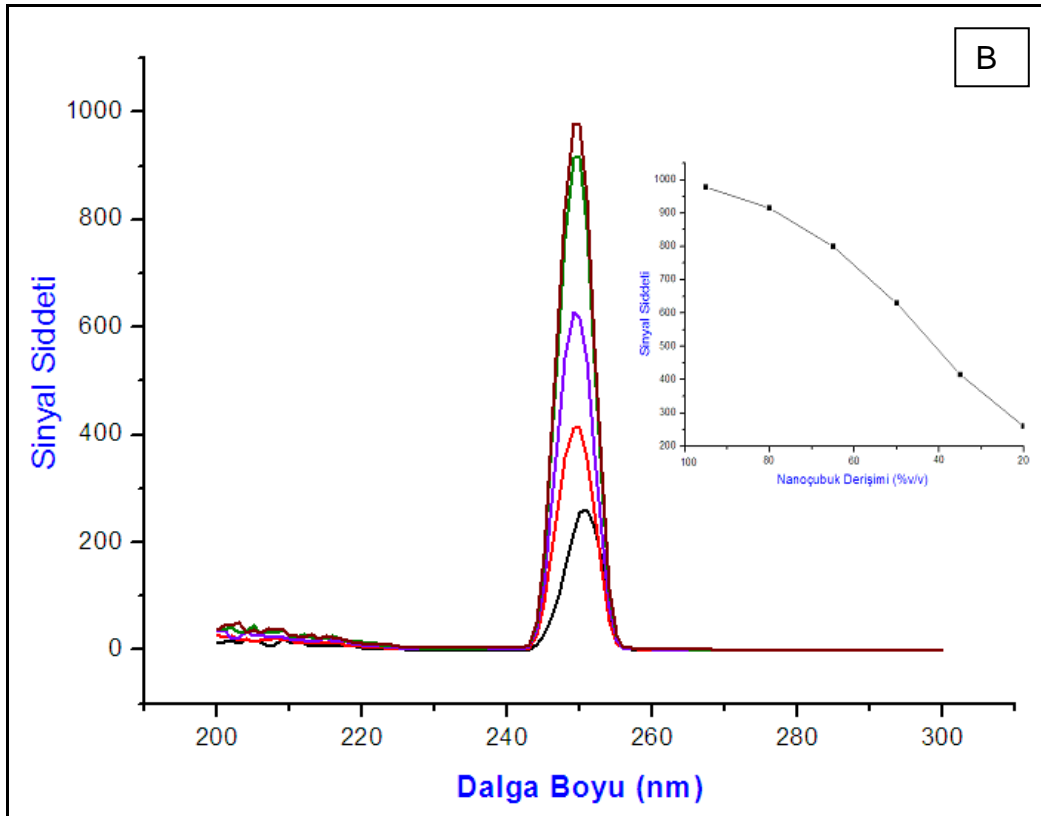
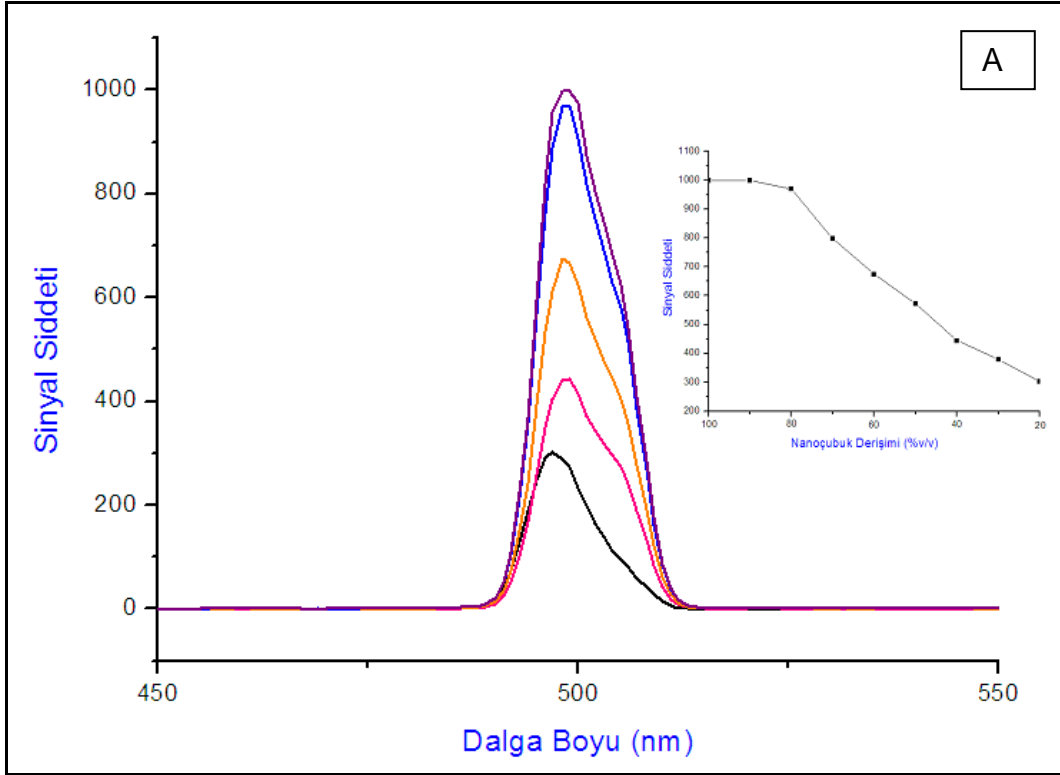
4.1.6. Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu

4.1.6.1. Altın nanoçubukların fluoresan özellikleri

Tez kapsamında mikroemülsüyon fazda altın nanoçubukların DNA tanı kiti ve nanoarray çalışmalarında kullanılmak üzere iki farklı altın nanoçubuk seçilmiştir. Bunlardan biri aspect ratio oranı 4.8 olan kırmızımsı-kahve olan altın nanoçubuk diğeri ise mavi renkli aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuktur. Seçilen bu iki altın nanoçubuğun fluoresan özelliği incelenmiştir. Altın nanoçubukların fluoresan özellik gösterdiği ve bu özelliklerinin kullanıldığı birçok uygulama alanı bulunmaktadır (Pissuwan, 2008; Huang 2006; Huang 2007; Durr, 2007; Li, 2007, Kim, 2007). Fluoresan özelliklerini incelemek için Fluoresan spektrofotometre cihazı kullanılmış olup uyarılma dalga boyu 280 nm'de sabit tutularak, emisyon spektrumu 400-600 nm aralığında taranmıştır. Tarama sonucu her bir partikül için maksimum emisyon dalga boyu bulunmuştur. Her bir partikül için bulunan emisyon dalga boyu sabit tutularak, uyarılma dalga boyu için 200-300 nm arasında maksimum dalga boyu taraması yapılarak emisyon, uyarılma dalga boyları ve fluoresan sinyal şiddeti değerleri belirlenmiştir. Farklı derişimlerde altın nanoçubuklar hazırlayarak derişim ile fluoresan sinyal şiddetindeki değışimler incelenmiştir. Şekil 4.37'de aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuğun emisyon ve uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.37 içinde farklı derişimde hazırlanmış altın nanoçubukların derişime karşılık fluoresan sinyal şiddeti grafikleri gösterilmiştir. Şekil 4.38'de ise aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuğun emisyon ve uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları verilmiştir. Şekil 4.38 içinde farklı derişimde hazırlanmış altın nanoçubukların derişime karşılık fluoresan sinyal şiddeti grafikleri gösterilmiştir.



Şekil 4.37. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuğun a) emisyon b) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları.



Şekil 4.38. Aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuğun a) emisyon b) uyarılma dalga boylarına karşılık fluoresan sinyal şiddeti spektrumları.

Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de görüldüğü üzere 4.8 ve 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklar 249 nm'de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Görüldüğü gibi aspect ratio oranının değişmesi ile uyarılma ve emisyon dalga boylarında herhangi bir değişim olmayıp her ikisinde aynı dalga boylarında uyarılıp aynı dalga boylarında emisyon vermişlerdir. UV/Vis absorpsiyon spektrumlarındaki gibi aspect ratio oranına bağlı olarak uyarılma ve emisyon dalga boylarında değişim gözlenmemiştir.

Fluoresan sinyal şiddetlerine bakıldığında 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklar 1000 civarında bir sinyal şiddeti verirken 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklar 650 civarında sinyal şiddeti vermişlerdir. Buna göre 2.1 aspect ratio oranındaki nanoçubukların 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklardan daha iyi fluoresan özellik gösterdiği söylenebilir. Literatürde nanoçubukların eksenel uzunlukları arttıkça fluoresan özelliklerinin de arttığı rapor edilmiştir (Mohamed, 2000; Zhu, 2004; Imura, 2004; Varnavski, 2003; Nicewarner-Pena, 2003; Dickson, 2000). Aspect ratio oranı 2.1 olan nanoçubukların ortalama uzunluğu 40 nm iken 4.8 aspect ratio oranına sahip olan altın nanoçubuğun ortalama uzunluğu ise 32 nm'dir. Dolayısıyla eksenel boyu uzun olan 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuğun fluoresan sinyal şiddetinin diğerine göre büyük olması nedeniyle boyu uzun olan nanoçubuğun daha iyi fluoresan özellik gösterdiği tarafımızca da gözlemlenmiştir. Ayrıca literatürde eksenel uzunluğu 30 nm'den küçük olan altın nanoçubukların herhangi bir fluoresan özellik göstermedikleri rapor edilmiştir (Mohamed, 2000).

Şekil 4.37 ve Şekil 4.38 içinde farklı derişimlerde hazırlanmış altın nanoçubukların derişime karşı fluoresan sinyal şiddeti grafikleri verilmiştir. Şekil 4.37 ve 4.38'den görüldüğü gibi hem 4.8 hem de 2.1 aspect ratio oranına sahip her iki altın nanoçubuğun derişimi azaldıkça fluoresan sinyal şiddeti azalmıştır. Literatürde de altın nanoçubuk derişimi azaldıkça fluoresan sinyal şiddetinin azaldığı belirtilmiştir. (Li, 2005). Yapılan çalışma sonucu literatür ile aynı olan sonuçlar elde edilmiştir.

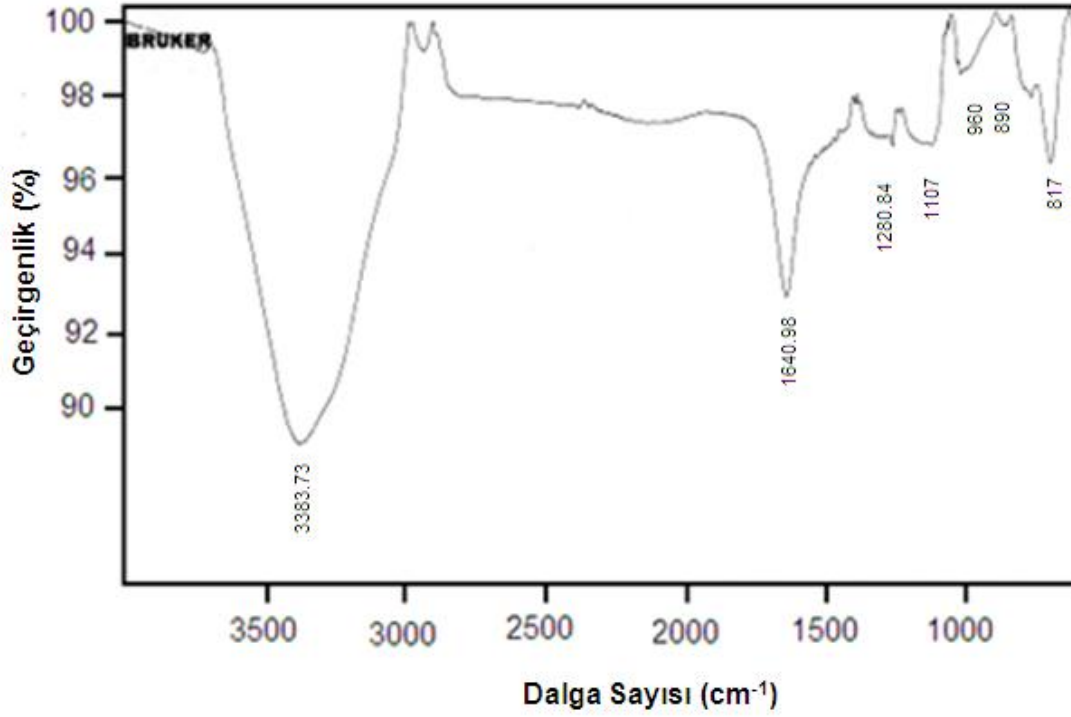
4.1.6.2. ATR analizi

Araştırma kapsamında üretilen altın nanoçubukların ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) kurutma sonrası ATR spektrumları çekilmiştir. Altın nanoçubukların ATR spekturumu Şekil 4.39' da verilmiştir. Karakterize edilen nanoçubukların ATR spektrumlarında görülen karakteristik pikleri Çizelge 4.14'de sunulmaktadır.

Çizelge 4.14. Altın nanoçubukların ATR spektrumunda görülen karakteristik pikleri.

| Dalga Sayısı (cm^{-1}) | Karakteristik pik |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| 3383 | OH gerilimi |
| 1640 | CH_2 titreşim |
| 1280 | C-N gerilim titreşimi |
| 1107 | $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı |
| 960 | $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı |
| 890 | $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı |
| 817 | $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı |

Çizelge 4.14'de görüldüğü gibi, altın nanoçubukların ATR spektrumunda, sentez sırasında yüzey aktif madde olarak kullanılan setil trimetil amonyum bromür (CTAB) molekülünden gelen $-\text{CH}_2$ titreşim frekansı spektrumda 1640 cm^{-1} , $-\text{C-N}$ gerilim titreşimi 1280 cm^{-1} civarında açığa çıkmaktadır. $1107, 960, 890, 817 \text{ cm}^{-1}$ deki piklerin varlığı CTAB molekülünün altın nanoçubuk yüzeyine $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı ile bağlandığını göstermektedir. Literatürde $1500\text{-}800 \text{ cm}^{-1}$ arası olan pikler CTAB ile altın nanoçubuk arası etkileşimi gösteren pikler olduğu belirtilmiştir. Gözlenen spektrumlara ait yorumlar literatür ile tamamen uyuşmaktadır (Gole, 2004).

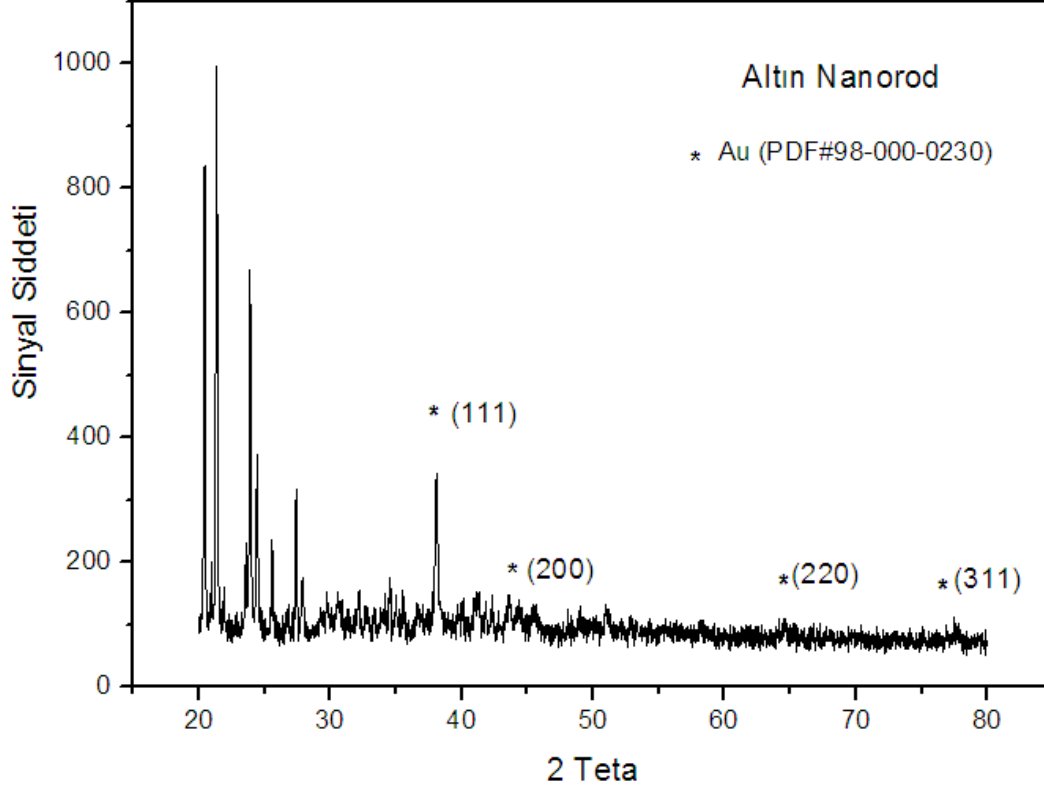


Şekil 4.39. Altın nanoçubukların tipik bir ATR spektrumu

4.1.6.3. X-Işınları kırılması (X-RD) analizi

Sentezlenen altın nanoçubukların kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış ve ilgili spektrum Şekil 4.40'da sunulmuştur. Altın kristalleri için verilmiş ASTM kartları (PDF 98-000-0230) kullanılarak altın kristallerine ait piklerin yerleri belirlenmiştir.

Şekil 4.40'da görüldüğü gibi yıldızla işaretli pikler altın nanoçubuklara ait karakteristik pikler olup diğer piklerde yüzey aktif madde olarak kullanılan CTAB moleküllerinin tam olarak uzaklaştırılmadığından kaynaklanan piklerdir.

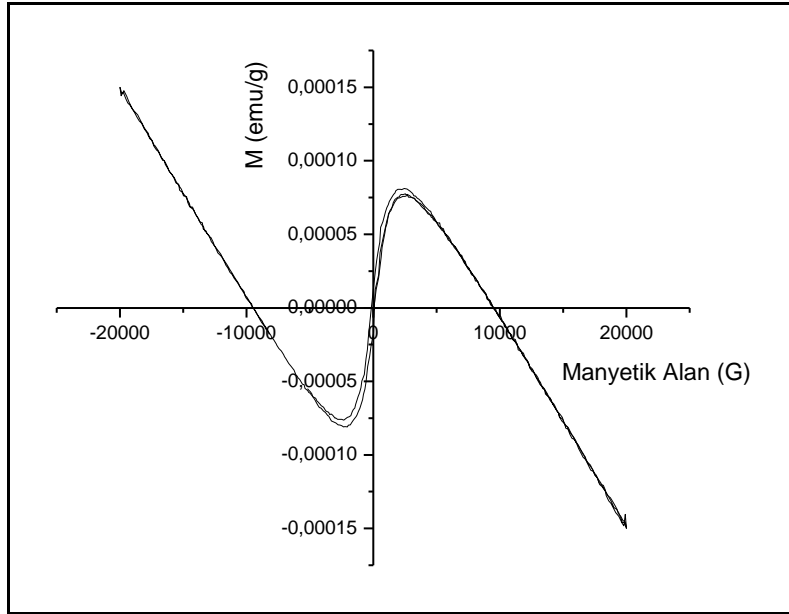


Şekil 4.40. Altın nanoçubukların tipik bir X-RD spektrumu.

Altın nanoçubuğun X-RD spektrumundaki piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Wu ve arkadaşları çekirdek geliştirme yöntemi ile yüksek verimde büyük uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklar sentezlemişlerdir. Ortalama uzunluğu 355.3 nm çapı 18.7 nm (uzunluk/çap oranı 19) olan altın nanoçubukların X-ışınları kırılması analizi sonucunda 2 teta değeri 37 iken (111) difraksiyon pikinin diğer piklerden daha güçlü olduğunu ve sinyal şiddetinin 3000'lerde olduğunu göstermişlerdir. Bu da altının (111) kafes yapısının altın nanoçubukların uzun eksenine paralel yönde uzadığını ve uzun ince yapıda altın nanoçubukların varlığını gösterdiğini belirtmişlerdir (Wu, 2007). Dolayısıyla tez kapsamında sentezlenen altın nanoçubuğun X-RD spektrumundan da görüldüğü gibi 2 teta değeri 37 iken (111) difraksiyon pikinin diğer piklerden güçlü olduğu ve sinyal şiddetinde literatürdeki kadar binler seviyesinde olmayıp 400'lerde olduğu görülmektedir (Şekil 4.40). (111) difraksiyon piki sinyal şiddetinin literatüre göre düşük olmasının nedeni sentezlediğimiz altın nanoçubukların uzunluk/çap oranı daha küçük altın nanoçubuklar olmasından kaynaklanmaktadır.

4.1.6.4. Manyetometre ile manyetik özelliklerinin belirlenmesi

Çalışma kapsamında sentezlenen altın nanoçubukların manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiştir. Bir manyetik alan içindeki nanoçubukların manyetik özellikleri birim kütle başına manyetik moment (emu) şeklinde ifade edilmiştir. Nanoçubukların manyetik alana karşı doygunluk mıknatıslığı eğrisi Şekil 4.41’de gösterilmiştir.



Şekil 4.41. Altın nanoçubuklarının mıknatıslık eğrisi

Şekil 4.41’de görüldüğü üzere sentezlenen altın nanoçubukların diyamanyetik özellik gösterip bazı safsızlıklardan dolayı da azda olsa paramanyetik etkilerde gözlenmiştir. Toplam manyetik momenti sıfır ya da çok küçük olan atomlar diyamanyetik davranışlar gösterirler. Altın, gümüş, bakır, elmas, grafit, bizmut gibi bazı katılar bu gruba girer. Bir manyetik alana getirilen diyamanyetik bir madde, daima alan şiddetini zayıflatacak biçimde bir etki yapar. Dolayısıyla altın nanoçubukların diyamanyetik malzemeler olduğu ve herhangi bir manyetik alana karşı manyetik özellik göstermediği görülmüştür.

4.2. Nanopartiküllerin Nanotıp Uygulamaları

Son yıllarda çeşitli hastalıkların teşhis ve tanısı, çevresel kirliliklerin ve biyolojik ajanların belirlenmesi için yüksek seçicilik ve hassasiyette optik nanobiyosensörler geliştirilmektedir. Bu biyosensör uygulamalarında özellikle Au ve Ag gibi metalik nanopartiküllerin eşsiz optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Au nanopartiküllerin kararlı olması, toksik olmaması ve yüzeyine biyolojik moleküllerin kolay bağlanması gibi avantajları nedeniyle çok kullanılan metalik nanopartiküllerdir.

Altın nanoyapıların süspanse olduğu çözeltiler boyut ve geometrik şekillerine bağlı olarak güçlü plasmon bandları göstermektedirler (Perez-Juste, 2005). Altın nanoyapıların biyolojik reseptör (antibadi, oligonükleotit) molekülleri ile aktivasyonu sonucu dielektrik özelliklerinin değişimine bağlı olarak plasmon dalga boylarında red-shift denilen dalga boyu kaymasına neden olmaktadır. Bu özelliklerine dayanan birçok uygulamalar bulunmaktadır (Nath, 2004; Yonzon, 2004; Haes, 2002; Lee, 2005). Mirkin ve arkadaşları yüzeyine DNA bağlanmış altın nanopartiküllerin eşleniği ile hibridizasyonu sonucu renk değişimini gözlemleyerek DNA hibridizasyonunu tayin etmişlerdir (Mirkin, 1997; Jin, 2003; Taton, 2000). Lee ve Perez-Jana epoksi ile fonksiyonlandırılmış altın nanoyapıların yüzeyine protein bağlanması sonucu plasmon spektrumlarındaki değişimleri incelemişlerdir (Lee, 2005). Süspansiyon esaslı immunoassay geliştirmek amacıyla küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki antibadinin antijenle etkileşimi sonucu refraktif indeksinin dolayısıyla plasmon spektrumundaki değişim araştırılmıştır (Englebienne, 1998; Englebienne, 2000). Hedef molekülün bağlandığı plasmon spektrumundaki dalga boyu kayması ya da belli bir dalga boyundaki absorpsiyon yoğunluğunun değişimi ile analiz edilmekte olup dalga boyu kaymasının incelenmesinin daha hassas olduğu rapor edilmiştir (Yu,2006). Altın nanoçubuklar hem aksenel hemde radyal yönde plasmon bandı göstermektedirler. Özellikle aksenel yöndeki plasmon dalga boyları buldukları ortamın dielektrik özelliklerinin değişimine daha duyarlıdır. Örneğin ortamın refraktif indeksindeki 0.1 birimlik bir değişim bile altın nanoçubukların aksenel plasmon dalga boyunda 40 nm'lik bir dalga boyu kaymasına neden olduğu belirtilmiştir (Perez-Juste, 2005). Bu duyarlılığın altın nanoçubukların uzunluk/çap (aspect ratio) oranının artmasıyla daha çok arttığı rapor edilmiştir. El-Sayed ve arkadaşları altın nanoçubukların aspect ratio oranlarındaki en ufak bir değişikliğin

çözelti renginde ve plasmon spektrumunda değişikliğe neden olduğunu belirtmişlerdir. Literatürde altın nanoçubukların bu özelliklerinden yararlanılarak farklı özelliklerdeki nanoçubuklarla birden fazla analitin eş zamanlı tayin edildiği multipleks biyosensörleri geliştirilmeye çalışılmıştır. Yu ve arkadaşları farklı aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklara farklı antijenler bağlayarak altın nanoçubuk problemleri hazırlayarak bunların hedefleri ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boylarındaki kaymayı inceleyerek multipleks biyosensörler geliştirmişlerdir (Yu, 2006). Wang ve arkadaşları E. coli and anti-S. Typhimurium patojenik bakterilerine özgü antibadillerle hazırladıkları altın nanoçubuk problemlerin ilgili antijenleri ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyu kaymalarını inceleyerek patojenleri tayin etmişlerdir (Wang, 2008).

Ayrıca son yıllarda DNA hibridizasyonu, antijen antibadi etkileşimi gibi moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için Au film tabakası yerine Au nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektirik sabiti ve dolayısıyla refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir Au nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Ayrıca Au ve Ag nanopartiküllerinin partikül boyuna ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler göstermesi nedeniyle birden fazla analitin eş zamanlı tayininde yapıldığı SPR biyosensörleri de geliştirilmektedir.

Tez kapsamında son yıllarda çok yoğun bir şekilde araştırmalar yapılan, özellikle nanoboyutta beklenmedik optik özellikleri olan ve kolaylıkla modifiye edilerek aktif ajan (prob) bağlanabilen altın nanoyapılar ile hem mikroemülsiyon fazda ve hem de cam taşıyıcı yüzeylere tek tabakalı adsorbe edilerek, alternatif DNA tanı kitleri ve nanoarrayler geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Daha önceki bölümde üretilip optik özellikleri incelenen küresel altın nanopartikül, altın nanoçubuk ve çekirdek/kabuk yapısında altın kaplı manyetik nanopartiküller olmak üzere üç farklı altın nanoyapıların üretimi ve optik özellikleri incelenmiştir. Bu

bölümde ise üretilen bu altın nanoyapılar ile mikroemülsiyon fazda DNA tanı kiti veya nanoarray geliştirilmesi ve SPR destekli elipsometre esaslı biyosensör geliştirilmesi olmak üzere iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları yapılmıştır. Altın nanoyapılar ile yapılan bu iki farklı nanotıp uygulaması çalışmaları ayrı başlıklar altında anlatılmıştır.

4.2.1. Mikroemülsiyon Fazda DNA Tanı Kiti veya Nanoarray Çalışmaları

Sunulan bu çalışmada, boyut ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler gösteren altın nanopartiküllerin bu optik özelliklerinden faydalanarak *M. Tuberculosis* Kompleksi'ne (MTB) ve *M. gordonae* patojenine özgü süspansiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti veya DNA arraylerin oluşturulması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının bu kısmında Bölüm 4.1'de ayrıntılı olarak ele alınan farklı boy, şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu sonucu süspansiyon fazda DNA tanı kiti veya nanoarray geliştirilmesini araştırmak üzere dört farklı altın nanopartikül ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlar; 13 nm ortalama partikül çapına sahip küresel altın nanopartikül, uzunluğu 32.3 nm çapı 6.7 nm (uzunluk/çap oranı 4.8) olan altın nanoçubuk, uzunluğu 40 nm çapı 19 nm (uzunluk/çap oranı 2.1) olan altın nanoçubuk, ortalama çapı 87 nm olan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerdir. Süspansiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti veya nanoarray geliştirilmesi çalışmalarında *M. gordonae* patojenine özgü oligonükleotid probu (GOR) ve eşlenik hedef dizisi, MTB patojenlerine özgü oligonükleotid probu ve eşlenik hedef dizisi kullanılmıştır. Çalışılan oligonükleotid dizileri aşağıdaki gibidir:

Çizelge 4.15. Oligonükleotid baz dizi.

Oligonükleotid baz dizileri

GOR prob dizisi: $5'-HS-(CH_2)_6-(T)_{15} CAC CCT CGG GTG CTG TC-3'$

GOR eşlenik dizisi: $5'-GA CAG CAC CCG AGG GTG-3'$

MTB prob dizisi: $5'-HS-(CH_2)_6-(T)_{15} GGG TGC ATG ACA ACA AAG TTG G-3'$

MTB eşlenik dizisi: $5'-C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC-3'$

Bu çalışma için seçilen dört farklı altın nanopartiküllerin önce plasmon dalga boyları belirlenmiştir. Daha sonra farklı derişimlerde prob oligonükleotitleri altın nanopartiküllerin yüzeyine immobilize edilerek altın nanopartikül problemleri hazırlanmıştır. Prob derişimine bağılı olarak plasmon dalga boylarındaki kaymalar incelenmiştir. En son aşamada bu altın nanopartikül problemlerinin farklı derişimlerdeki hedef oligonükleotitle hibridizasyonu gerçekleştirilerek plasmon dalga boylarındaki kaymalar belirlenmiştir. Ayrıca sistemin hassasiyetini araştırmak amacıyla nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş prob oligonükleotitin eşleniğı olmayan bir oligonükleotit ile etkileştirilerek hem dalga boylarındaki kayma hem de fluoresan sinyal şiddetindeki değışimler incelenmiştir. Bu yapılan çalışmalar aşağıda süspansiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti başlıklı bölümlerde ayrıntılı olarak anlatılmıştır.

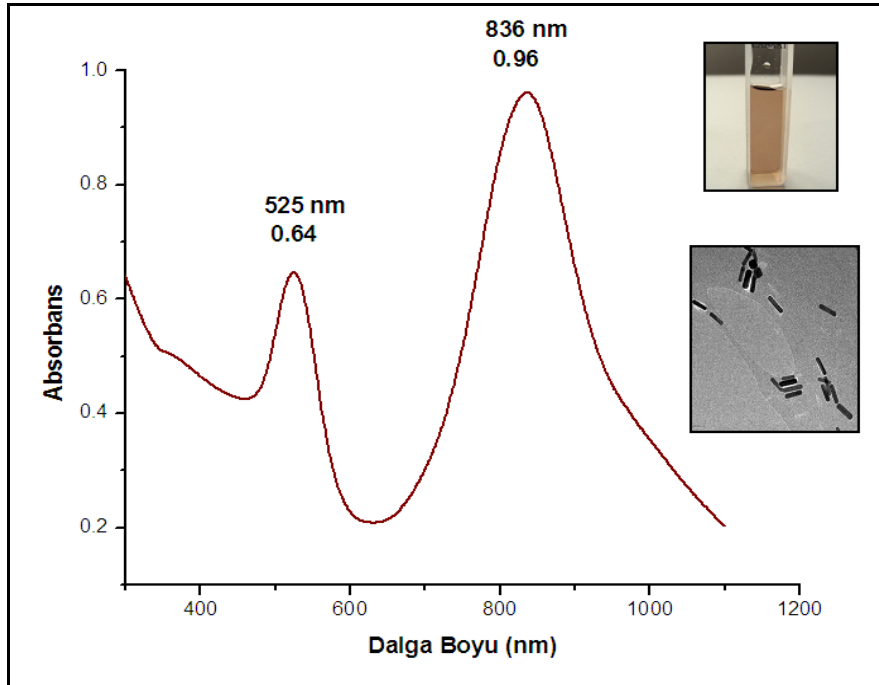
İki farklı hedefin aynı anda tayin edilebilmesi amacıyla yüzeyinde farklı problemler takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar (“nanoarrayler”) hazırlanmıştır. Oluşturulan bu mikroemülsiyon karışımlarının plasmon dalga boyları belirlenmiştir. Nanopartiküllerden birinin hedefini içeren belli derişimdeki hedef oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek, hedefin probunu taşıyan nanopartiküldeki hibridizasyon sonucu plasmon dalga boyundaki kayma incelenmiştir. Bu şekilde mikroemülsiyon fazda altın nanopartikül esaslı DNA tanı kiti ve DNA arrayler oluşturulmuştur. Bu yapılan çalışmalar aşağıda mikroemülsiyon fazda nanoarray başlıklı bölümde ayrıntılı olarak ele alınmıştır.

4.2.1.1. Süspansiyon fazda uzunluk/çap oranı 4.8 olan altın nanoçubuk esaslı DNA tanı kiti

Altın nanoçubuk yüzeyine herhangi bir biyolojik molekülün bağılanması sonucu ortamın refraktif indeksinin değışimine bağılı olarak plasmon dalga boylarında değışime neden olmaktadır. Literatürde altın nanoçubukların bu özelliklerinden faydalanarak süspansiyon fazda array sistemleri geliştirilmiştir (Wang, 2008; Yu, 2009). Tez kapsamında süspansiyon fazda altın nanoçubuklar ile DNA tanı kiti geliştirilmesi amacıyla dört farklı derişimde tiyol modifiye oligonükleotit probu nanoçubuk yüzeyine immobilize edilerek derişime bağılı aksenal yöndeki plasmon dalga boyundaki kaymalar incelenmiştir.

GOR prob oligonükleotitin altın nanoçubuk (A.R. 4.8) yüzeyine immobilize edilerek nanoçubuk problemlerinin hazırlanması

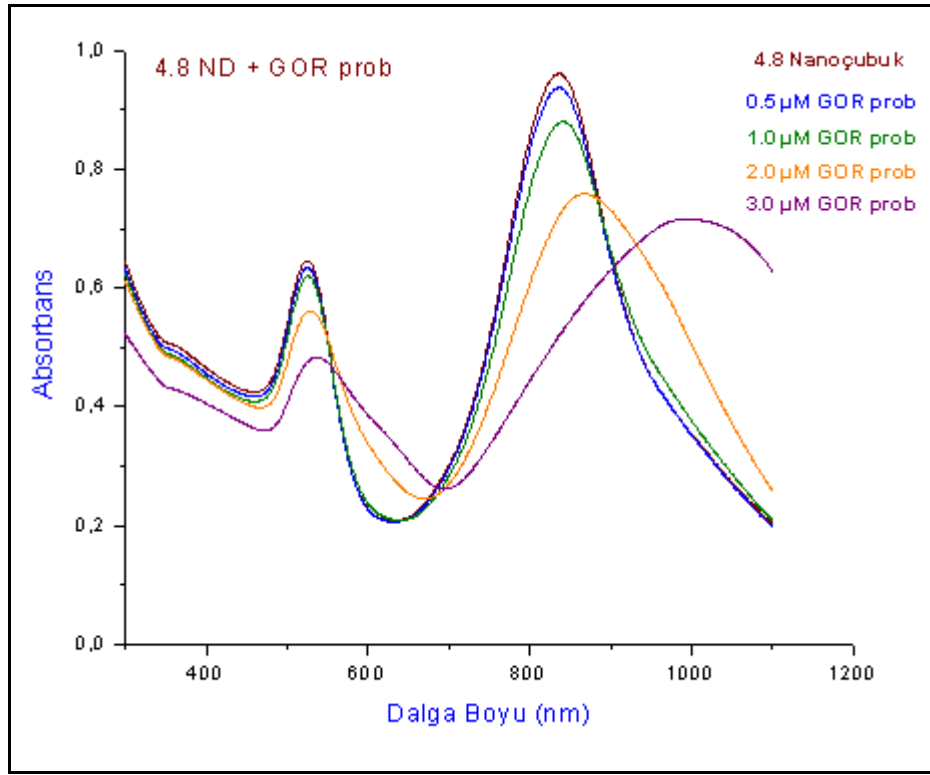
Bölüm 4.1.5'de sentezlenip karakterize edilen ortalama uzunluğu 32.3 nm çapı 6.7 nm (uzunluk/çap oranı 4.8) olan altın nanoçubuk seçilmiştir. Eksenel yönde 836 nm radyal yönde 525 nm dalga boylarında absorbans veren nanoçubuğun özellikleri Şekil 4.42'de verilmiştir. Bu nanoçubuklar ile yapılan çalışmalarda *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır.



Şekil 4.42. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 4.8) özellikleri.

Altın nanoçubuk süspansiyonundan 1 ml alınarak yüzeyine oligonükleotit immobilize edilmeden önceki eksenel ve radyal yöndeki absorbans dalga boyları belirlenmiştir. Bu nanoçubuk stok çözeltisinden 1'er ml'lik dört örnek alınarak 0.5;1.0;2.0 ve 3.0 μ M PBS (pH 7.4) bufferında hazırlanmış tiyol modifiye edilmiş GOR prob oligonükleotit çözeltileri bu nanoçubuk çözeltilerine ilave edilmiştir. Nanoçubuk oligonükleotit karışımları 50°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. Oligonükleotitin nanoçubuk yüzeyine spesifik bağlanma verimini arttırmak için PBS bufferı eklenerek çözeltinin iyonik gücü

artırılmıştır. Bu çözelti tekrar 50°C'de 24 saat inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası nanoçubuk yüzeyine bağlanmayan GOR prob oligonükleotitleri uzaklaştırmak için 10000 rpm'de santrifüjleme işlemi yapılmıştır. Çöken kısım tekrar PBS bufferında dağıtılarak UV-görünür bölge spektrofotometre ile karışımın absorbans yaptığı dalga boyları belirlenmiştir. Şekil 4.43'de farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş uzunluk/çap oranı 4.8 olan altın nanoçubuğun UV-görünür bölge spektrofotometre sonuçları verilmiştir. Ayrıca eksenel plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.



Şekil 4.43. Farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş altın nanoçubuk (A.R. 4.8) problelerinin UV/Vis absorpsiyon spekturumu.

Çizelge 4.16. Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış altın nanoçubuğun (aspect ratio 4.8) aksenal yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Eksenal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 4.8 Altın nanoçubuk | 0.96 | 836 | - |
| 4.8 ND+0.5 μ M GOR prob | 0.94 | 836 | 0 |
| 4.8 ND+1.0 μ M GOR prob | 0.88 | 840 | 4 |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob | 0.76 | 868 | 32 |
| 4.8 ND+3.0 μ M GOR prob | 0.71 | 993 | 157 |

(Altın nanoçubuklar ND kısaltması ile gösterilmiştir).

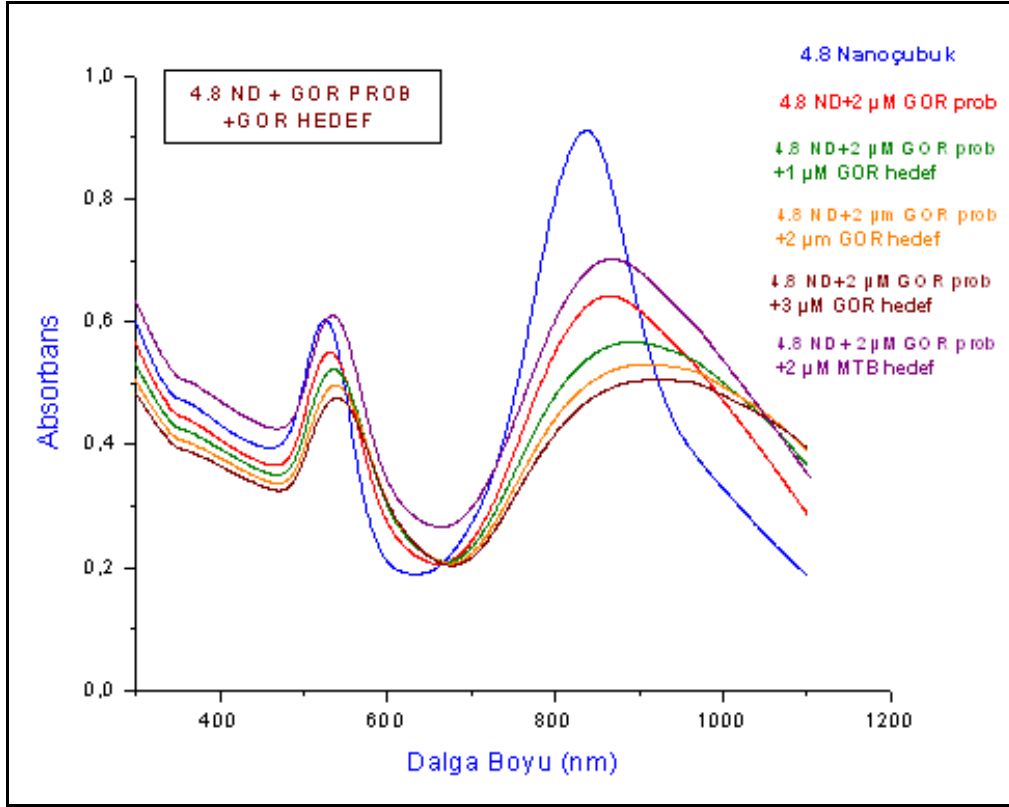
Şekil 4.43 ve Çizelge 4.16'dan görüldüğü gibi altın nanoçubuk yüzeyine GOR prob oligonükleotiti bağlanmadan önce 836 nm dalga boyunda aksenal plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde GOR prob oligonükleotiti bağlandıktan sonra aksenal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. GOR prob derişimi arttıkça aksenal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbansın azaldığı görülmüştür. 0.5 μ M derişiminde GOR prob bağlanmış altın nanoçubuğun aksenal plasmon dalga boyunda herhangi bir değişiklik olmazken 3.0 μ M derişimdeki GOR prob derişiminde 157 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçülmüştür. Altın nanoçubukların aksenal ve radyal yöndeki plasmon dalga boyları ve yoğunlukları buldukları ortamın refraktif indeksi ve dielektrik sabitinin değişmesine bağlı olarak değişim göstermektedir. Şekil 4.43' den görüldüğü üzere radyal yöndeki plasmon dalga boyları 525 nm civarında olup yüzeyine GOR prob bağlanmasından sonra radyal yöndeki plasmon dalga boylarında aksenal yöndeki dalga boylarındaki kayma kadar bir değişim görülmemiştir. Buna göre altın nanoçubukların buldukları ortamın lokal refraktif indeks değişimine aksenal plasmon dalga boylarının radyal plasmon dalga boylarına göre daha duyarlı olduğu söylenebilir. Literatürde de buna benzer

sonuçlar elde edilmiştir (Wang, 2008; Yu, 2006). Bu nedenle daha çok aksenal yöndeki plasmon dalga boyları dikkate alınmıştır.

Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR problelerinin hedef oligonkleotiti ile hibridizasyonu

Altın nanoçubuk yüzeyine farklı derişimde GOR prob oligonleotit bağlanması sonucu oluşan dalga boyu kaymaları dikkate alınarak 2.0 μM GOR prob derişimi optimum prob derişimi olarak şeilmiştir. 2.0 μM derişiminde GOR prob bağlanmış dört altın nanoçubuk probu hibridizasyon bufferları içinde dağıtılmıştır. Çözeltiye 1.0; 2.0; 3.0 μM derişimlerinde GOR hedef oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek hibridizasyonun gerçekleşmesi için 25 $^{\circ}\text{C}$ 'de 12 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası hibridize olmayan oligonükleotitler 10000 rpm'de santrifüjlenerek ayrılmıştır. Çöken kısım tekrar PBS bufferında dağıtılarak aksenal plasmon dalga boylarındaki kaymalar ölçülmüştür. şekil 4.44'de altın nanoçubuk (aspect ratio 4.8) GOR probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonkleotiti ile hibridizasyonu sonucu plasmon dalga boylarındaki değişimi gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca aksenal plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak izelge 4.17'de gösterilmiştir.

Süspansiyon fazda altın nanoçubukların aksenal plasmon dalga boyu kaymalarına dayanan DNA tanı kiti geliştirilmesi çalışmasının seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanoçubuk probuna 2.0 μM derişiminde GOR probun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıda anlatılan işlemler aynen uygulanarak aksenal plasmon dalga boyundaki kayma incelenerek geliştirilen sistemin hassasiyeti belirlenmiştir. şekil 4.44'de elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu, izelge 4.17'de aksenal plasmon dalga boyu ve red-shift değeri verilmiştir.



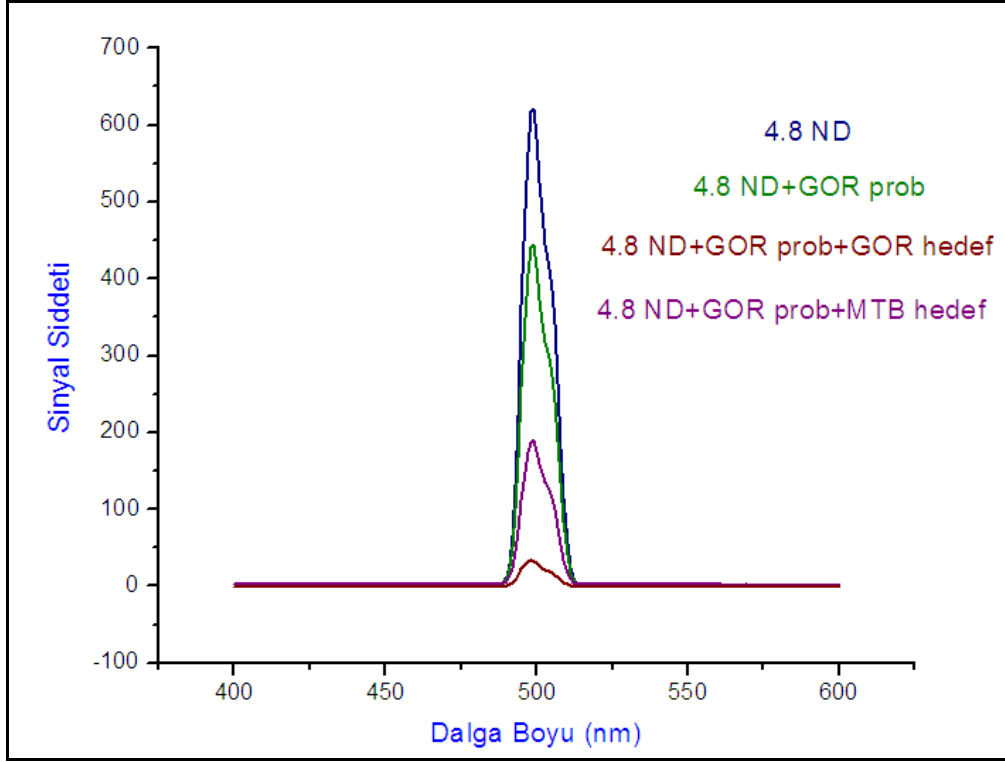
Şekil 4.44. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.44 ve Çizelge 4.17'den görüldüğü gibi altın nanoçubuk GOR probu 867 nm dalga boyunda aksel plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksel plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. GOR hedef derişimi arttıkça aksel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 μM , 2.0 μM , 3.0 μM derişimlerinde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksel plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 20 nm, 57 nm ve 61 nm olarak ölçülmüştür. Hibridizasyon sonucu aksel yöndeki plasmon dalga boylarındaki kayma radyal yöndeki plasmon dalga boyundaki kaymadan daha büyük olduğu Şekil 4.1 görülmektedir. Ayrıca geliştirilen sistemin hassasiyetini belirlemek için yapılan 2.0 μM derişiminde GOR hedefi olmayan MTB hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 3 nm gibi küçük bir dalga boyu kayması ölçülmüştür. Diğer dalga boyu kayma değerlerine göre çok küçük bir dalga boyu kayması olduğundan sistemin hassas olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.17. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksenal plasmon dalga boyları ve dalga boylarındaki kayma değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Eksenal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|---|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 4.8 Altın nanoçubuk | 0.91 | 836 | - |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob | 0.64 | 867 | - |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob +1.0 μ M GOR hedef | 0.56 | 887 | 20 |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob +2.0 μ M GOR hedef | 0.53 | 924 | 57 |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob +3.0 μ M GOR hedef | 0.51 | 928 | 61 |
| 4.8 ND+2.0 μ M GOR prob +2.0 μ M MTB hedef | 0.70 | 870 | 3 |

Altın nanoçubukların bir diğer özelliğide fluoresan özellik göstermeleridir. Li ve arkadaşları altın nanoçubukların fluoresan özelliklerine dayanan DNA biyosensörü geliştirmişlerdir (Li, 2005). Bu nedenle aksenal yöndeki plasmon dalga boyu kaymasına dayanan yöntemi desteklemek amacıyla fluoresan sinyal şiddetindeki değişim de incelenmiştir. Fluoresan spektrofotometre cihazı kullanılarak ölçüm yapılmıştır. Ölçüm sırasında örnekler 200-300 nm aralığında uyarılarak 400-600 nm dalga boyu aralığında emisyon dalga boyu ve sinyal şiddeti taraması yapılmıştır. Altın nanoçubuğun (A.R.4.8) fluoresan sinyal şiddeti, yüzeyine GOR prob oligonükleotiti ve hedef olionükleotiti bağlandıktan sonraki fluoresan sinyal şiddetindeki değişim incelenmiştir. Ayrıca hedef olmayan MTB hedefi ile olan etkileşimi sonucu fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Şekil 4.45’de altın nanoçubuk, altn nanoçubuk GOR prob, GOR hedef ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi verilmiştir.

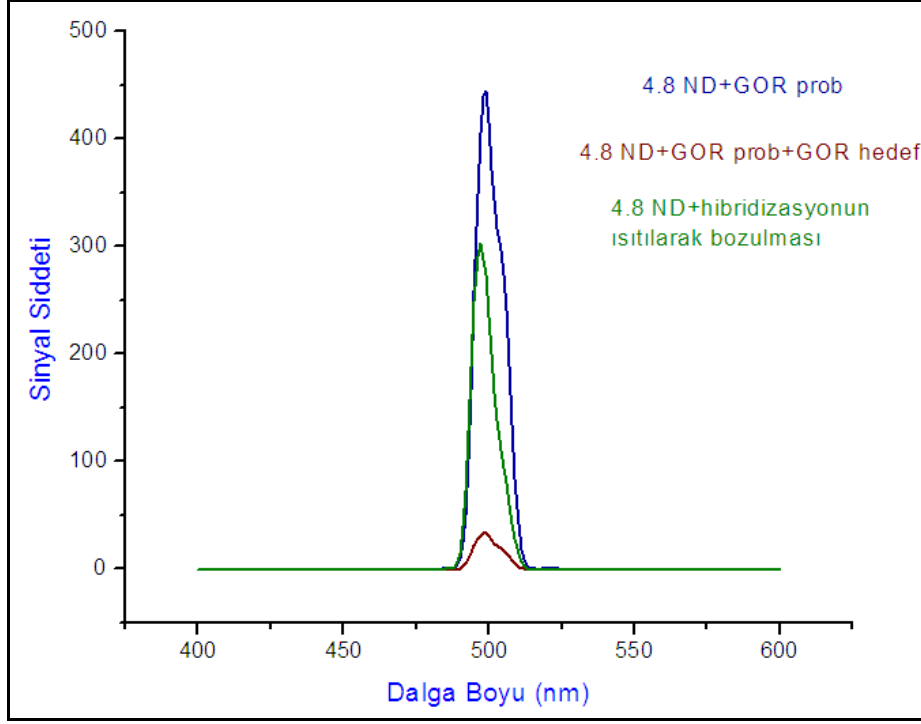


Şekil 4.45. Altın nanoçubuk ve altın nanoçubuğun GOR prob, GOR hedef ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu floresan sinyal şiddetindeki değişimi.

Şekil 4.45’de görüldüğü gibi uzunluk/çap oranı 4.8 olan altın nanoçubuğun 500 nm emisyon dalga boyunda 650 floresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Daha sonra 2.0 μ M GOR prob bağlandığında yine aynı emisyon dalga boyunda 450 floresan sinyal şiddeti vermiş olup, 2.0 μ M GOR hedef ile hibridizasyon sonucu sinyal şiddetinin 20’lere düştüğü görülmüştür. 2.0 μ M derişiminde GOR probunun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu tekrar floresan sinyal şiddetinin 200’lere yükseldiği görülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına dayanarak başta yüksek floresan sinyal şiddeti veren altın nanoçubuk yüzeyine GOR prob bağlandıktan ve bunun GOR hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu floresan sinyal şiddetinde azalma olmuş, MTB hedefi eklendiğinde ise floresan sinyal şiddeti tekrar artmıştır.

Ayrıca altın nanoçubuk GOR probunun GOR hedef çözeltisi ile hibridizasyonu sonrası 60 °C’ye (GOR hedef oligonükleotitin melting temperature sıcaklığı) çözelti ısıtılarak hedef oligonükleotitin dehibridize olması sağlanmıştır. Çözelti santrifüjlenerak hedef oligonükleotit ortamdan uzaklaştırılarak tekrar emisyon yaptığı dalga boyu ve floresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Şekil 4.46’da altın nanoçubuğun,

GOR prob ve eşlenik oligonükleotide hibridizasyonu sonrası ve ısıtılarak dehibridize edildikten sonraki emisyon yaptığı dalga boyu ve fluoresan sinyal şiddeti ölçüm sonuçları aynı grafik üzerinde topluca verilmiştir.



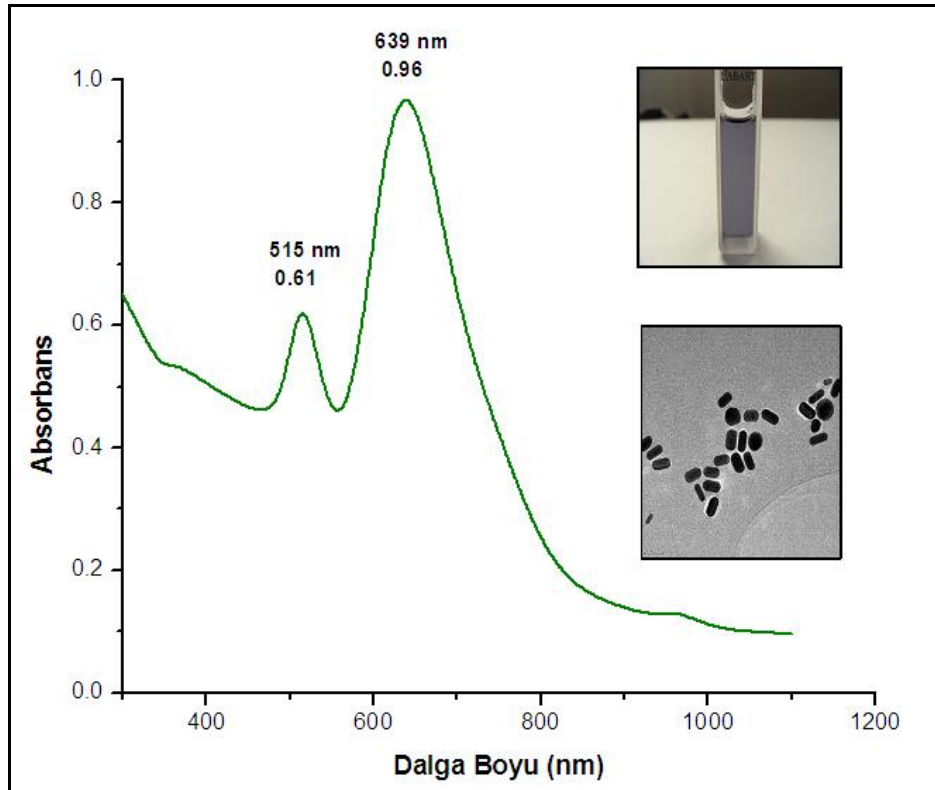
Şekil 4.46. Altın nanoçubuk yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehibridize edilmesi sonucu fluoresan spektrofotometresi.

Şekil 4.46’da görüldüğü üzere altın nanoçubuk yüzeyindeki GOR probunun hedefi ile hibridizasyonu sonucu fluoresan sinyal şiddeti 20 civarında iken ısıtılarak hibridizasyonun bozulması sonucu ölçülen sinyal şiddeti tekrar 350’ye yükselmiştir. Yapıdan hedef oligonükleotitin ayrılması ile sinyal şiddeti tekrar artmıştır. Emisyon yaptığı dalga boyunda her iki durumda da herhangi bir değişiklik olmayıp 480 nm olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada dalga boylarında herhangi bir kayma görülmeyp sinyal şiddetlerinde değişim olmuştur. Literatürde de buna benzer çalışma bulunmaktadır. Li ve arkadaşları altın nanoçubukların fluoresan özelliklerinden faydalanarak DNA hibridizasyonunu altın nanoçubukların fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi inceleyerek belirlemişlerdir. Buna dayanarak DNA biyosensörleri geliştirilebileceğini rapor etmişlerdir. Elde ettiğimiz sonuçlarla uyum göstermektedir (Li, 2005). Süspansiyon fazda altın nanoçubuklar ile geliştirilen DNA tanı kiti sistemi, eksenel yöndeki plasmon dalga boylarındaki kaymalarının

incelenmesinin yanı sıra floresan sinyal şiddetindeki değişimler ile de desteklenmiştir.

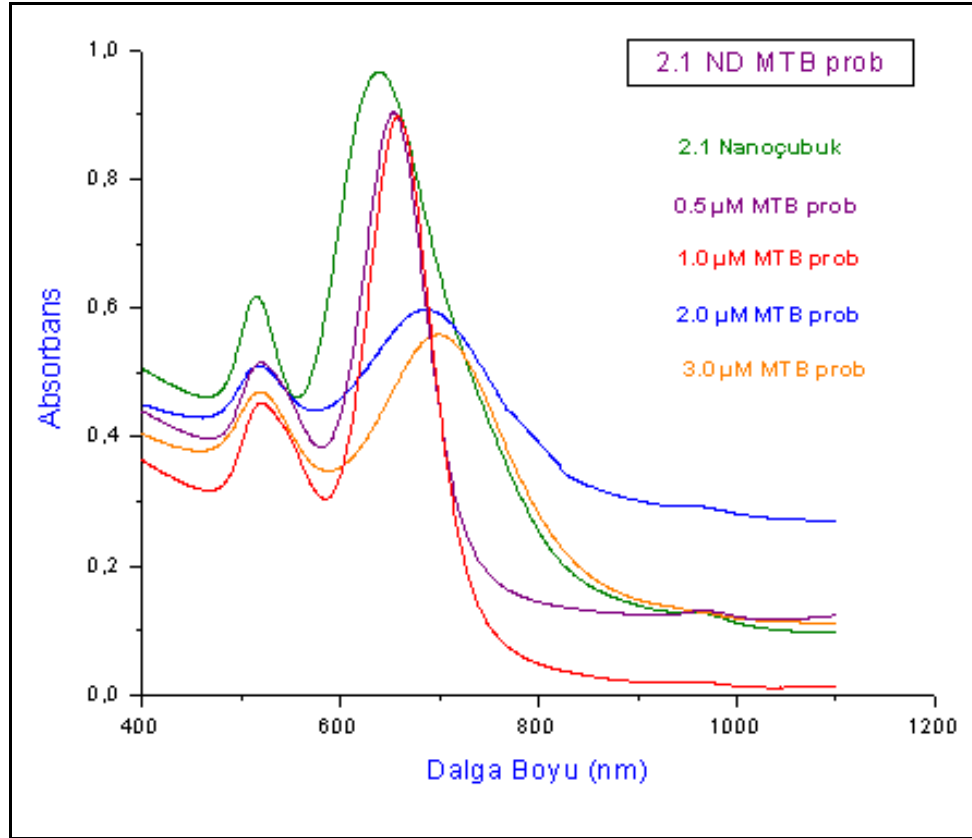
4.2.1.2. Süspansiyon Fazda Uzunluk/çap oranı 2.1 olan Altın Nanoçubuk Esaslı DNA Tanı Kiti

İki farklı hedefin aynı anda tayin edilebilmesi amacıyla yüzeyinde farklı proplar takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar ("nanoarrayler") hazırlamak amacıyla aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuklar ile de çalışma yapılmıştır. Ortalama uzunluğu 40 nm çapı 19 nm (uzunluk/çap oranı 2.1) olan altın nanoçubuk ile yapılan çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit propları ve bu propların hedef dizileri kullanılmıştır. Eksenel yönde 639 nm radyal yönde 515 nm dalga boylarında absorbands veren nanoçubuğun özellikleri Şekil 4.47'de verilmiştir.



Şekil 4.47. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) özellikleri.

Bu bölümde aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuk MTB problemleri hazırlanmıştır. Altın nanoçubuk süspansiyonundan 1 ml alınarak yüzeyine oligonükleotit immobilize edilmeden önceki aksel ve radyal yöndeki absorbanans dalga boyları belirlenmiştir. 0.5;1.0;2.0 ve 3.0 μM derişiminde MTB prob oligonükleotitleri altın nanoçubuk yüzeyine immobilize edilmiştir. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuklar da yapılan immobilizasyon işlemleri aynen uygulanmıştır (Bölüm 4.2.1.1). Şekil 4.48’de farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş uzunluk/çap oranı 2.1 olan altın nanoçubuğun UV/Vis absorpsiyon spektrum sonuçları verilmiştir. Ayrıca aksel plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.18’de gösterilmiştir.



Şekil 4.48. Farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

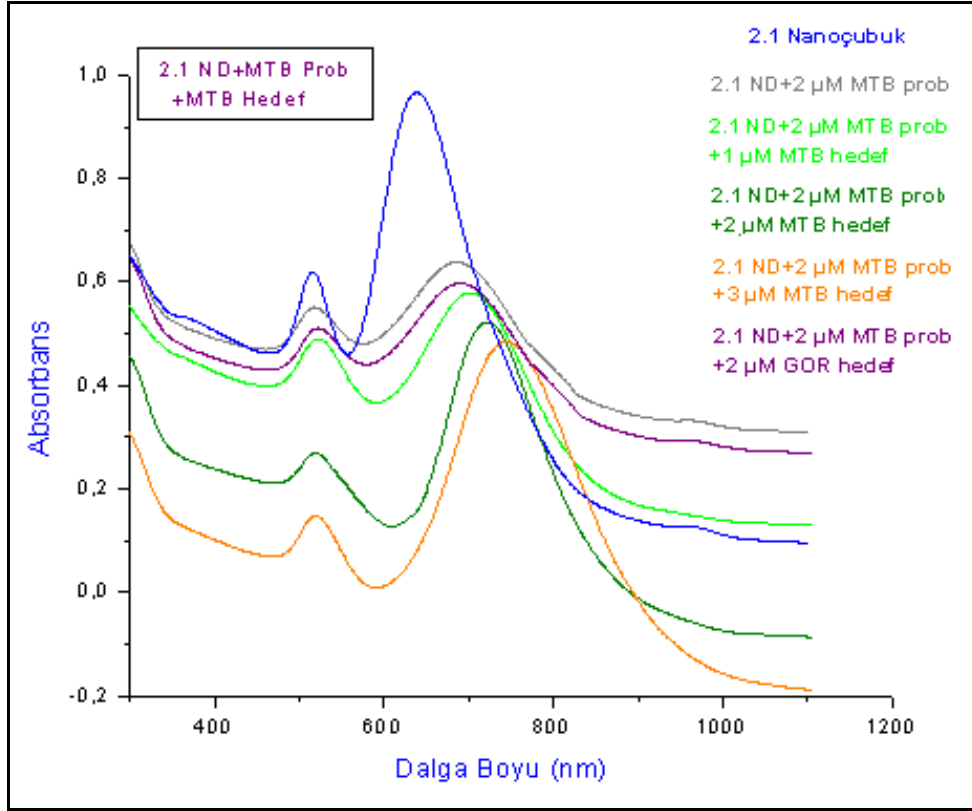
Çizelge 4.18. Farklı derişimlerde MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun (A.R. 2.1) aksenel yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Eksenel Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|-----------------------------|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 2.1 Altın nanoçubuk | 0.96 | 639 | - |
| 2.1 ND+0.5 μ M MTB prob | 0.91 | 654 | 15 |
| 2.1 ND+1.0 μ M MTB prob | 0.89 | 658 | 19 |
| 2.1 ND+2.0 μ M MTB prob | 0.60 | 685 | 46 |
| 2.1 ND+3.0 μ M MTB prob | 0.55 | 699 | 60 |

Şekil 4.48 ve Çizelge 4.18'den görüldüğü gibi altın nanoçubuk yüzeyine MTB prob oligonükleotiti bağlanmadan önce 639 nm dalga boyunda aksenel plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde MTB prob oligonükleotiti bağlandıktan sonra aksenel plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. MTB prob derişimi arttıkça aksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbansın azaldığı görülmüştür. 0.5 μ M derişiminde MTB prob bağlanmış altın nanoçubuğun aksenel plasmon dalga boyunda 15 nm'lik bir kayma olurken 3.0 μ M derişimdeki MTB prob derişiminde ise 60 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçülmüştür. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuğa 3.0 μ M derişimdeki GOR prob bağlandığında 157 nm'lik dalga boyu gösterirken aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuktan daha fazla dalga boyu kayması göstermiştir. Literatürde de aspect ratio oranı arttıkça dalga boyu kaymasının daha fazla arttığı belirtilmiştir (Yu, 2006).

Şekil 4.48' den görüldüğü üzere radyal yöndeki plasmon dalga boyları 515 nm civarında olup yüzeyine MTB prob bağlanmasından sonra radyal yöndeki plasmon dalga boylarında aksenel yöndeki dalga boylarındaki kayma kadar bir değişim görülmemiştir. Buna göre altın nanoçubukların buldukları ortamın lokal refraktif indeksi değişimine aksenel plasmon dalga boylarının radyal plasmon dalga boylarına göre daha duyarlı olduğu söylenebilir.

Altın nanoçubuk yüzeyine farklı derişimde MTB prob oligonleotit bağlanması sonucu oluşan dalga boyu kaymaları dikkate alınarak 2.0 µM MTB prob derişimi optimum prob derişimi olarak seçilmiştir. 2.0 µM derişiminde MTB prob bağlanmış dört altın nanoçubuk probu hibridizasyon bufferları içinde dağıtılmıştır. Çözeltiye 1.0; 2.0; 3.0 µM derişimlerinde MTB hedef oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.1.2.1'de 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuk için uygulanan deneysel koşullar aynen uygulanmıştır. Şekil 4.49'da altın nanoçubuk (aspect ratio 2.1) MTB probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu plasmon dalga boylarındaki değişimi gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca eksenel plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.19'da gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen sistemin seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 µM derişimde MTB prob bağlanmış altın nanoçubuk probuna 2.0 µM derişiminde MTB probun hedefi olmayan GOR hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıda anlatılan işlemler aynen uygulanarak eksenel plasmon dalga boyundaki kayma incelenerek geliştirilen sistemin hassasiyeti belirlenmiştir. Şekil 4.49'da elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu Çizelge 4.19'da eksenel plasmon dalga boyu ve red-shift değeri verilmiştir.



Şekil 4.49. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

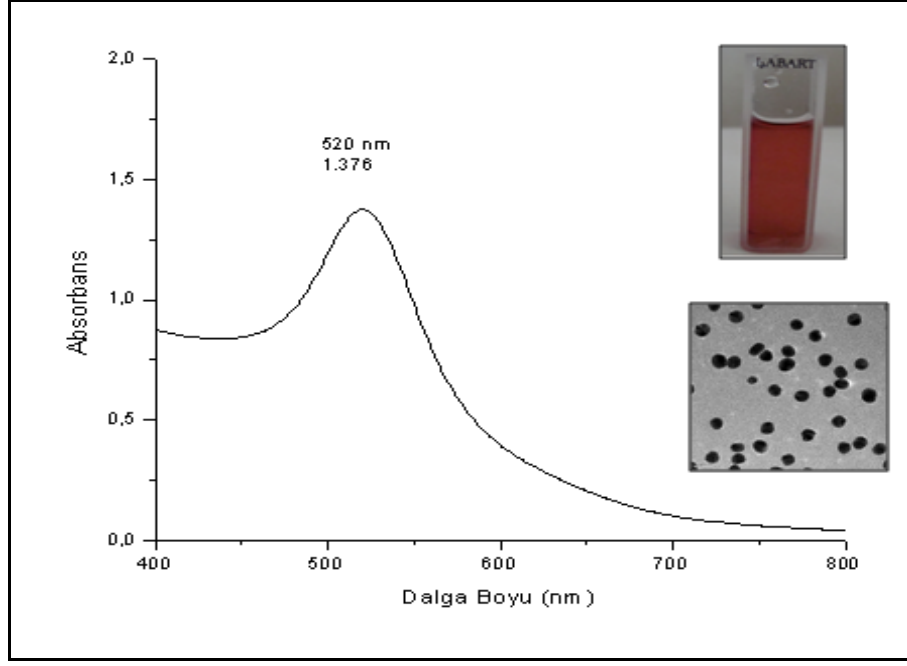
Şekil 4.49 ve Çizelge 4.19'dan görüldüğü gibi altın nanoçubuk MTB probu 685 nm dalga boyunda aksenel plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksenel plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. MTB hedef derişimi arttıkça aksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 µM, 2.0 µM, 3.0 µM derişimlerinde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksenel plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 18 nm, 36 nm ve 60 nm olarak ölçülmüştür. Ayrıca geliştirilen sistemin hassasiyetini belirlemek için yapılan 2.0 µM derişiminde MTB hedefi olmayan GOR hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 4 nm gibi küçük bir dalga boyu kayması ölçülmüştür. Diğer dalga boyu kayma değerlerine göre çok küçük bir dalga boyu kayması olduğundan sistemin hassas olduğu söylenebilir.

Çizelge 4.19. Altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksenal plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Eksenal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|---|-----------|-----------------------------------|-----------------------------------|
| 2.1 Altın nanoçubuk | 0.96 | 636 | - |
| 2.1 ND+2.0 μ M MTB prob | 0.63 | 685 | - |
| 2.1 ND+2.0 μ M MTB prob +1.0 μ M GOR hedef | 0.55 | 703 | 18 |
| 2.1 ND+2.0 μ M MTB prob +2.0 μ M GOR hedef | 0.52 | 721 | 36 |
| 2.1 ND+2.0 μ M MTB prob +3.0 μ M GOR hedef | 0.48 | 745 | 60 |
| 2.1 ND+2.0 μ M GOR prob +2.0 μ M MTB hedef | 0.59 | 689 | 4 |

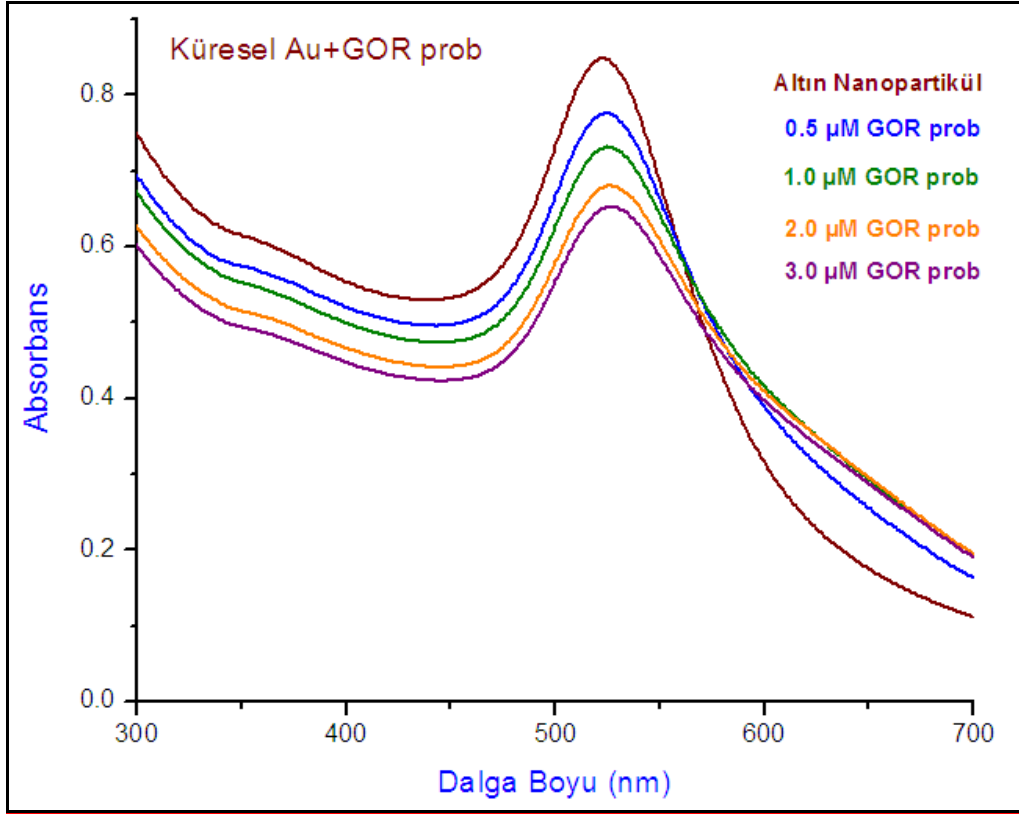
4.2.1.3. Süspansiyon Fazda Küresel Altın Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti

Ortalama 13 nm partikül çapına sahip küresel altın nanopartikül ile yapılan çalışmalarda *M. Gordonae* patojenik bakterilerine özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit probları ve bu probların hedef dizileri kullanılmıştır. Yukarıda altın nanoçubuklar ile yapılan çalışmaların aynısı bu küresel altın nanopartiküller ile de yapılmıştır. Mikroemülsiyon fazda farklı şekil ve boyutta altın nanoyapılarla nanoarrayler oluşturmak için küresel altın nanopartikül GOR probları hazırlanmıştır. Şekil 4.50'de çalışılan küresel altın nanopartiküllerin özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.50. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan küresel altın nanopartiküllerin özellikleri.

Altın nanopartikül süspansiyonundan 1 ml alınarak yüzeyine oligonükleotit immobilize edilmeden önceki plasmon dalga boyları belirlenmiştir. 0.5;1.0;2.0 ve 3.0 μM derişiminde GOR prob oligonükleotitleri altın nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiştir. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuklar da yapılan immobilizasyon işlemi aynen uygulanmıştır (Bölüm 4.2.1.1). Şekil 4.51’de farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş altın nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu sonuçları verilmiştir. Ayrıca plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.20’de gösterilmiştir.



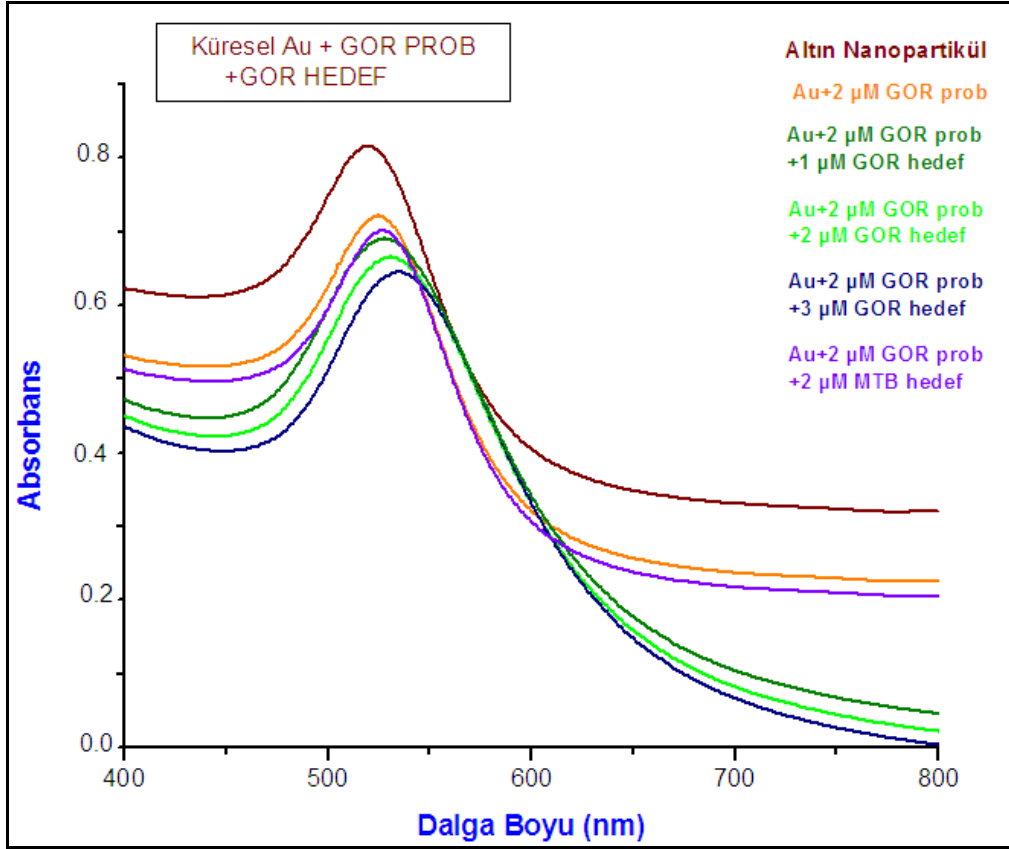
Şekil 4.51. Farklı derişimlerde GOR probu immobilize edilmiş küresel altın nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spekturumu.

Çizelge 4.20. Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış küresel altın nanopartikülün radyal yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Radyal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|-------------------------------|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Altın nanopartikül | 0.84 | 520 | - |
| Au+0.5 μM GOR prob | 0.77 | 522 | 2 |
| Au+1.0 μM GOR prob | 0.72 | 523 | 3 |
| Au+2.0 μM GOR prob | 0.68 | 525 | 5 |
| Au+3.0 μM GOR prob | 0.65 | 527 | 7 |

Küresel altın nanopartiküller altın nanoçubuklardan farklı olarak sadece radyal yönde plasmon dalga vermektedirler. Şekil 4.51 ve Çizelge 4.20'den görüldüğü gibi altın partikül yüzeyine GOR prob oligonükleotiti bağlanmadan önce 520 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde GOR prob oligonükleotiti bağlandıktan sonra radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. GOR prob derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. En yüksek GOR prob derişiminde 7 nm'lik bir red-shift göstermiş olup altın nanoçubuklar kadar yüksek bir dalga boyu kayması göstermemiştir. Literatürde de altın nanoçubukların refraktif indeksindeki değişime daha duyarlı olduğu rapor edilmiştir. Ortamın refraktif indeksindeki 0.1 birimlik bir değişim aksel plasmon dalga boyunda 40 nm'lik red-shift oluşturduğu belirtilmiştir (Wang, 2008; Yu, 2006). Yapılan bu çalışma ile küresel altın nanopartiküllerin altın nanoçubuklar kadar ortamın refraktif indeksi değişimine çok duyarlı olmadığı görülmüştür.

Altın nanopartikül yüzeyine farklı derişimde GOR prob oligonükleotit bağlanması sonucu oluşan dalga boyu kaymaları dikkate alınarak 2.0 μM GOR prob derişimi optimum prob derişimi olarak seçilmiştir. 2.0 μM derişiminde GOR prob bağlanmış dört altın nanopartikül probu hibridizasyon bufferında süspanse edilmiştir. 1.0; 2.0; 3.0 μM derişimlerinde GOR hedef oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. Bölüm 4.2.1.1'de 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuk için uygulanan deneysel koşullar aynen uygulanmıştır. Şekil 4.52'de altın nanopartikül GOR probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu plasmon dalga boylarındaki değişimi gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca radyal plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.21'de gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen sistemin seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanopartikül probuna 2.0 μM derişiminde GOR probun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıda anlatılan işlemler aynen uygulanarak radyal plasmon dalga boyundaki kayma incelenerek geliştirilen sistemin hassasiyeti belirlenmiştir. Şekil 4.52'de elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu Çizelge 4.21'de aksel plasmon dalga boyu ve red-shift değeri verilmiştir.



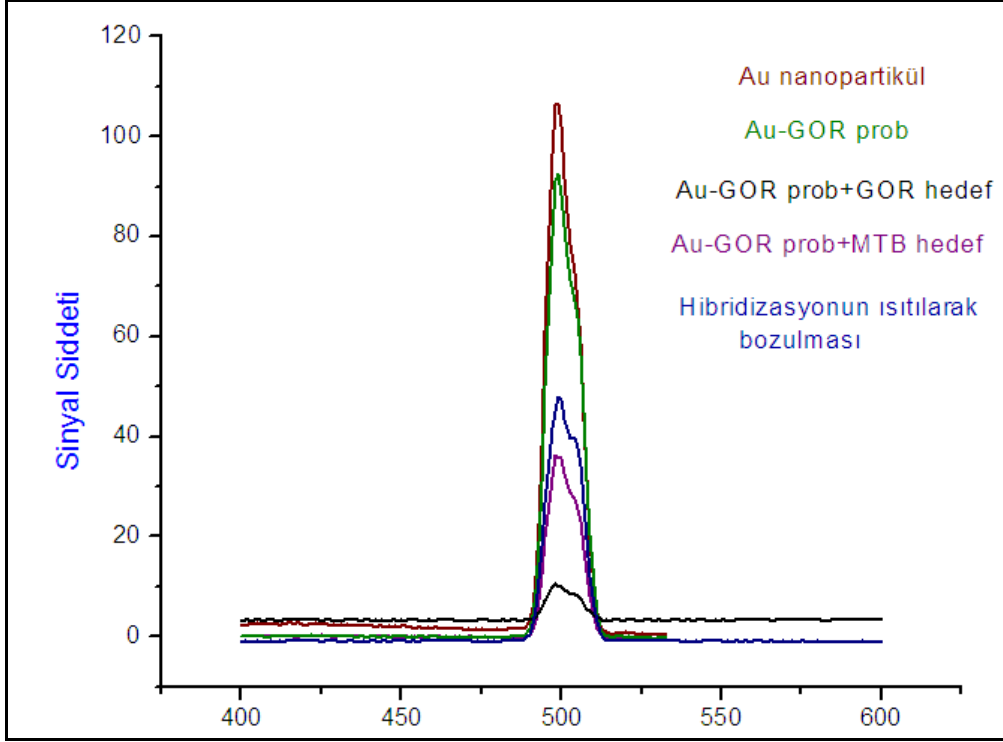
Şekil 4.52. Altın nanopartikül probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.52 ve Çizelge 4.21'den görüldüğü gibi altın nanopartikül GOR probu 525 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. GOR hedef derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. En yüksek GOR hedef oligonükleotit derişiminde 8 nm'lik bir kayma ölçülmüştür. Ayrıca geliştirilen sistemin hassasiyetini belirlemek için yapılan 2.0 µM derişiminde GOR hedefi olmayan MTB hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 2 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçülmüştür. 1.0 µM derişiminde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucunda da 2 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçülmüştür (Çizelge 4.21). Bu nedenle küresel altın nanopartiküller ile oluşturulan süspansiyon fazda DNA tanı kiti sisteminin hassasiyeti altın nanoçubuklar kadar iyi olmadığı görülmüştür.

Çizelge 4.21. Altın nanopartikül probunun farklı derişimlerde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Radyal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|---|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| Altın nanopartikül | 0.83 | 520 | - |
| Au+2.0 μ M GOR prob | 0.73 | 525 | - |
| Au+2.0 μ M GOR prob +1.0 μ M GOR hedef | 0.69 | 527 | 2 |
| Au+2.0 μ M GOR prob +2.0 μ M GOR hedef | 0.65 | 530 | 5 |
| Au+2.0 μ M GOR prob +3.0 μ M GOR hedef | 0.62 | 533 | 8 |
| Au+2.0 μ M GOR prob +2.0 μ M MTB hedef | 0.71 | 527 | 2 |

Küresel altın nanopartiküllerin fluoresan özellikleri incelenmiştir. Altın nanopartiküllerin fluoresan sinyal şiddeti, yüzeyine GOR prob oligonükleotiti ve hedef oligonükleotiti bağlandıktan sonraki fluoresan sinyal şiddetindeki değişim araştırılmıştır. Hedef olmayan MTB hedefi ile olan etkileşimi sonucu fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Ayrıca altın nanopartikül GOR probunun GOR hedef çözeltisi ile hibridizasyonu sonrası 60 °C'ye (GOR hedef oligonükleotitin melting temperature sıcaklığı) çözelti ısıtılarak hedef oligonükleotitin dehibridize olması sağlanmıştır. Çözelti santrifüjlenerek hedef oligonükleotit ortamdan uzaklaştırılarak tekrar emisyon yaptığı dalga boyu ve fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Şekil 4.53.'de altın nanopartikül, altın nanopartikül GOR prob, GOR hedef ve MTB hedef ile etkileşimi ve ısıtılarak dehibridize edildikten sonraki emisyon yaptığı dalga boyu ve fluoresan sinyal şiddeti ölçüm sonuçları topluca verilmiştir.



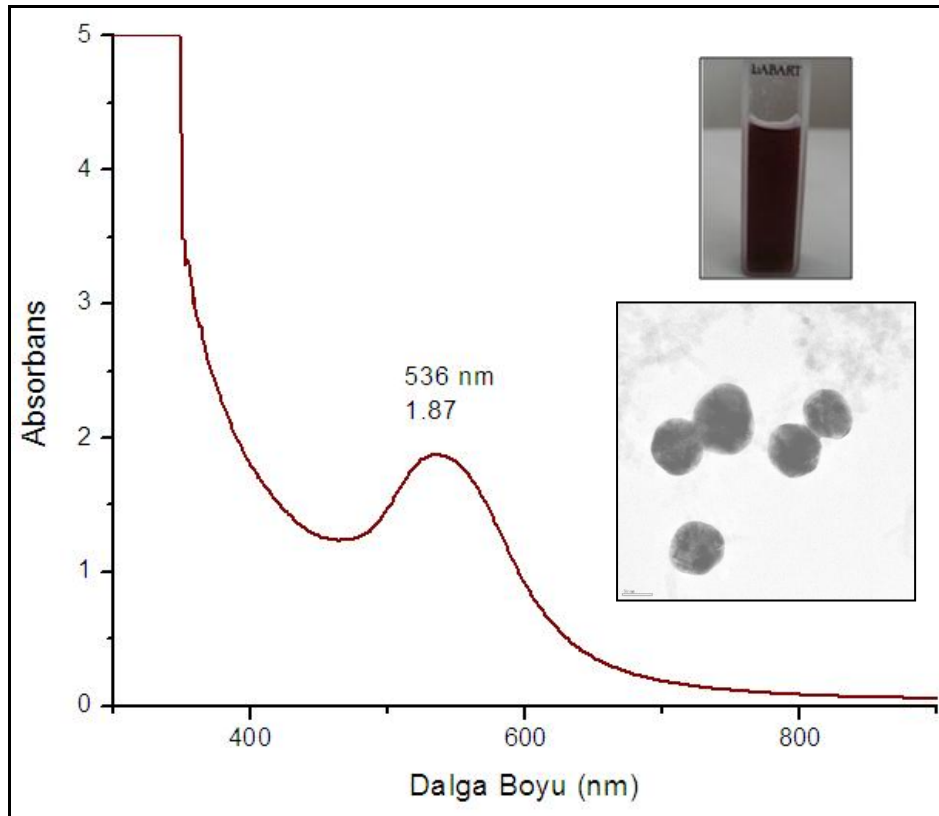
Şekil 4.53. Altın nanopartikül ve altın nanopartikül GOR prob, GOR hedef, MTB hedef ile etkileşimi ve altın nanopartikül yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehidride edilmesi sonucu floresan sinyal şiddetindeki değişimi.

Şekil 4.53’de görüldüğü gibi altın nanopartikülün 500 nm emisyon dalga boyunda 106 floresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Daha sonra 2.0 μ M GOR prob bağlandığında yine aynı emisyon dalga boyunda 91 floresan sinyal şiddeti vermiş olup, 2.0 μ M GOR hedef ile hibridizasyon sonucu sinyal şiddetinin 10'lara düştüğü görülmüştür. 2.0 μ M derişiminde GOR probunun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu tekrar floresan sinyal şiddetinin 36'lara yükseldiği görülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına dayanarak başta yüksek floresan sinyal şiddeti veren altın nanopartikül yüzeyine GOR prob bağlandıktan ve bunun GOR hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu floresan sinyal şiddetinde azalma olmuş, MTB hedefi eklendiğinde ise floresan sinyal şiddeti tekrar artmıştır. Ayrıca Şekil 4.3’de görüldüğü üzere altın nanopartikül yüzeyindeki GOR probunun hedefi ile hibridizasyonu sonucu floresan sinyal şiddeti 10 civarında iken ısıtılarak hibridizasyonun bozulması sonucu ölçülen sinyal şiddeti tekrar 48’e yükselmiştir. Yapıdan hedef oligonükleotitin ayrılması ile sinyal şiddeti tekrar artmıştır. Emisyon yaptığı dalga boyunda her iki durumda da herhangi bir değişiklik olmayıp 500 nm

olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada dalga boylarında herhangi bir kayma görülmeyip sinyal şiddetlerinde değişim olmuştur.

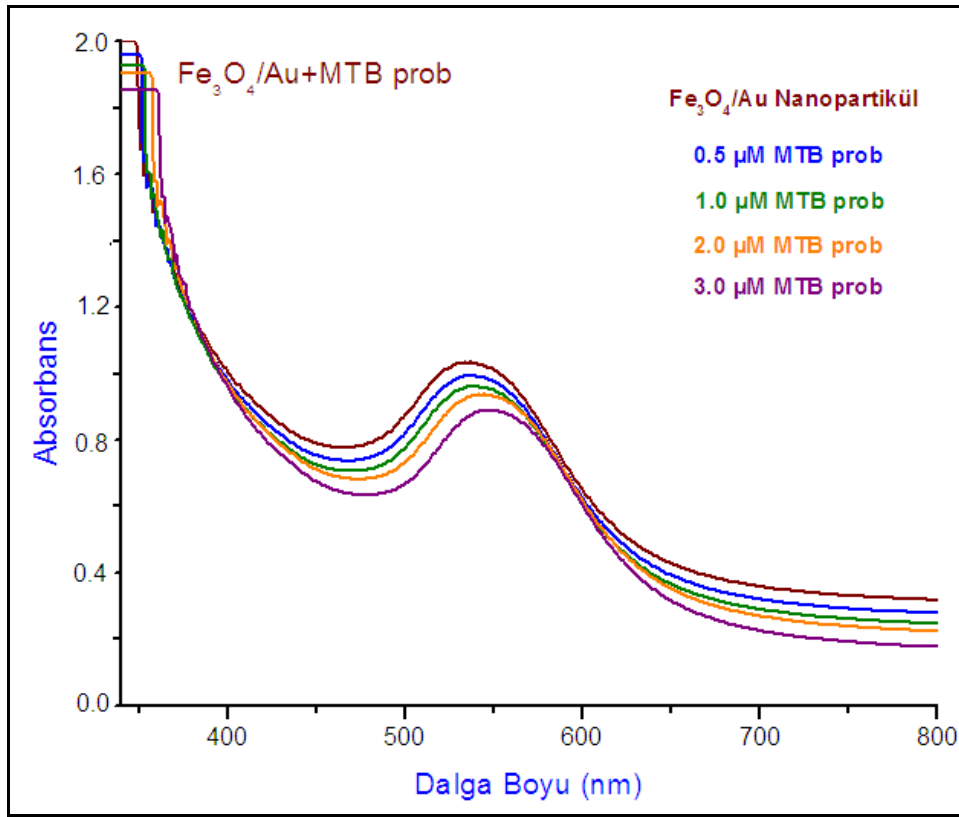
4.2.1.4. Süspansiyon Fazda Altın Kaplı Manyetik (Fe_3O_4/Au) Nanopartikül Esaslı DNA Tanı Kiti

Ortalama çapı 87 nm olan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül ile yapılan çalışmalarda *M. Tuberculosis* Kompleks'ine (MTB) özgü tiyol modifiye edilmiş 6 karbonlu uzatma kolu takılmış oligonükleotit problemleri ve bu problemlerin hedef dizileri kullanılmıştır. Yukarıda altın nanopartiküller ile yapılan çalışmaların aynı Fe_3O_4/Au nanopartikülleri ile de yapılmıştır. Mikroemülsiyon fazda farklı şekil ve boyutta altın nanoyapılarla nanoarrayler oluşturmak için altın kaplı manyetik nanopartikül MTB problemleri hazırlanmıştır. Şekil 5.54'de çalışılan altın kaplı manyetik nanopartiküllerin özellikleri verilmiştir.



Şekil 4.54. Süspansiyon fazda DNA tanı kiti çalışmasında kullanılan altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartiküllerin özellikleri.

Altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikül süspansiyonundan 1 ml alınarak yüzeyine oligonükleotit immobilize edilmeden önceki plasmon dalga boyları belirlenmiştir. 0.5;1.0;2.0 ve 3.0 μM derişiminde MTB prob oligonükleotitleri altın nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiştir. Aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuklar da yapılan immobilizasyon işlemi aynen uygulanmıştır. Şekil 4.55’de farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu sonuçları verilmiştir. Ayrıca plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift) değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.22’de gösterilmiştir.



Şekil 4.55. Farklı derişimlerde MTB probu immobilize edilmiş altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

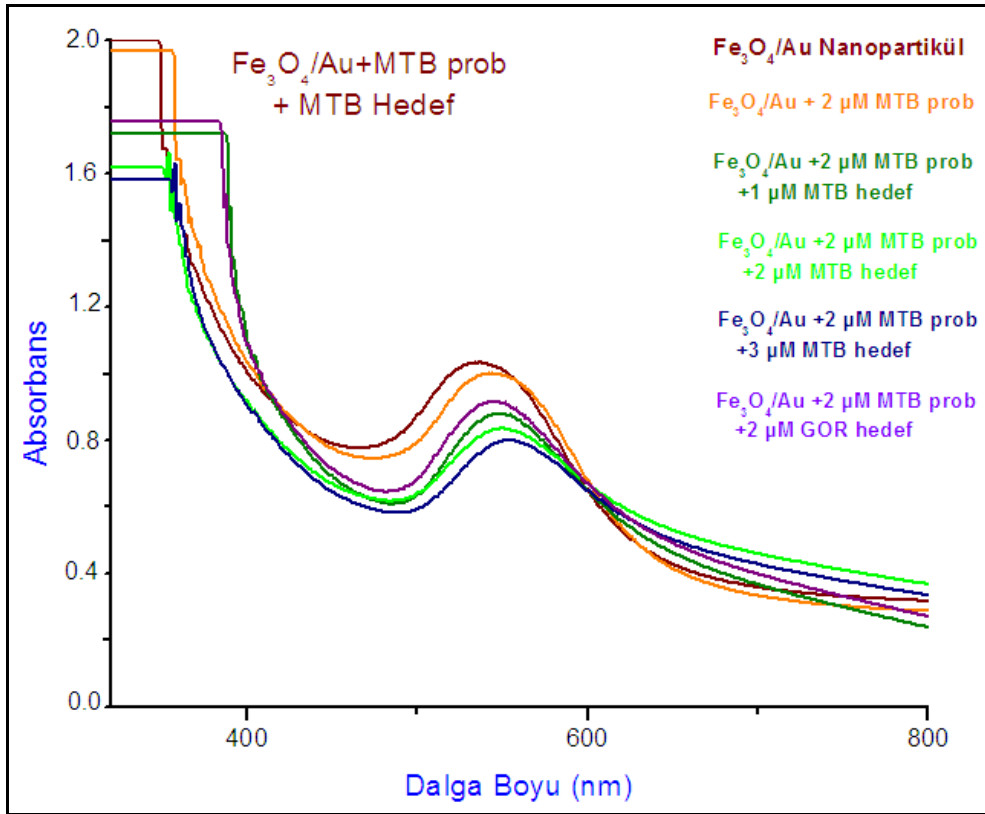
Çizelge 4.22. Farklı derişimlerde GOR probu bağlanmış altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikülün radyal yöndeki plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Radyal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift ($\Delta\lambda$, nm) |
|---|-----------|----------------------------------|-----------------------------------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül | 1.08 | 536 | - |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ +0.5 μM MTB prob | 0.98 | 538 | 2 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ +1.0 μM MTB prob | 0.87 | 540 | 4 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ +2.0 μM MTB prob | 0.84 | 544 | 8 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ +3.0 μM MTB prob | 0.72 | 548 | 12 |

Şekil 4.55 ve Çizelge 4.22'den görüldüğü gibi $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülleri de küresel altın nanopartiküller gibi sadece radyal yönde plasmon göstermektedirler. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülleri 536 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu vermiştir. Yüzeyine farklı derişimlerde MTB prob oligonükleotiti bağlandıktan sonra radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. MTB prob derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. En yüksek MTB prob derişimde küresel altın nanopartiküller gibi 12 nm'lik az bir dalga boyu kayması göstermiş olup altın nanoçubuklar kadar yüksek bir dalga boyu kayması göstermemiştir. Yapılan bu çalışma ile küresel altın nanopartiküller gibi altın nanoçubuklar kadar ortamın refraktif indeksi derişimine çok duyarlı olmadığı görülmüştür.

Yapılan bu çalışma sonucunda 2.0 μM derişiminde MTB probu bağlanmış dört $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü hibridizasyon bufferı içinde süspanse edilmiştir. 1.0; 2.0; 3.0 μM derişimlerinde MTB hedef oligonükleotit çözeltisi ilave edilerek hibridizasyon gerçekleştirilmiştir. 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuk için uygulanan deneysel koşullar aynen uygulanmıştır. Şekil 4.56'da $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu plasmon dalga boylarındaki derişimi gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca radyal plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma (red-shift)

değerleri ayrıntılı olarak Çizelge 4.23'de gösterilmiştir. Ayrıca geliştirilen sistemin seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde MTB prob bağlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül probuna 2.0 μM derişiminde MTB probun hedefi olmayan GOR hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. Yukarıda anlatılan işlemler aynen uygulanarak radyal plasmon dalga boyundaki kayma incelenerek geliştirilen sistemin hassasiyeti belirlenmiştir. Şekil 4.56'da elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu Çizelge 4.23'de aksenal plasmon dalga boyu ve red-shift değeri verilmiştir.



Şekil 4.56. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu ölçülen UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.56 ve Çizelge 4.23'den görüldüğü gibi altın kaplı manyetik nanopartikül MTB probu 544 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu verirken farklı derişimlerde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiştir. MTB hedef derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. En yüksek MTB hedef oligonükleotitinde 9 nm'lik bir kayma ölçülmüştür. Ayrıca geliştirilen sistemin hassasiyetini belirlemek

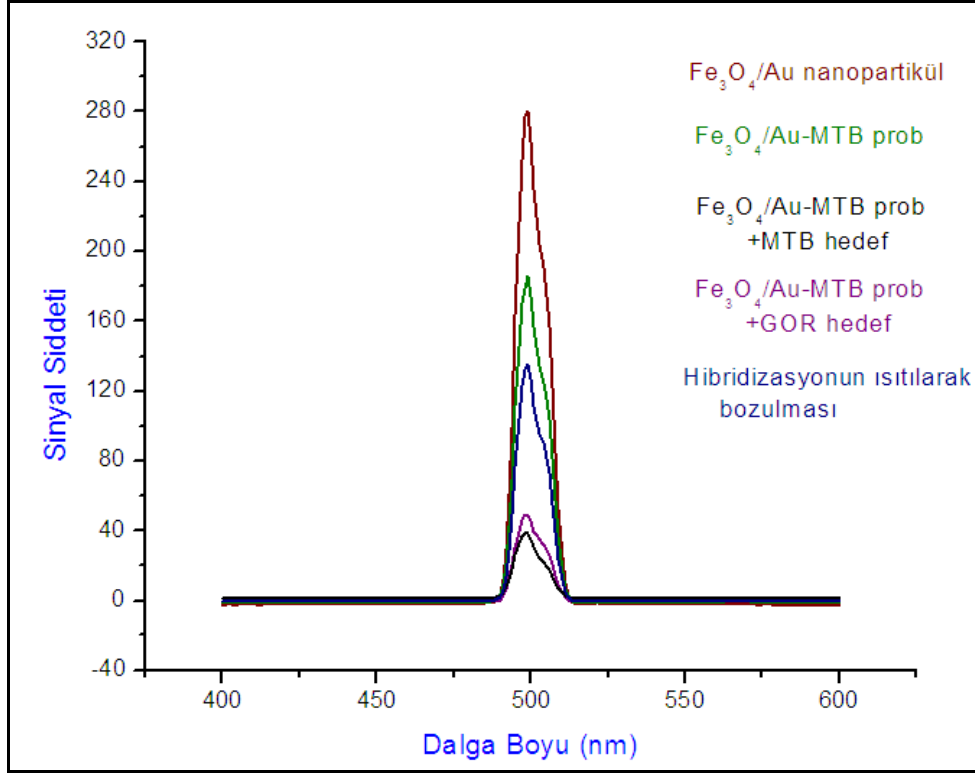
için yapılan 2.0 µM derişiminde MTB hedefi olmayan GOR hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 2 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçölmüştür. 1.0 µM derişiminde MTB hedef oligonökleotiti ile hibridizasyonu sonucunda da 2 nm'lik bir dalga boyu kayması ölçölmüştür (Çizelge 4.23). Dolayısıyla süspansiyon fazda Fe₃O₄/Au nanopartiköl esaslı DNA tanı kiti sisteminin hassasiyeti altın nanoçubuklar kadar iyi olmadığı görölmüştür.

Çizelge 4.23. Fe₃O₄/Au nanopartiköl probunun farklı derişimlerde MTB hedef oligonökleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri.

| Örnekler | Absorbans | Radyal Dalga Boyu λ (nm) | Red Shift (Δλ, nm) |
|---|-----------|--------------------------|--------------------|
| Fe ₃ O ₄ /Au nanopartiköl | 1.13 | 536 | - |
| Fe ₃ O ₄ /Au +2.0 µM MTB prob | 0.94 | 544 | - |
| Fe ₃ O ₄ /Au +2.0 µM MTB prob +1.0 µM MTB hedef | 0.88 | 546 | 2 |
| Fe ₃ O ₄ /Au +2.0 µM MTB prob +2.0 µM MTB hedef | 0.81 | 549 | 5 |
| Fe ₃ O ₄ /Au +2.0 µM MTB prob +3.0 µM MTB hedef | 0.79 | 553 | 9 |
| Fe ₃ O ₄ /Au +2.0 µM MTB prob +2.0 µM GOR hedef | 0.90 | 546 | 2 |

Fe₃O₄/Au nanopartiköllerin floresan özellikleri incelenmiştir. Fe₃O₄/Au nanopartiköllerin floresan sinyal şiddeti, yüzeyine MTB prob oligonökleotiti ve hedef oligonökleotiti bağlandıktan sonraki floresan sinyal şiddetindeki değişim araştırılmıştır. Hedef olmayan GOR hedefi ile olan etkileşimi sonucu floresan sinyal şiddeti ölçölmüştür. Ayrıca Fe₃O₄/Au nanopartiköl MTB probunun MTB hedef çözeltisi ile hibridizasyonu sonrası 60.3 °C'ye (MTB hedef oligonökleotitinin melting temperature sıcaklığı) çözelti ısıtılarak hedef oligonökleotitin dehibridize olması

sağlanmıştır. Çözelti santrifüjlenerek hedef oligonükleotit ortamdan uzaklaştırılarak tekrar emisyon yaptığı dalga boyu ve fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Şekil 4.57'de $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB prob, MTB hedef ve GOR hedef ile etkileşimi ve ısıtılarak dehidridize edildikten sonraki emisyon yaptığı dalga boyu ve fluoresan sinyal şiddeti ölçüm sonuçları topluca verilmiştir.



Şekil 4.57. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül-MTB prob, MTB hedef, GOR hedef ile etkileşimi ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül yüzeyindeki hibridizasyonunun ısıtılarak dehidridize edilmesi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişimi.

Şekil 4.57'de görüldüğü gibi $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülün 500 nm emisyon dalga boyunda 278 fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüştür. Daha sonra 2.0 μM MTB prob bağlandığında yine aynı emisyon dalga boyunda 170 fluoresan sinyal şiddeti vermiş olup, 2.0 μM MTB hedef ile hibridizasyon sonucu sinyal şiddetinin 30'lara düştüğü görülmüştür. 2.0 μM derişiminde MTB probunun hedefi olmayan GOR hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu tekrar fluoresan sinyal şiddetinin 70'lere yükseldiği görülmüştür. Bu ölçüm sonuçlarına dayanarak başta yüksek fluoresan sinyal şiddeti veren $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül yüzeyine MTB prob bağlandıktan ve bunun MTB hedef

oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu floresan sinyal şiddetinde azalma olmuş, GOR hedefi eklendiğinde ise floresan sinyal şiddeti tekrar artmıştır. Ayrıca Şekil 4.57'de görüldüğü üzere Fe_3O_4/Au nanopartikül yüzeyindeki MTB probunun hedefi ile hibridizasyonu sonucu floresan sinyal şiddeti 30 civarında iken ısıtılarak hibridizasyonun bozulması sonucu ölçülen sinyal şiddeti tekrar 135'e yükselmiştir. Yapıdan hedef oligonükleotitin ayrılması ile sinyal şiddeti tekrar artmıştır. Emisyon yaptığı dalga boyunda her iki durumda da herhangi bir değişiklik olmayıp 500 nm olarak ölçülmüştür. Bu çalışmada dalga boylarında herhangi bir kayma görülmeyip sinyal şiddetlerinde değişim olmuştur.

4.2.1.5. Mikroemülsiyon Fazda Nanoarray Çalışmaları

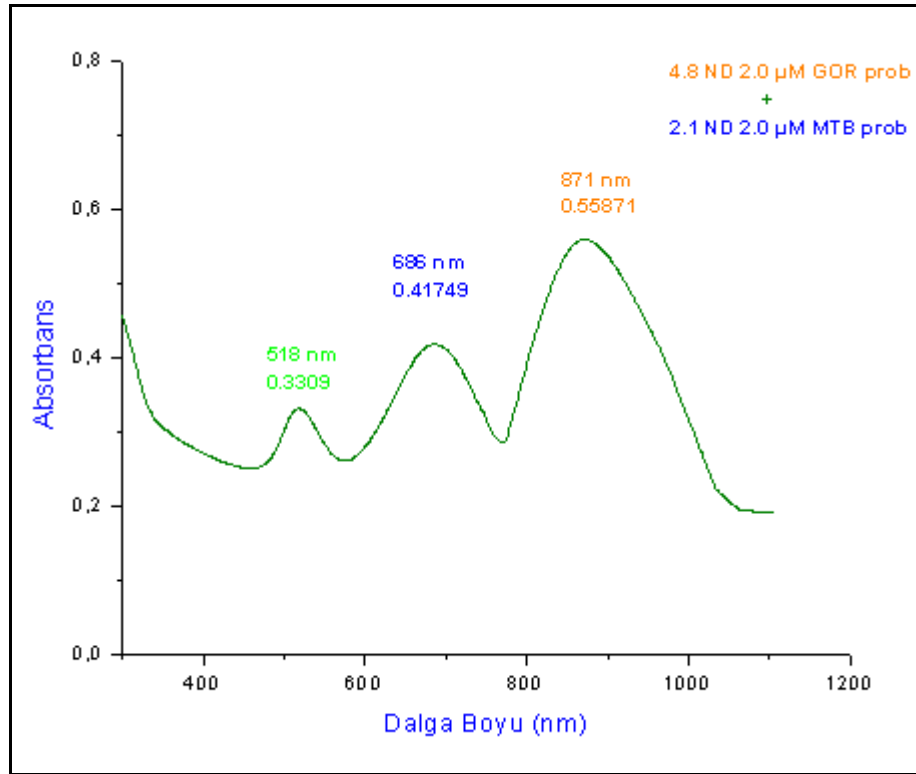
Bu bölümde farklı problemler takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışımlarını içeren mikroemülsiyonlar ("nanoarrayler") hazırlanmıştır. Bunlar şöyledir:

- a) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı,
- b) Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı,
- c) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül MTB prob karışımı,
- d) Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül MTB prob karışımı.

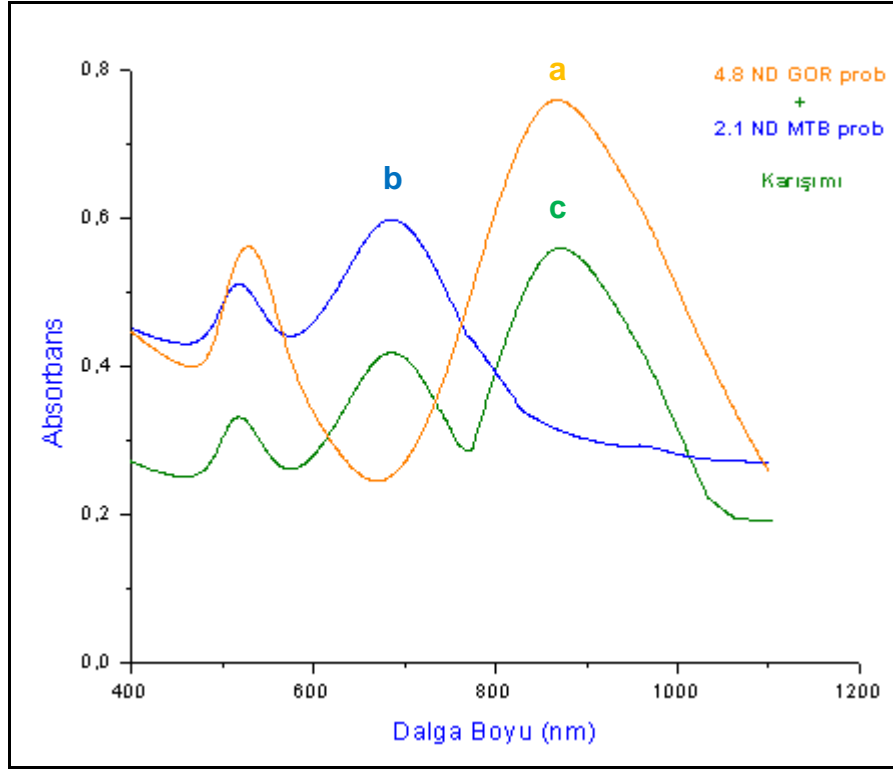
Bu ikili karışımlar ile oluşturulan mikroemülsiyon fazda DNA nanoarray çalışmaları ayrı başlıklar altında anlatılmıştır.

Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı

2.0 μM derişiminde GOR prob oligonükleotiti bağlanmış altın nanoçubuk (A.R. 4.8) probu ile 2.0 μM derişiminde MTB prob oligonükleotiti bağlanmış altın nanoçubuk (A.R. 2.1) probu aynı hacimde karıştırılmıştır. Şekil 4.58'de farklı altın nanoçubuk prob karışımının plasmon dalga boylarını gösteren UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca Şekil 4.59'da altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu, altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu ve bu her iki nanoçubuk prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumları aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Çizelge 4.24'de altın nanoçubuk problemlerinin ve farklı iki prob takılı altın nanoçubuk karışımının eksnel plasmon dalga boyları verilmiştir.



Şekil 4.58. Farklı altın nanoçubuk prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.59. Farklı altın nanoçubuk prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu a) altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu b) altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu c) altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu karışımı.

Çizelge 4.24. Altın nanoçubuk problelerinin ve farklı iki prob takılı altın nanoçubuk karışımının aksenal plasmon dalga boyları.

| Örnekler | 2.pik absorbans | 3.pik absorbans | 2.pik dalga boyu (nm) | 3.pik dalga boyu (nm) |
|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| 4.8 ND-GOR prob | 0.76 | - | 868 | - |
| 2.1 ND-MTB prob | 0.60 | - | 686 | - |
| İkili prob karışımı | 0.42 | 0.56 | 685 | 871 |

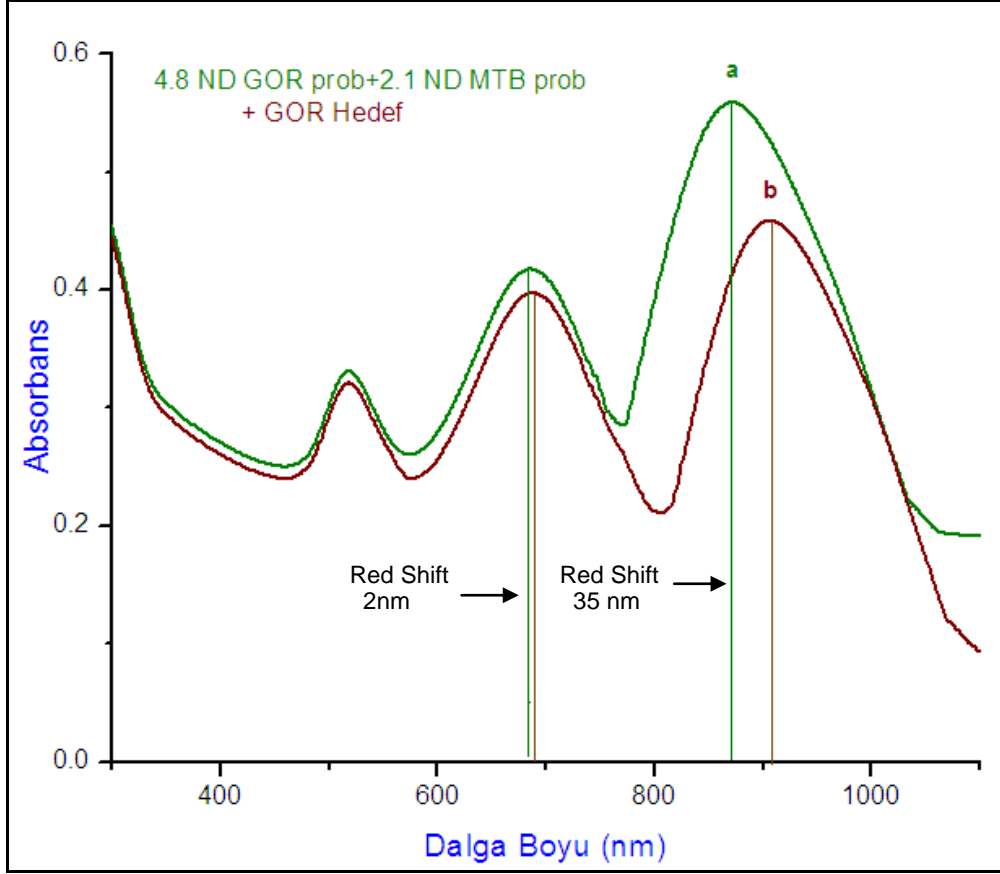
Şekil 4.59’da görüldüğü gibi altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu 868 nm dalga boyunda, altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu 686 nm dalga boyunda aksenal

plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoçubuk karışımı ise biri 685 nm diğeri 871 nm’de olmak üzere iki tane eksenel plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi 685 nm’deki plasmon dalga boyu MTB probu bağlanmış aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuk probunu 871 nm’deki plasmon dalga boyu ise GOR probu bağlanmış aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuk probunu göstermektedir. Dolayısıyla farklı iki nanoçubuk prob karışımının her bir nanoçubuğa özgü pikini kaybetmeden çok az dalga boyu kayması göstererek taşıdığı görülmüştür.

İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı hem GOR hedefi ile hem de MTB hedefi ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilerek eksenel plasmon dalga boyu kaymaları incelenmiştir. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı 2.0 µM derişiminde GOR hedef ve MTB hedef oligonükleotitleri ile ayrı ayrı etkileştirilerek elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu sırasıyla Şekil 4.60 ve Şekil 4.61’de verilmiştir. Çizelge 4.25 ve Çizelge 4.26’da sırasıyla iki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının GOR hedefi ve MTB hedefi ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve red-shift değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.25. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının GOR hedefi ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

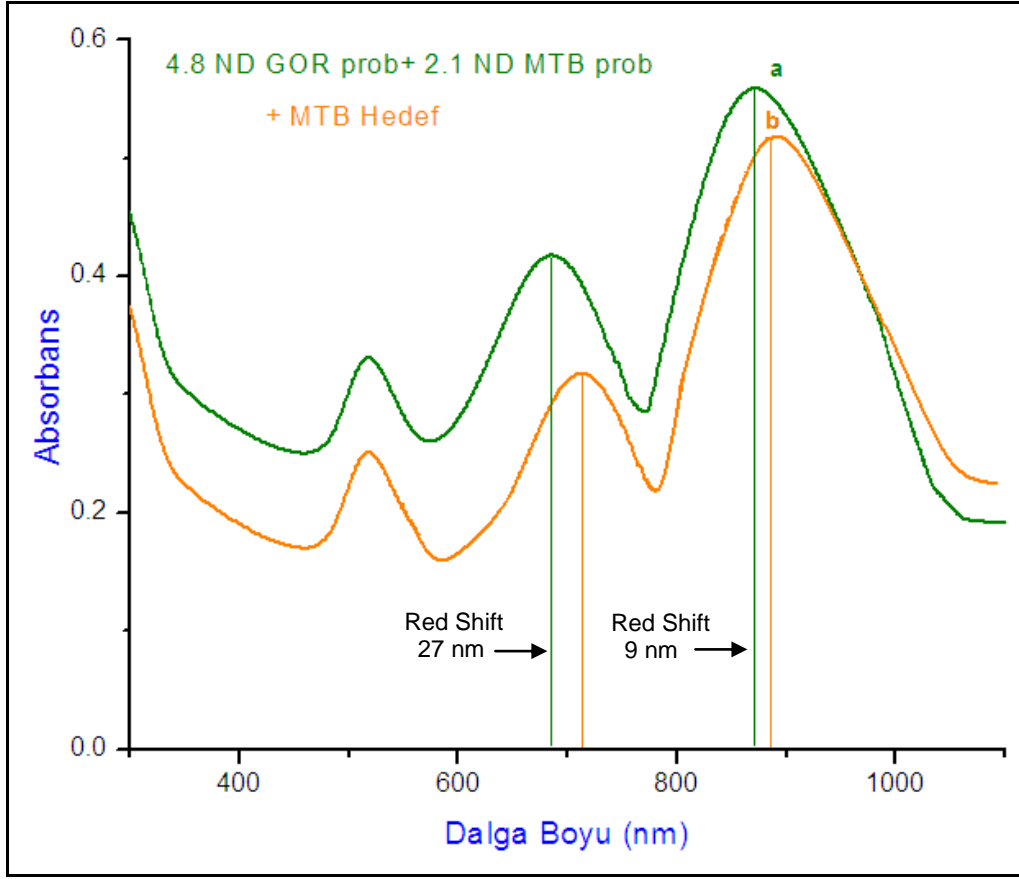
| Örnekler | 2.pik absorbans | 3.pik absorbans | 2.pik dalga boyu (nm) | 3.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| İkili prob karışımı | 0.42 | 0.55 | 685 | 871 |
| 2.0 µM GOR hedef | 0.39 | 0.45 | 687 | 906 |
| Absorbans değişimi | 0.03 | 0.10 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{GOR}$, nm) | - | - | 2 | 35 |



Şekil 4.60. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının GOR hedefi ile etkileşimi sonucu UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

Şekil 4.60 ve Çizelge 4.25’de görüldüğü üzere iki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı 685 nm ve 871 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda aksenal plasmon dalga boyu göstermektedir. Bu karışım GOR hedefi ile etkileşimi sonucu 687 nm ve 906 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 2 nm’lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 35 nm’lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla GOR probu bağlanmış altın nanoçubuğun GOR hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu görülmüştür. MTB probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için önemli bir derecede dalga boyu kayması görülmemiştir.

İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı 2.0 μ M derişiminde MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştirilerek elde edilen UV-Vis absorpsiyon spektrumu Şekil 4.61’de verilmiştir.



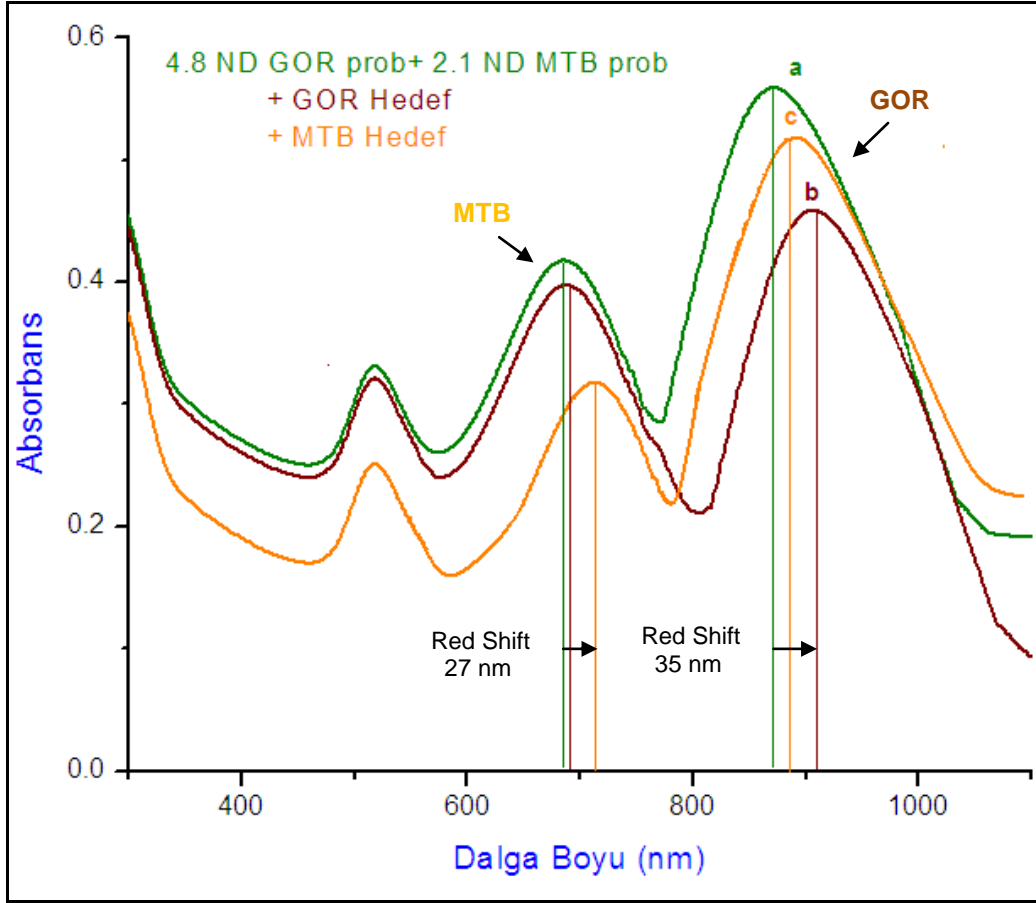
Şekil 4.61. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının MTB hedefi ile etkileşimi sonucu UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

Çizelge 4.26. İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımının MTB hedefi ile etkileşimi sonucu aksenal plasmon dalga boyu ve red-shift değerleri.

| Örnekler | 2.pik absorbans | 3.pik absorbans | 2.pik dalga boyu (nm) | 3.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| İkili prob karışımı | 0.42 | 0.55 | 685 | 871 |
| 2.0 µM MTB hedef | 0.31 | 0.51 | 712 | 880 |
| Absorbans değişimi | 0.10 | 0.04 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{MTB}$, nm) | - | - | 27 | 9 |

Şekil 4.61 ve Çizelge 4.26'da görüldüğü üzere iki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı 685 nm ve 871 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda eksenel plasmon dalga boyu göstermektedir. Bu karışım MTB hedefi ile etkileşimi sonucu 712 nm ve 880 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 27 nm'lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 9 nm'lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun MTB hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu görülmüştür. GOR probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için 9 nm'lik birdalga boyu kayması görülmüş olup 27 nm'lik kaymanın yanında çok fazla önem arz etmemektedir.

Ayrıca Şekil 4.62'de iki farklı prob takılı altın nanoçubukların GOR ve MTB hedef oligonükleotitleri ile etkileşimi sonucu elde edilen UV/vis absorpsiyon spektrumları aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoçubuk prob karışımının GOR ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri topluca Çizelge 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.62. a) GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoçubuk prob karışımının b) GOR hedef ile etkileşiminin c) MTB hedef ile etkileşiminin UV/Vis absorpsiyon spektrumları.

Şekil 4.62 ve Çizelge 4.27’de görüldüğü gibi farklı iki prob takılı altın nanoçubuk problemlerinin GOR hedefi ile etkileşimi sonucu GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 35 nm’lik bir red-shift gösterirken MTB hedefi ile etkileşimi sonucu MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 27 nm’lik bir red-shift göstermiştir. Literatürde yapılan benzer çalışmalarla uyumlu sonuçlar elde edilmiştir. Wang ve arkadaşları aspect ratio oranı 2 ve 3.2 olan altın nanoçubuklara sırasıyla anti-E. coli and anti-S. typhimurium antibadilerini konjuge ederek altın nanoçubuk problemleri hazırlamışlardır. Bu nanoçubuk problemlerini karıştırarak farklı derişimlerde E. coli and S. Typhimurium antijenleri ile etkileştirerek aksnel plasmon dalga boyu kaymalarını incelemişlerdir. Her bir nanoçubuk biyoprobunun ilgili hedef antijeni ile etkileştiğini ve bunun sonucunda ilgili hedefin etkileştiği nanoçubuğun aksnel plasmon dalga boyunda kayma olduğunu belirtmişlerdir. Bu şekilde farklı aspect ratio oranındaki altın

nanoçubukların farklı patojen türleri ile fonksiyonlandırılarak iki farklı hedefin eş zamanlı olarak basit, kısa sürede, herhangi kompleks bir sisteme ihtiyaç olmadan tayin edilebileceğini rapor etmişlerdir (Wang, 2008).

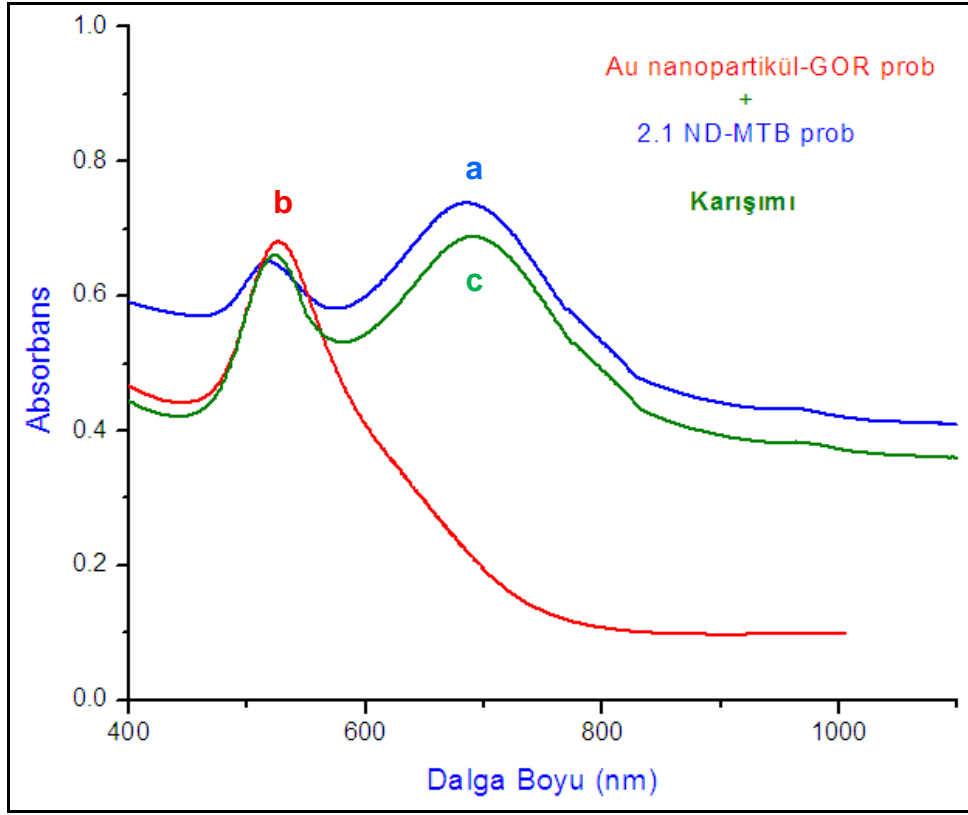
Çizelge 4.27. GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoçubuk prob karışımının GOR ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu eksenel plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

| Örnekler | 2.pik absorbans | 3.pik absorbans | 2.pik dalga boyu (nm) | 3.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| İkili prob karışımı | 0.42 | 0.55 | 685 | 871 |
| 2.0 µM GOR hedef | 0.39 | 0.45 | 687 | 906 |
| Absorbans değişimi | 0.03 | 0.10 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{GOR}$, nm) | - | - | 2 | 35 |
| İkili prob karışımı | 0.42 | 0.55 | 685 | 871 |
| 2.0 µM MTB hedef | 0.31 | 0.51 | 712 | 880 |
| Absorbans değişimi | 0.10 | 0.04 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{MTB}$, nm) | - | - | 27 | 9 |

Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı

2.0 µM derişiminde MTB prob oligonükleotiti bağlanmış altın nanoçubuk (A.R. 2.1) probu ile 2.0 µM derişiminde GOR prob oligonükleotiti bağlanmış küresel altın nanopartikül probu aynı hacimde karıştırılmıştır. Şekil 4.63'de altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu, altın nanopartikül GOR probu ve bu her iki prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumları aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Çizelge 4.28'de altın

nanoçubuk MTB probu, altın nanopartikül GOR probu ve farklı iki prob takılı altın nanoçubuk ve nanopartikül karışımının plasmon dalga boyları verilmiştir.



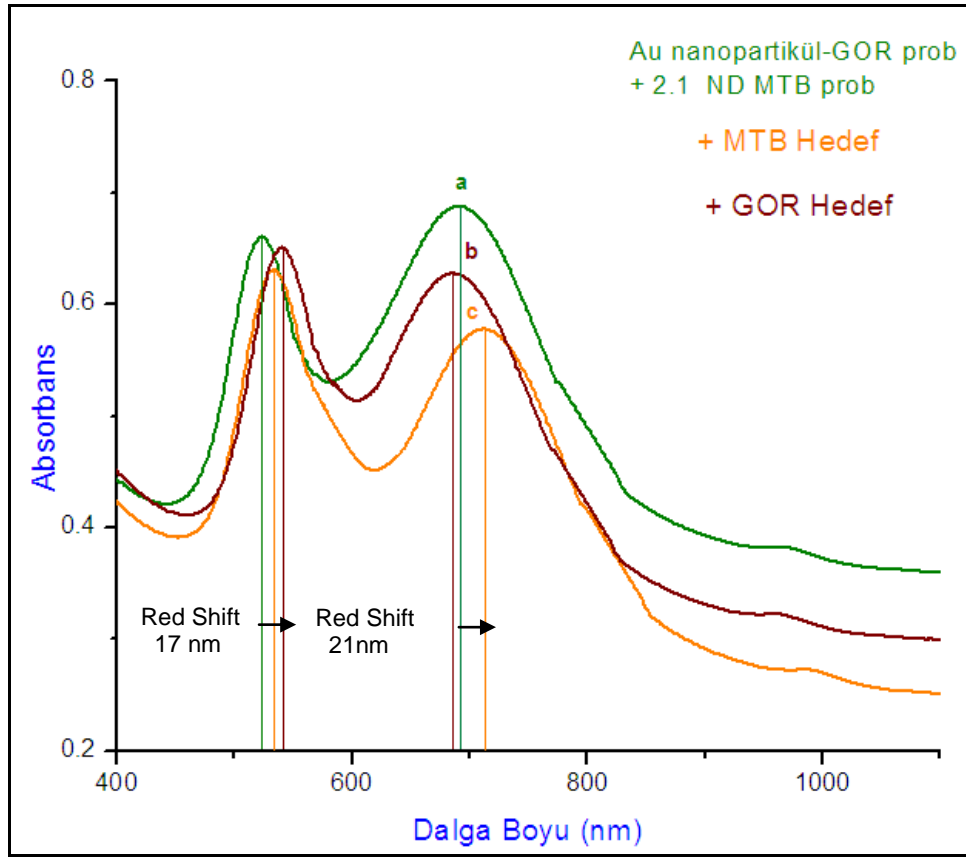
Şekil 4.63. a) Altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probunun b) Altın nanopartikül GOR probunun c) Altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu ile altın nanopartikül GOR probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

Çizelge 4.28. Altın nanoçubuk ve nanopartikül problelerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 2.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) | 2.pik dalga boyu (nm) |
|---------------------|-----------------|-----------------|-----------------------|-----------------------|
| Au-GOR prob | 0.67 | - | 527 | - |
| 2.1 ND-MTB prob | 0.65 | 0.74 | 517 | 686 |
| İkili prob karışımı | 0.66 | 0.69 | 522 | 691 |

Şekil 4.63'de görüldüğü gibi altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu 517 nm 'de radyal 686 nm'de aksenal plasmon dalga boyu verirken altın nanopartikül GOR probu sadece 527 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise biri 522 nm diğeri 691 nm'de olmak üzere iki tane plasmon dalga boyu vermiştir. Bunlardan ilki radyal plasmon dalga boyu olup diğeri aksenal plasmon dalga boyudur. Görüldüğü gibi 522 nm'deki plasmon dalga boyu GOR probu bağlanmış altın nanopartikül probuna 691 nm'deki plasmon dalga boyu ise MTB probu bağlanmış aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuk probuna ait olduğu söylenebilir. Dolayısıyla farklı iki nanoprob karışımının hem altın nanopartikül probuna hem de altın nanoçubuk probuna özgü pikini kaybetmeden taşıdığı görülmüştür. Altın nanopartikül probuna özgü plasmon dalga boyunda 5 nm'lik blue-shift, altın nanoçubuk probuna özgü plasmon dalga boyunda 5 nm'lik bir red-shift oluşmuştur.

İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı hem GOR hedefi ile hem de MTB hedefi ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilerek plasmon dalga boyu kaymaları incelenmiştir. İki farklı prob takılı altın nanopartikül ve nanoçubuk karışımı 2.0 μM derişiminde GOR hedef ve MTB hedef oligonükleotitleri ile ayrı ayrı etkileştirilerek elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu aynı şekil üzerinde gösterilmiş olup Şekil 4.64'de verilmiştir. Çizelge 4.29'da iki farklı prob takılı altın nanoprob karışımının GOR hedefi ve MTB hedefi ile etkileşimi sonucu plasmon dalga boyları ve dalga boyu kayma değerleri birlikte gösterilmiştir.



Şekil 4.64. a) GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoprob karışımının b) GOR hedef ile etkileşiminin c) MTB hedef ile etkileşiminin UV/Vis absorpsiyon spektrumları

Şekil 4.64 ve Çizelge 4.29'da görüldüğü üzere iki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı 523 nm ve 691 nm olmak üzere iki farklı dalga boyunda plasmon vermektedir. Bu karışım GOR hedefi ile etkileşimi sonucu 540 nm ve 686 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 5 nm'lik dalga boyu azalması şeklinde blue-shift gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 17 nm'lik dalga boyu kayması (red-shift) gözlemlenmiştir. Dolayısıyla GOR probu bağlanmış altın nanoparticülün GOR hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu görülmüştür. MTB probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için önemli bir derecede dalga boyu kayması olmayıp tam tersi dalga boyu azalması görülmüştür.

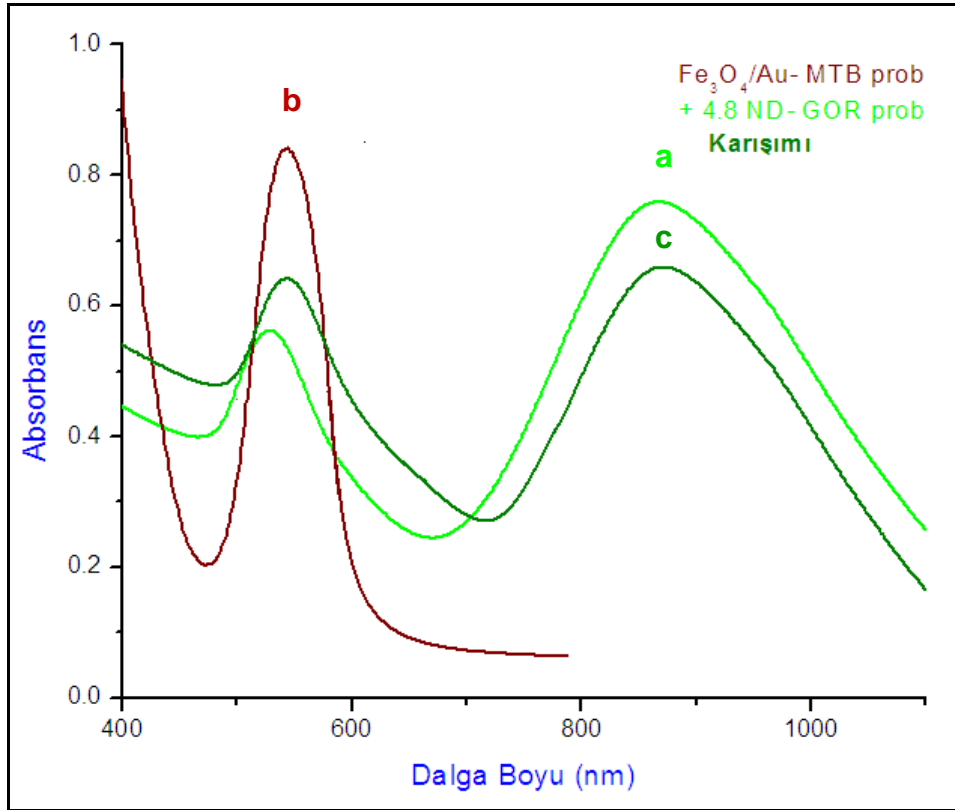
Çizelge 4.29. GOR ve MTB takılı farklı iki altın nanoprob karışımının GOR ve MTB hedef ile etkileşimi sonucu plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 2.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) | 2.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| İkili prob karışımı | 0.66 | 0.69 | 523 | 691 |
| 2.0 µM GOR hedef | 0.64 | 0.63 | 540 | 686 |
| Absorbans değişimi | 0.02 | 0.10 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{GOR}$, nm) | - | - | 17 | 5 |
| İkili prob karışımı | 0.66 | 0.69 | 523 | 691 |
| 2.0 µM MTB hedef | 0.62 | 0.57 | 533 | 712 |
| Absorbans değişimi | 0.04 | 0.12 | - | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{MTB}$, nm) | - | - | 10 | 21 |

Aynı şekilde iki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı MTB hedefi ile etkileştiğinde 533 nm ve 712 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 21 nm'lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 10 nm'lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun MTB hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının olduğu görülmüştür. GOR probu takılı altın nanopartikülde ise eşleniği GOR hedef olmadığı için 10 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüş olup 21 nm'lik kaymanın yanında çok fazla önem arz etmediği düşünülmektedir. Görüldüğü gibi farklı iki prob takılı altın nanoprobalarının GOR hedefi ile etkileşimi sonucu GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 17 nm'lik bir red-shift gösterirken MTB hedefi ile etkileşimi sonucu MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 21 nm'lik bir red-shift göstermiştir.

Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikül MTB prob karışımı

2.0 μM derişiminde GOR prob oligonükleotiti bağlanmış altın nanoçubuk (A.R. 4.8) probu ile 2.0 μM derişiminde MTB prob oligonükleotiti bağlanmış altın kaplı manyetik nanopartikül probu aynı hacimde karıştırılmıştır. Şekil 4.65'de altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probu ve bu her iki prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumları aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Çizelge 4.30'da altın nanoçubuk GOR probu, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probu ve farklı iki prob takılı altın nanoçubuk ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül karışımının plasmon dalga boyları verilmiştir.



Şekil 4.65. a) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probunun b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probunun c) Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu.

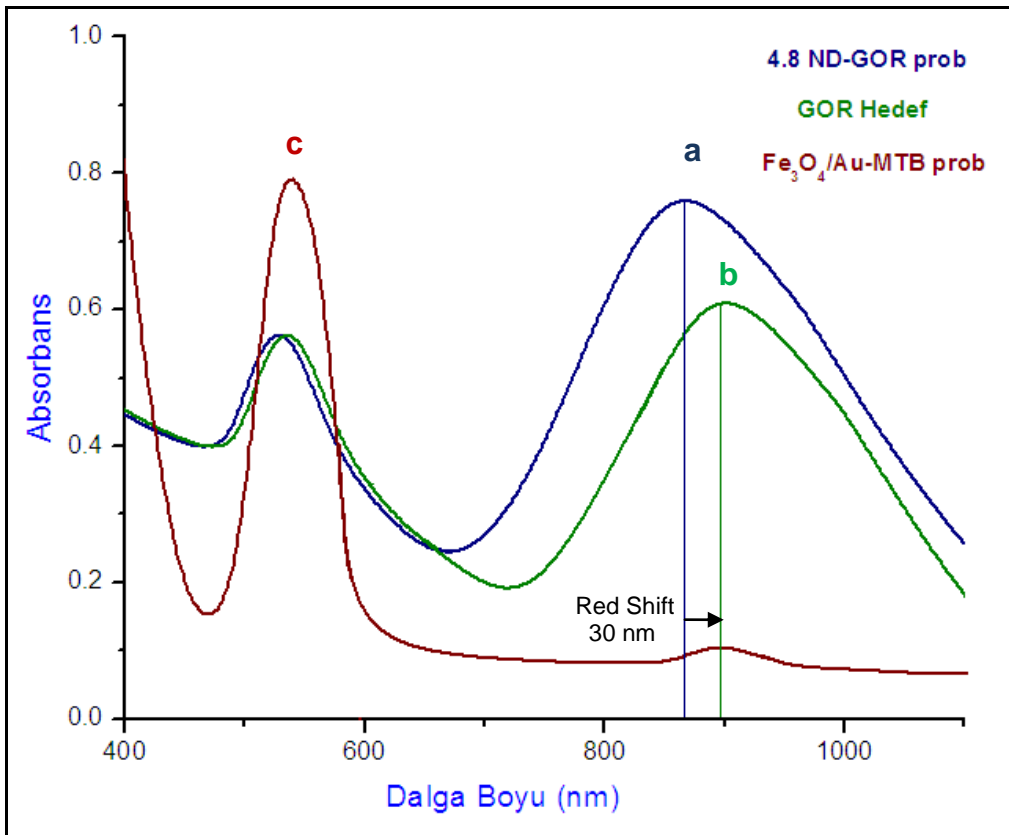
Çizelge 4.30. Altın nanoçubuk ve Fe₃O₄/Au nanopartikül problemlerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 2.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) | 2.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fe ₃ O ₄ /Au-MTB prob | 0.84 | - | 544 | - |
| 4.8 ND-GOR prob | 0.56 | 0.76 | 528 | 868 |
| İkili prob karışımı | 0.64 | 0.65 | 542 | 870 |

Şekil 4.65 ve Çizelge 4.30'da görüldüğü gibi altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu 528 nm'de radyal 868 nm'de aksenal plasmon dalga boyu verirken, Fe₃O₄/Au nanopartikül MTB probu sadece 544 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise biri 542 nm diğeri 870 nm'de olmak üzere iki tane plasmon dalga boyu vermiştir. Bunlardan ilki radyal plasmon dalga boyu olup diğeri aksenal plasmon dalga boyudur. Görüldüğü gibi 542 nm'deki plasmon dalga boyu MTB probu bağlanmış Fe₃O₄/Au nanopartikül probuna 870 nm'deki plasmon dalga boyu ise GOR probu bağlanmış aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuk probuna ait olduğu söylenebilir. Dolayısıyla farklı iki nanoprob karışımının hem Fe₃O₄/Au nanopartikül probuna hem de altın nanoçubuk probuna özgü pikini kaybetmeden taşıdığı görülmüştür. Fe₃O₄/Au nanopartikül probuna özgü plasmon dalga boyunda 2 nm'lik blue-shift, altın nanoçubuk probuna özgü plasmon dalga boyunda 2 nm'lik bir red-shift oluşmuştur.

İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı hem GOR hedefi ile hem de MTB hedefi ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilerek plasmon dalga boyu kaymaları incelenmiştir. İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı 2.0 µM derişiminde GOR hedef ve MTB hedef oligonükleotitleri ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işlemi sonunda bağlanmayan hedef oligonükleotitler santrifüjleme işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra karışım içindeki Fe₃O₄/Au nanopartiküllerin manyetik özelliklerinden faydalanarak manyetik ayırma işlemi yapılarak manyetik özellik taşıyan ve taşımayan kısımların ayrı ayrı UV/Vis absorpsiyon spektrumu

ölçümü yapılmıştır. Hedefin ilgili olduğu probun UV/Vis absorpsiyon spektrumu ile manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısımların UV/Vis absorpsiyon spektrumu karşılaştırılmış olup aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Şekil 4.66'da altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe_3O_4/Au nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Çizelge 4.31'de nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.66. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe_3O_4/Au nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) Altın nanoçubuk (A.R.4.8)-GOR prob b) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım c) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım.

Çizelge 4.31. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 2.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) | 2.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| 4.8 ND-GOR prob | 0.56 | 0.76 | 528 | 868 |
| 2.0 µM GOR hedef (Manyetik olmayan kısım) | 0.49 | 0.62 | 536 | 898 |
| Fe ₃ O ₄ /Au-MTB prob (Manyetik kısım) | 0.79 | 0.09 | 540 | 897 |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{GOR}$, nm) | - | - | - | 30 |

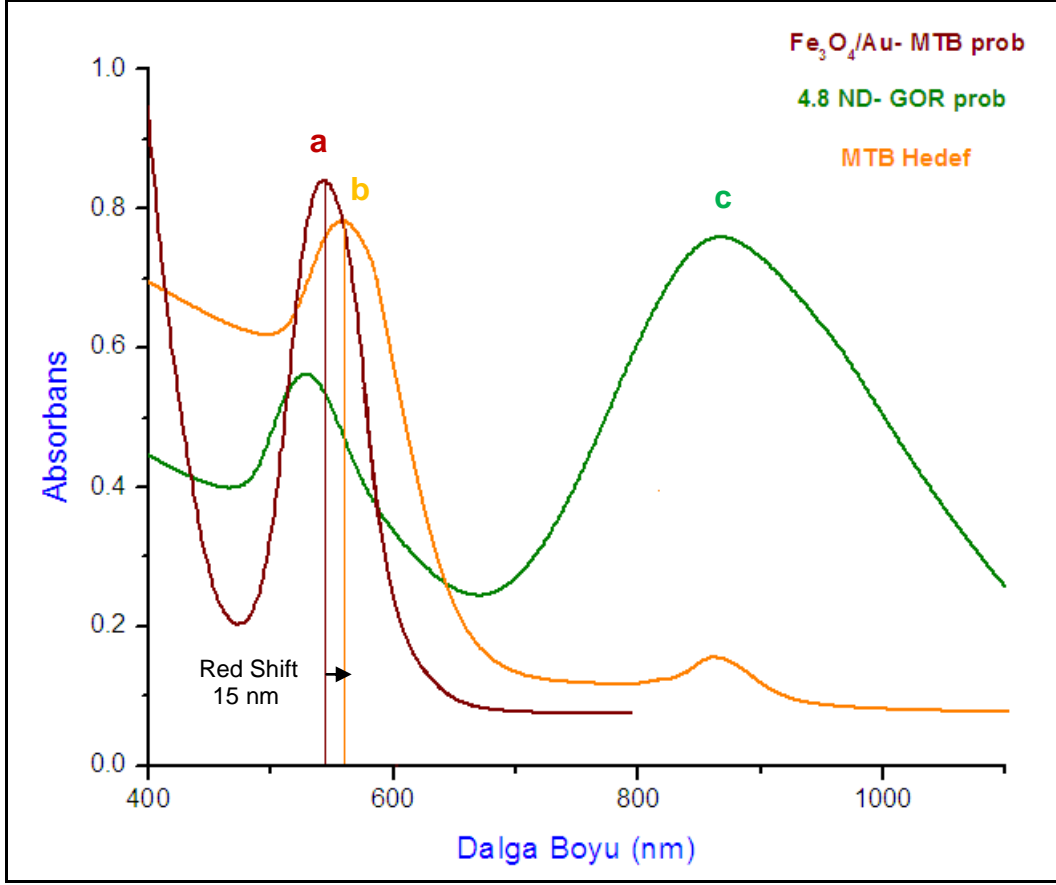
İki farklı prob takılı altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül karışımı GOR hedefi ile etkileştirilip manyetik olarak ayrılmıştır. Manyetik özellik gösteren çözelti MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartiküldür. Manyetik özellik gösteremeyen çözelti ise GOR probu taşıyan altın nanoçubuktur (A.R 4.8). Bu ikili karışım GOR hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik özellik göstermeyen çözeltinin plasmon dalga boyunda kayma göstermesi beklenmektedir. Prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu dalga boyu kayması gösterip göstermediğini incelemek amacıyla hedefin ilgili olduğu GOR probu taşıyan altın nanoçubuğun (A.R 4.8) UV/Vis absorpsiyon spektrumu karşılaştırılmıştır Şekil 4.66 ve Çizelge 4.31'e bakıldığında manyetik özellik göstermeyen çözeltinin 536 nm'de radyal 898 nm'de eksenel plasmon dalga boyu vermiştir. GOR probu taşıyan altın nanoçubuk (A.R 4.8) ise 528 nm'de radyal 868 nm'de eksenel plasmon dalga boyu göstermektedir. Radyal yönde 8 nm'lik eksenel yönde ise 30 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüştür. Prob karışımı içindeki GOR probu taşıyan altın nanoçubuğun GOR hedef oligonükleotiti ile etkileştiği ve bunun sonucu 30 nm'lik bir dalga boyu kayması oluşturduğu görülmüştür. Manyetik özellik taşıyan çözelti ise 540 nm'de radyal yönde plasmon verirken çok düşük absorbans değerinde 897 nm'de eksenel plasmon dalga boyu

vermiştir. MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartikülünün plasmon dalga boyuna bakıldığında (Çizelge 4.30) sadece 544 nm’de radyal plasmon dalga boyu vermektedir. Dolayısıyla MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartikülünün radyal plasmon dalga boyunda kayma olmadığı GOR hedefin MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartikülü ile etkileşmediği görülmüştür. Ayrıca manyetik özellik gösteren çözeltinin 897 nm’de gösterdiği çok küçük değerdeki aksenal plasmon dalga boyu manyetik ayırma sırasında bir kısım GOR hedef bağlanmış GOR prob taşıyan altın nanoçubuklarında karıştığını göstermektedir.

Şekil 4.67’de altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Çizelge 4.32’de nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.32. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 2.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) | 2.pik dalga boyu (nm) |
|---|--------------------|--------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fe ₃ O ₄ /Au-MTB prob | 0.84 | - | 544 | - |
| 2.0 µM MTB hedef (Manyetik kısım) | 0.49 | 0.12 | 559 | 871 |
| 4.8 ND-GOR prob (Manyetik olmayan kısım) | 0.48 | 0.68 | 532 | 872 |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{MTB}$, nm) | - | - | 15 | - |



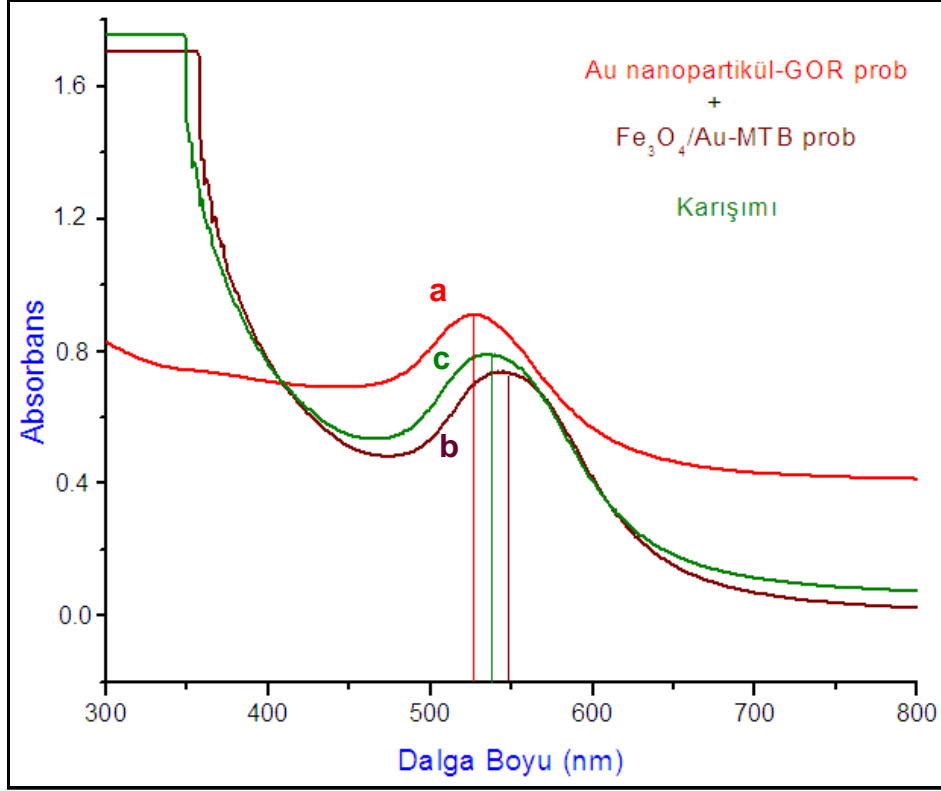
Şekil 4.67. Altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları a) Fe₃O₄/Au nanopartikül-GOR prob b) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım c) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım.

İki farklı prob takılı altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül karışımı MTB hedefi ile etkileştirilip manyetik olarak ayrılmıştır. Manyetik özellik gösteren çözelti MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartiküldür. Manyetik özellik göstermeyen çözelti ise GOR probu taşıyan altın nanoçubuktur (A.R 4.8). Bu ikili karışım MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik özellik gösteren çözeltinin plasmon dalga boyunda kayma göstermesi beklenmektedir. Prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu dalga boyu kayması gösterip göstermediğini incelemek amacıyla MTB hedefin ilgili olduğu MTB probu taşıyan Fe₃O₄/Au nanopartikülün UV/Vis absorpsiyon spektrumu karşılaştırılmıştır. Şekil 4.67 ve Çizelge 4.32'e bakıldığında manyetik özellik gösteren çözeltinin 559 nm'de radyal 871 nm'de aksenal plasmon

dalga boyu vermiştir. MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülü ise 544 nm'de radyal plasmon dalga boyu göstermektedir. Radyal yönde 15 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüştür. Prob karışımı içindeki MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülün MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştiği ve bunun sonucu 15 nm'lik bir dalga boyu kayması oluşturduğu görülmüştür. Ayrıca manyetik özellik gösteren çözeltinin 871 nm'de gösterdiği çok küçük değerdeki eksenel plasmon dalga boyu manyetik ayırma sırasında bir kısım GOR prob taşıyan altın nanoçubukların olduğunu göstermektedir. Manyetik özellik göstermeyen çözelti ise 532 nm'de radyal yönde plasmon verirken 872 nm'de eksenel plasmon dalga boyu vermiştir. GOR probu taşıyan altın nanoçubuğun (A.R 4.8) plasmon dalga boyuna bakıldığında (Çizelge 4.30) 528 nm'de radyal 868 nm'de eksenel plasmon dalga boyu vermektedir. Dolayısıyla GOR probu taşıyan altın nanoçubuğun (A.R 4.8) hem radyal hem de eksenel yönde 4 nm'lik bir dalga boyunda kayma oluştuğu görülmüştür. Bu 4 nm'lik dalga boyu kayması manyetik ayırma sırasında bir kısım MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülün çözelti içinde olabileceğinden kaynaklanmakta olup 15 nm'lik dalga boyu kayması yanında 4 nm'lik kaymanın çok önemli olmadığı düşünülmektedir. Dolayısıyla MTB hedefin GOR probu taşıyan altın nanoçubuk (A.R 4.8) ile etkileşmediği söylenebilir.

Küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikül MTB prob karışımı

2.0 μM derişiminde GOR prob oligonükleotiti bağlanmış altın nanopartikül probu ile 2.0 μM derişiminde MTB prob oligonükleotiti bağlanmış altın kaplı manyetik nanopartikül (Fe_3O_4/Au) probu aynı hacimde karıştırılmıştır. Şekil 4.68'de altın nanopartikül GOR probu, Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probu ve bu her iki prob karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumları aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Çizelge 4.33'de altın nanopartikül GOR probu, Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probu ve farklı iki prob takılı altın nanopartikül ve Fe_3O_4/Au nanopartikül karışımının plasmon dalga boyları verilmiştir.



Şekil 4.68. a) Altın nanopartikül GOR probunun b) $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probunun c) Altın nanopartikül GOR probu ile $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül MTB probu karışımının UV/Vis absorpsiyon spektrumu

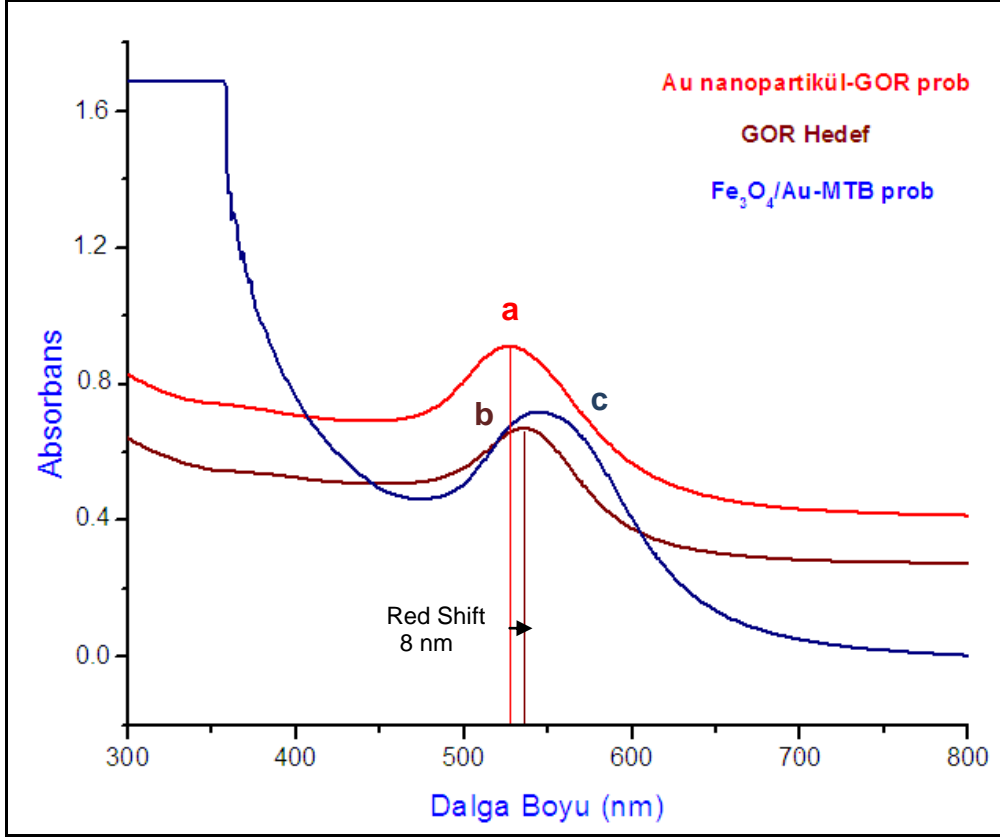
Çizelge 4.33. Altın nanopartikül ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül problelerinin ve bu iki farklı prob karışımının plasmon dalga boyları.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) |
|---|-----------------|-----------------------|
| Au-GOR prob | 0.90 | 527 |
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ -MTB prob | 0.73 | 544 |
| İkili prob karışımı | 0.78 | 535 |

Şekil 4.68 ve Çizelge 4.33'de görüldüğü gibi her iki altın nanoprob küresel partiküllerden oluştuğu için sadece radyal yönde plasmon dalga boyu vermiştir. Altın nanopartikül GOR probu 527 nm'de radyal plasmon dalga boyu verirken $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$

nanopartikül MTB probu 544 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise sadece küresel partiküllerden oluştuğu için sadece 535 nm dalga boyunda olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermiştir. Farklı iki nanoprob karışımının hem Fe_3O_4/Au nanopartikül probuna hem de altın nanopartikül probuna özgü piki göstermediği görülmüştür. Fe_3O_4/Au nanopartikül probuna göre 9 nm'lik blue-shift altın nanopartikül probuna göre 8 nm'lik bir red-shift oluşmuştur.

İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı hem GOR hedefi ile hem de MTB hedefi ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilerek plasmon dalga boyu kaymaları incelenmiştir. İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı 2.0 μM derişiminde GOR hedef ve MTB hedef oligonükleotitleri ile ayrı ayrı hibridizasyonu gerçekleştirilmiştir. Hibridizasyon işlemi sonunda bağlanmayan hedef oligonükleotitler santrifüjleme işlemi ile uzaklaştırılmıştır. Daha sonra karışım içindeki Fe_3O_4/Au nanopartiküllerin manyetik özelliklerinden faydalanarak manyetik ayırma işlemi yapılarak manyetik özellik taşıyan ve taşımayan kısımların ayrı ayrı UV/Vis absorpsiyon spektrumu ölçümü yapılmıştır. İkili nanoprob karışımı her iki nanoproba özgü pik taşımadığından prob ile hedef oligonükleotitin etkileşimi sonucu dalga boyu kaymasını incelemek amacıyla hedefin ilgili probunun UV/Vis absorpsiyon spektrumu ile manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısımların UV/Vis absorpsiyon spektrumu aynı şekil üzerinde gösterilmiştir. Şekil 4.69'da nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Çizelge 4.34 'de nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası manyetik özellik gösteren ve göstermeyen çözeltilerin plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri gösterilmiştir.



Şekil 4.69. Nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu. a) Au nanopartikül-GOR prob b) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım c) GOR hedef ile etkileşim sonucu manyetik olan kısım.

Çizelge 4.34. Nanopartikül prob karışımının GOR hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

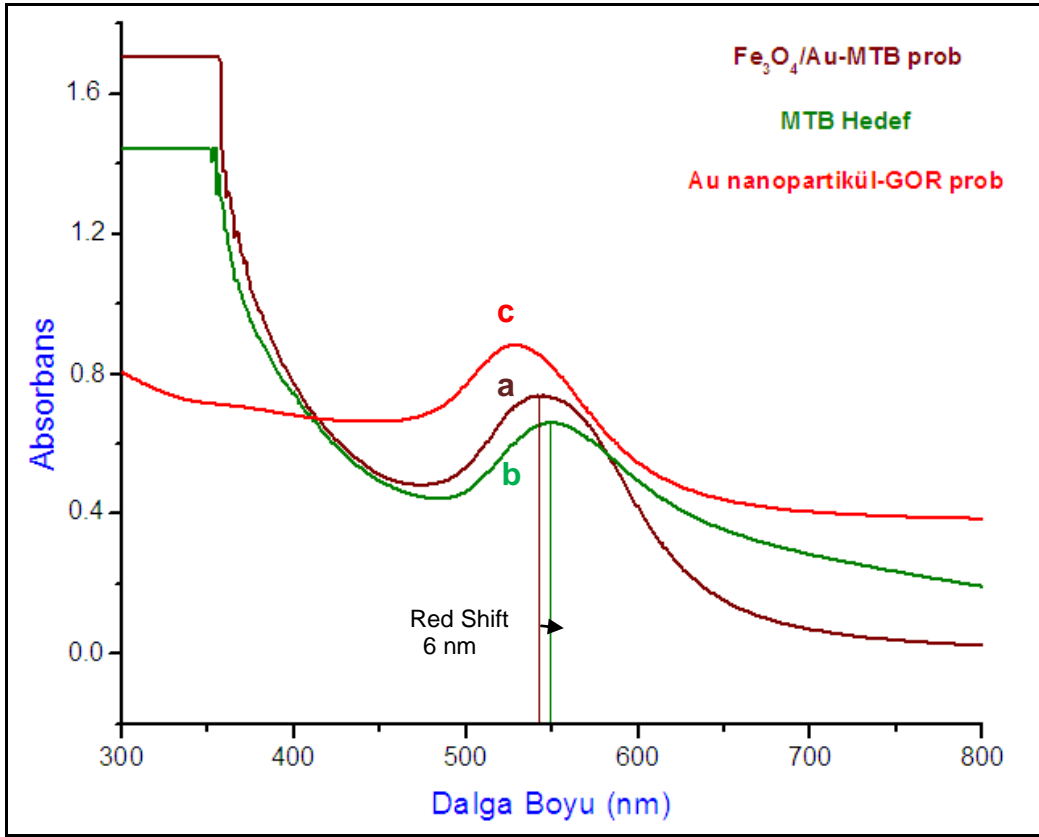
| Örnekler | 1.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) |
|---|-----------------|-----------------------|
| Au-GOR prob | 0.90 | 527 |
| 2.0 µM GOR hedef | 0.72 | 535 |
| Absorbans değişimi | 0.18 | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{GOR}$, nm) | - | 8 |

İki farklı prob takılı altın nanopartikül karışımı absorpsiyon spektrumunda her bir probun kendine özgü plasmon dalga boyunu göstermemektedir. Bu nedenle hedefin ilgili olduğu probun UV/Vis absorpsiyon spektrumu ile manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısımların UV/Vis absorpsiyon spektrumu karşılaştırılmıştır. Altın nanopartikül prob karışımı 2.0 μM derişiminde GOR hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısım birbirinden ayrılmıştır. Şekil 4.69'da görüldüğü üzere karışım GOR hedefi ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik olmayan kısım 535 nm dalga boyunda plasmon vermiştir (Şekil 4.69 b). Manyetik olmayan kısımda küresel altın GOR prob ve GOR hedef çözeltisi bulunmaktadır. Dolayısıyla altın nanopartikül GOR probu 527 nm dalga boyunda plasmon verdiği için GOR prob ve GOR hedefin etkileşimi sonucu 8 nm'lik bir dalga boyu kayması gerçekleşmiştir (Çizelge 4.34). Manyetik özellik gösteren kısmın UV/Vis absorpsiyon spektrumuna (Şekil 4.69 c) bakıldığında ise 544 nm dalga boyunda plasmon vermiş olup $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ MTB probunun gösterdiği plasmonu vermiştir. GOR hedefin MTB probu taşıyan $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü ile etkileşmediği dolayısıyla herhangi bir dalga boyu kayması oluşturmadığı görülmüştür.

Şekil 4.70'de nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumları verilmiştir. Ayrıca Çizelge 4.35'de nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri gösterilmiştir.

Çizelge 4.35. Nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası plasmon dalga boyları ve red-shift kayma değerleri.

| Örnekler | 1.pik absorbans | 1.pik dalga boyu (nm) |
|--|-----------------|-----------------------|
| $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ - MTB prob | 0.75 | 544 |
| 2.0 μM MTB hedef | 0.65 | 550 |
| Absorbans değişimi | 0.10 | - |
| Red-Shift ($\Delta\lambda_{\text{MTB}}$, nm) | - | 6 |



Şekil 4.70. Nanopartikül prob karışımının MTB hedef ile etkileşimi sonucu manyetik ayırma sonrası elde edilen UV/Vis absorpsiyon spektrumu. a) Fe₃O₄/Au- MTB prob b) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik kısım c) MTB hedef ile etkileşim sonucu manyetik olmayan kısım.

İki farklı prob takılı altın nanopartikül karışımı absorpsiyon spektrumunda her bir probun kendine özgü plasmon dalga boyunu göstermemektedir. Bu nedenle hedefin ilgili olduğu probun UV/Vis absorpsiyon spektrumu ile manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısımların UV/Vis absorpsiyon spektrumu karşılaştırılmıştır. Altın nanopartikül prob karışımı 2.0 µM derişiminde MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısım birbirinden ayrılmıştır. Şekil 4.70’de görüldüğü üzere karışım MTB hedefi ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik olan kısım 550 nm dalga boyunda plasmon vermiştir (Şekil 4.70 b). Manyetik olan kısımda Fe₃O₄/Au-MTB prob ve MTB hedef çözeltisi bulunmaktadır. Dolayısıyla Fe₃O₄/Au-MTB probu 544 nm dalga boyunda plasmon verdiği için MTB prob ve MTB hedefin etkileşimi sonucu 6

nm'lik bir dalga boyu kayması gerekleŒmiŒtir (izelge 4.35). Manyetik olmayan kısının UV/Vis absorpsiyon spektrumuna (Œekil 4.70 c) bakıldığında ise 527 nm dalga boyunda plasmon vermiŒ olup Au nanopartikül GOR probunun gosterdiği plasmonu vermiŒtir. MTB hedefin GOR probu taŒıyan altın nanopartikülü ile etkileŒmediđi dolayısıyla herhangi bir dalga boyu kayması oluŒturmadıđı gorülmüŒtür.

Yapılan bu alıŒma ile küresel nanopartikül problemlerinin hedef ile etkileŒimi sonucu dalga boyu kayma değerlerinin altın nanoçubuk problemlerine göre daha az olduğu gorülmüŒtür. Literatürde de ortamın refraktif indeks deđiŒimine eksenel plasmon dalga boylarının daha hassas olduğu belirtilmiŒtir (Yu, 2006).

4.2.2. SPR Destekli Elipsometre Çalışmaları

SPR sensörleri, altın, gümüş gibi metalik film ile kaplı yüzey üzerinde antijen-antibadi ya da nükleik asit eşleşmeleri gibi çeşitli nedenlerden oluşan ve SPR yüzeyinde biriken biyolojik filmler nedeniyle kırılma indisindeki (“refractive index”, RI) küçük değişiklikleri belirleyebilen ve çok sıkça kullanılan bir analitik ölçüm cihazıdır. Son yıllarda Au film tabakası yerine Au nanopartiküllerin kullanıldığı lokalize SPR sistemleri normal SPR sistemlerine alternatif olarak geliştirilmiştir. Bu sistemlerde tanıyıcı (ligand) molekülleri cam slaytların yüzeyine yerleştirilmiş altın nanopartiküllerinin yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, ortamın dielektrik sabiti ve dolayısıyla refraktif indeksi değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Böylece herhangi bir çeviriciye gerek olmadan yüksek seçicilik ve hassasiyette, etiket gerektirmeden, basit, ucuz ve taşınabilir Au nanopartikül esaslı SPR sensörleri geliştirilerek çeşitli patojenik bakteriler ve genetik hastalıklar tayin edilebilmektedir. Sunulan bu çalışmada, boyut ve şekline bağlı olarak farklı optik özellikler gösteren altın nanopartiküllerin plasmon özelliklerinden faydalanarak *M. gordonae* patojenine özgü nanopartikül esaslı SPR sensörü geliştirilmesi ve sistemin seçiciliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

Tez çalışmasının bu kısmında Bölüm 4.1’de ayrıntılı olarak ele alınan farklı boy, şekil ve yapıdaki altın nanopartiküllerin sentez ve karakterizasyonu sonucu SPR destekli elipsometre biyosensörlerinde kullanılabilirliğini araştırmak üzere dört farklı altın nanopartikül ile çalışmalar yapılmıştır. Bunlar; ortalama 13 nm çapa sahip küresel altın nanopartikül, uzunluğu 54 nm çapı 15 nm (uzunluk/çap oranı 3.5), uzunluğu 54 nm çapı 21 nm (uzunluk/çap oranı 2.6) olan iki farklı altın nanoçubuk ve 87 nm çapa sahip çekirdek/kabuk yapısında altın kaplı manyetik nanopartikül (Fe_3O_4/Au) olmak üzere dört farklı örnektir. SPR destekli elipsometre çalışmalarında *M. gordonae* patojenine özgü oligonükleotid probu (GOR) olarak 5’-HS-(CH₂)₆-(T)₁₅ CAC CCT CGG GTG CTG TC-3’ dizisi, eşlenik hedef dizisi olarak ta 5’-GA CAG CAC CCG AGG GTG-3’ dizi kullanılmıştır.

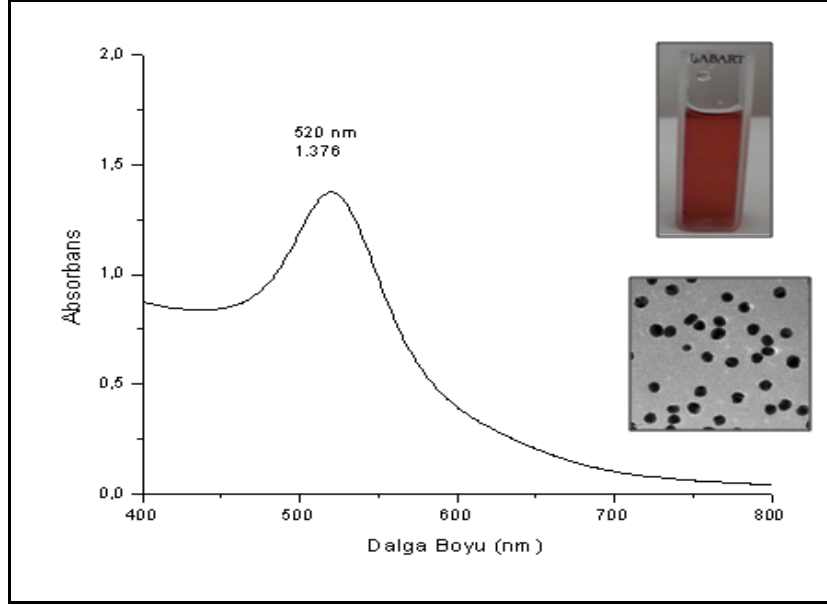
Bu çalışma için seçilen dört farklı altın nanopartikül farklı derişimlerde cam taşıyıcı yüzeylere adsorbe edilerek yüzey üzerinde tek tabaka oluşturacak optimum

nanopartikül derişimleri belirlenmiştir. Daha sonra *M. gordonae* türüne ait mikroorganizmaların tanınmasında kullanılan farklı derişimlerde oligonükleotid proplar bu nanopartiküllerin yüzeyine immobilize edilerek optimum prob derişimleri belirlenmiştir. *M. Gordonae* mikroorganizması için hazırlanan nanopartikül esaslı SPR sensörlerin farklı derişimlerdeki hedef dizileri ile hibridizasyonları gerçekleştirilerek sensörlerin duyarlılıkları ile çalışma aralıkları ve kinetik bağlanma sabitleri belirlenmiştir. Bu örneklerle yapılan çalışmalar aşağıda ayrı bölümler halinde anlatılmıştır.

4.2.2.1 Küresel Altın Nanopartiküllerin SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı

Son yıllarda moleküler düzeyde etkileşmelerin kantitatif izlenmesi için geliştirilen en iyi sistemlerden biri olan SPR'de tanıyıcı (ligand) molekülleri altın kaplı cam slaytların yüzeyine immobilize edilmekte ve hedef molekülü içeren sıvı fazla etkileştirilerek, yüzeydeki yoğunluk değişiminin optik olarak gözlenmesiyle tayin gerçekleştirilmektedir. Grubumuzda altın kaplı cam slaytlar kullanılarak *M. tuberculosis* kompleks (MTB), *M. gordonae*, İnfluenza A ve İnfluenza B virüsü için SPR sensörleri geliştirilmiştir (Duman, 2007). Tez çalışmanın bu kapsamında aynı çalışmanın altın kaplı cam slayt yerine altın nanopartikül immobilize edilmiş cam slaytlar kullanılarak sadece *M. Gordonae* patojenik bakterisine özgü sensör geliştirilmeye çalışılmıştır.

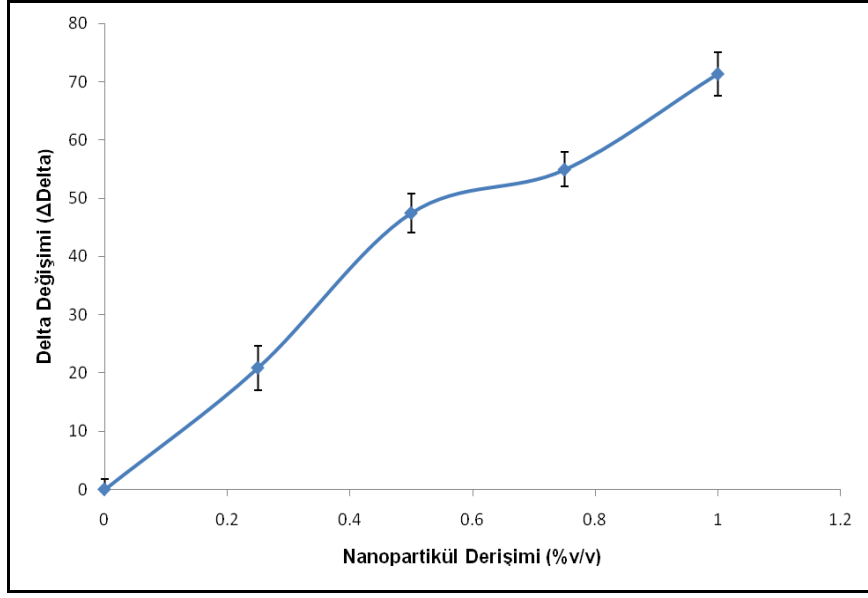
Bölüm 4.1 'de yapılan optimizasyon sonucu ortalama 13 nm partikül çapına sahip, 520 nm dalga boyunda maksimum absorbands veren küresel altın nanopartiküller ile ilk SPR destekli elipsometre sensörü çalışması yapılmış ve kullanılan nanopartikülün özellikleri Şekil 4.71'de verilmiştir.



Şekil 4.71. SPR destekli elipsometre sensöründe kullanılan küresel altın nanopartiküllerin özellikleri.

Cam Slayt Yüzeyine Küresel Altın Nanopartiküllerin İmmobilizasyonu

SPR destekli elipsometre biyosensörlerinde kullanılabilirliğini araştırmak üzere sentezlenen nanopartiküllerin cam slayt üzerinde tek tabaka oluşturacağı optimum nanopartikül derişimini belirlemek için farklı derişimlerde (0.25-1.0 %(v/v)) nanopartikül çözeltileri hazırlanmıştır. Önce cam slaytlar %1'lik 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPTS) çözeltisi ile modifiye edilerek yüzeyinde tiyol grubu oluşucak şekilde silanlama işleminden geçirilmiştir. Sonra yüzeylerindeki tiyol uç gruplarından altın nanopartiküllerin tiyol grubuna olan afinitesinden faydalanarak farklı derişimlerdeki nanopartikül çözeltileri cam yüzeyleri üzerinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı derişim değerlerine karşılık ölçülen delta değişim değerleri Şekil 4.72'de verilmiştir.



Şekil 4.72. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki küresel altın nanopartiküllerin delta değişimi.

Şekil 4.72.'de görüldüğü üzere nanopartikül derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmıştır. Hacimce yüzde 0.25 nanopartikül içeren çözeltinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu deltada 20°'lik bir değişim gözlenmiştir. Hacimce yüzde 1.0 nanopartikül içeren çözeltinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu delta değişim değeri 80°'lerde ölçülmüştür. Bu şekilde ölçülen yüksek delta değişim değerleri cam slayt yüzeyinde nanopartiküllerin tek tabaka değil de çoklu tabaka oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle cam yüzeyini tek tabakalı kaplıyacak optimum nanopartikül derişimi 0.25 (%v/v) olarak belirlenmiştir.

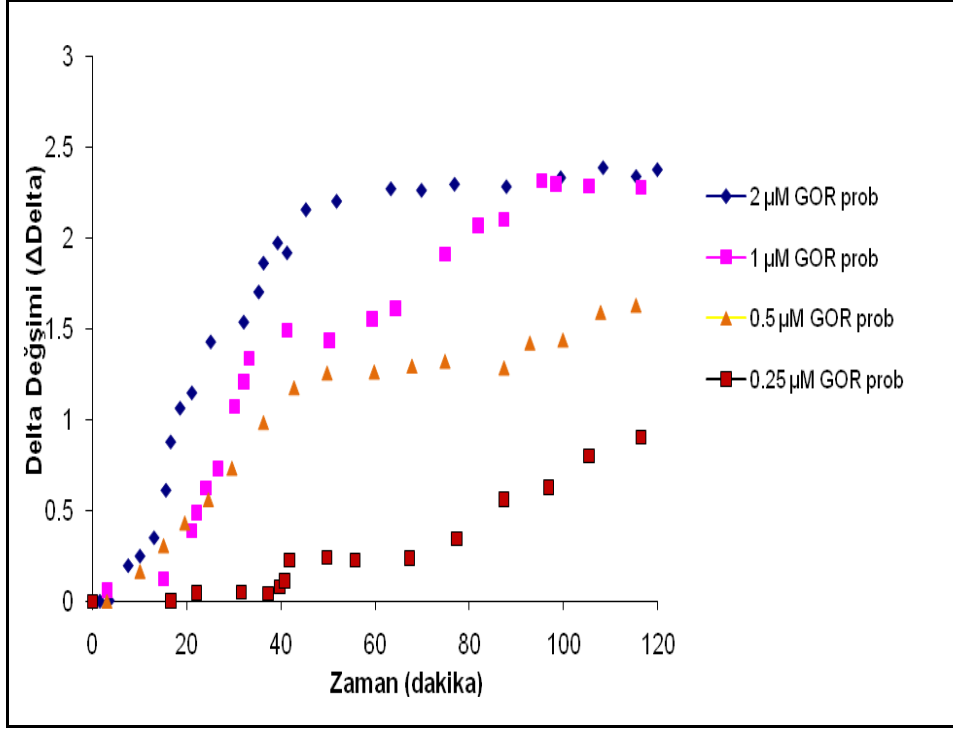
Küresel Altın Nanopartikül Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması

Oligonükleotid prob moleküllerinin, katı yüzeylere immobilizasyonu, DNA biyosensör ve nanoarray uygulamalarında çok önemli bir basamaktır. Bu hibridizasyonun verimi belirlemekte ve tayin için sinyal gücünü etkilemektedir (Garipcan, 2008). Oligonükleotitler yüzeye substrata doğru (dik) oriyente olmuş konformasyonda immobilize olursa ve tam kaplanırsa yüksek kalınlıklar beklenir. Ancak, büyük ihtimalle yüzeyin tamamıyla kaplanmasını engelleyen iyi yönlenmemiş immobilizasyon yüzünden elipsometreden elde ettiğimiz kalınlık değerleri

beklediğimiz değerlere göre daha düşüktür. Bu durumda daha sonraki hedef oligonükleotitlerle hibridizasyon aşaması için substrat yüzeylerinde doğru oriente edilmiş prob oligonükleotitlerin sayısı yeterli olacaktır. Çünkü yüksek yoğunlukta sıkıştırılmış prob immobilizasyonu; yüzeyde immobilize edilmiş oligonükleotitlerin hedef oligonükleotitlerle hibridizasyonunu olası sterik engelleme nedeniyle zorlaştırdığı ya da azalttığı için genelde çok istenmeyen bir durumdur (Wang, 2001). Bu bölümde GOR prob moleküllerinin nanopartikül yüzeyine immobilizasyonu derişimin etkisi, farklı derişimlerde oligonükleotid çözeltilerinin kullanılması ile araştırılmıştır.

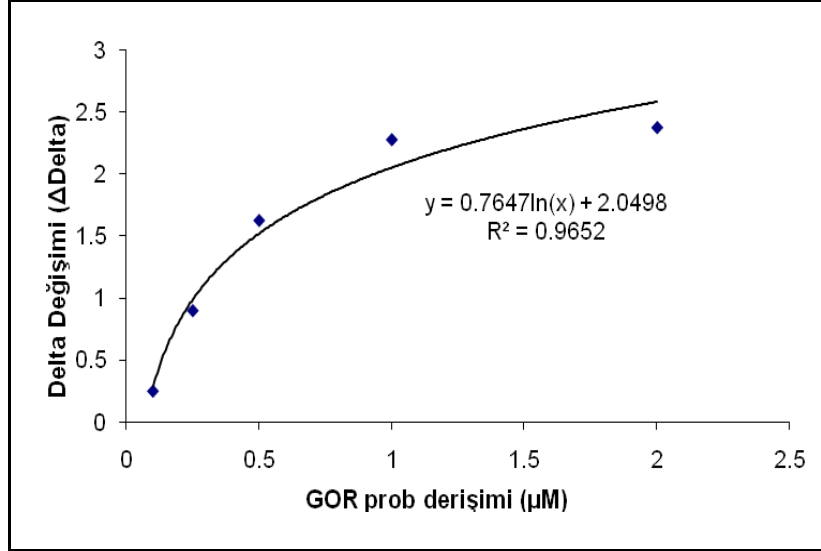
Cam yüzeyini tek tabakalı kaplıyacak optimum nanopartikül derişimi 0.25 (%v/v) olarak belirlendikten sonra aynı derişimde küresel nanopartikül immobilize edilmiş dört cam slayt hazırlanmıştır. Daha sonra küresel altın nanopartikül immobilize edilmiş dört cam slayta *M. gordonae* patojenine özgü 5'-tiyollenmiş farklı derişimlerde GOR oligonükleotit probu gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum GOR prob derişimi belirlenmiştir.

GOR prob derişim değerleri daha önce grubumuzda altın film kaplı cam slaytlar üzerine GOR prob oligonükleotitinin bağlanması konusunda çalışmış olan Mehmet Duman'ın doktora tez çalışmasına dayanılarak 0.25-2.0 μM aralığı olarak seçilmiştir [Duman, 2009]. İmmobilizasyon işlemi sırasında kullanılan tampon çözelti, bağlanmada etkili olduğu için çalışmanın bu aşamasında nanopartikül bağlanmış cam slayt yüzeyine uygun prob immobilizasyonu sağlayacak tampon çözeltisi literatür taraması sonucunda 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tamponu olarak belirlenmiştir (Wang, 2004; Manelli, 2005; Jiang, 2005; Peterlinz ve Georgiadis, 1997; Herne ve Tarlov, 1997). Bu işlem için sırası ile optimum altın nanopartikül derişimindeki cam slayt SPR akış hücrelerine yerleştirilmiştir. SPR akış hücrelerine sırasıyla ilk 30 dakika 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltisi ve farklı derişimlerdeki (0.25-2.0 μM) GOR prob çözeltileri oda sıcaklığında akış hücrelerinden 10.2 $\mu\text{l/dakika}$ akış hızında geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. SPR'de farklı derişimlerde elde edilen delta-zaman eğrisindeki değişimi Şekil 4.73.'de gösterilmiştir.



Şekil 4.73. Küresel altın nanopartiküller yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim.

Şekil 4.73.'de görüldüğü üzere GOR oligonükleotit prob derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmıştır. 0.25 μM'lık GOR prob çözeltisi SPR akış hücrelerinden geçirilirken deltada 0.5°'lik bir değişim gözlenmiştir. 2 μM'daki GOR probunun bağlanma grafiğine bakıldığında delta değişiminin 2.5° civarında olduğu görülmektedir. Optimum GOR prob derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki değişim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.74).



Şekil 4.74. Küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri.

Şekil 4.74.'den prob derişim değerleri arttıkça delta değişim değerlerinde artığı gözlemlenerek en yüksek tayin limitinin 2µM, en düşük tayin limitin ise 0.05µM olarak belirtebiliriz. Sonuç olarak, 1 ve 2µM'lık GOR prob derişim değerlerinde yaklaşık aynı delta değişim değeri ölçüldüğünden optimum prob derişim değeri 1 µM olarak belirlenmiştir.

Oligonükleotitlerin Nanopartikül Yüzeyine Bağlanma Kinetiğinin İncelenmesi

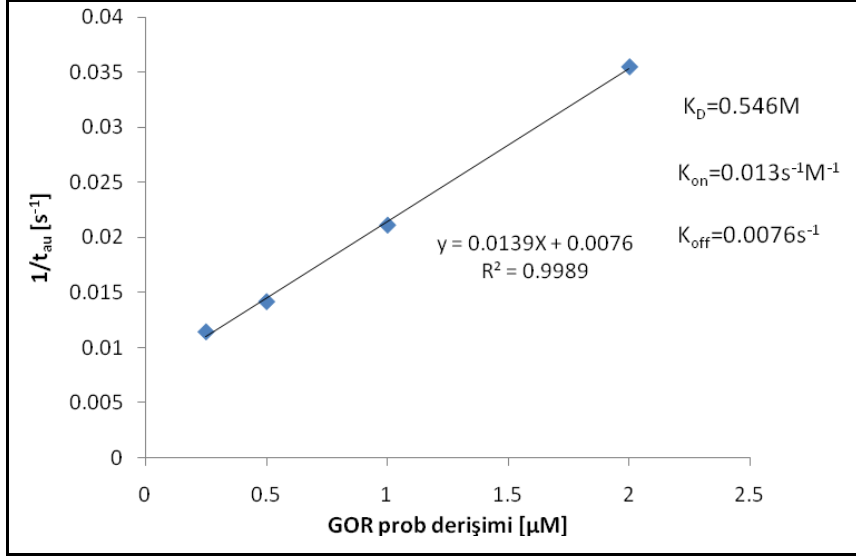
Reseptör ile ligand arasındaki affinite ya da bağlanma gücünü ifade eden bağlanma katsayısı (K_D , binding konstant) kinetik hesaplamalar sonucu hesaplanmaktadır. A reseptör B ligand olarak ifade edildiğinde A ile B arasındaki etkileşim; $A+B=AB$ şeklinde gösterilmektedir. A ile B arasındaki etkileşim sonucu oluşan AB ürünü oluşum hız sabiti K_{on} (association rate constant), AB ürününün A ve B'ye ayrılma hız sabiti K_{off} (dissociation rate constant) olarak ifade edilmektedir. Bağlanma katsayısı (K_D), K_{off}/K_{on} oranından hesaplanmaktadır. Literatürde bu şekilde birçok biyomolekülün bağlanma katsayısı hesaplanmıştır. Lin ve arkadaşları DNA'ya bağlanan Sandramycin, Actinomycin, Mithramycin, Ditercalinium gibi ilaçların hedef DNA'ya bağlanma katsayılarını SPR biyosensör teknolojisi ile belirlemişlerdir (Lin, 2005). Jecklin ve arkadaşları, protein-ligand bağlanma katsayısını etiket gerektirmeyen yüzey plasmon rezonans (SPR), nanoelektrospray iyonizasyon kütle spektrometri (nESI-MS) ve izotermal titrasyon kalorimetri (ITC) yöntemlerini

kullanılarak tayin etmişlerdir. Sülfamid inhibitörlerinin insan karbonik anhidraz I (hACI) ligantına bağlanma katsayısını kinetik çalışmalar sonucu hesaplamışlardır (Jecklin, 2009). Ayrıca tez kapsamında yaptığımız çalışmalarda kullandığımız SPR sensörü kullanılarak poliklonal anti-rabbit IgG ligantının altın film kaplı cam substrat yüzeyine immobilize edilmiş IgG reseptör molekülüne bağlanma sabiti tayin edilmiştir (Nanofilm Surface Analysis, Application Note, www.nanofilm.de).

Tez kapsamında SPR destekli elipsometre çalışmaları sonucu elde edilen veriler kullanılarak altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan oligonükleotitlerin bağlanma katsayısını belirlemek için kinetik çalışmalar da yapılmıştır. Küresel altın nanopartiküller reseptör GOR prob oligonükleotiti ligand olarak düşünüldüğünde GOR prob oligonükleotitin yüzeye bağlanma kinetiği incelenerek Şekil 4.75’de gösterilmiştir. Zamana karşı delta değişim değerleri kullanılarak 4.1 ve 4.2 eşitlikleri kullanılarak yüzeye bağlanma hız sabiti (K_{on} , association rate constant), yüzeyden ayrılma hız sabiti (K_{off} , dissociation rate constant) ve bağlanma katsayısı (K_D) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar tez kapsamı boyunca kullandığımız SPR cihazının software kitapçığında yer alan kinetik bağlanma çalışmasında verilmiş 4.1 ve 4.2. eşitlikleri kendi sistemimize uyarlanarak Origin 8.0 programı kullanılarak yapılmıştır. Örnek bir hesaplama ekler kısmında ayrıntılı olarak verilmiştir.

$$\Delta f(t) = \Delta f_{equ} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) + a \cdot t \quad \dots\dots\dots(4.1)$$

$$\frac{1}{\tau} = k_{on} c_{L,0} + k_{off} \quad \dots\dots\dots(4.2)$$



Şekil 4.75. GOR prob oligonükleotitinin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma kinetiği.

Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.75’de görüldüğü gibi GOR prob oligonükleotitin yüzeye bağlanma sabiti (K_D) 0.546 M olarak bulunmuştur. K_D değeri reseptör ile ligand arasındaki affinite ya da bağlanma gücünü belirleyen bir ifadedir. K_D değeri ne kadar küçük olursa bağlanmanın o kadar iyi olduğu bilinmektedir. Jecklin ve arkadaşları SPR çalışma verilerini kullanarak sulfuridin ve asetazolamidinin hCAI ligantına bağlanma katsayısını (K_D) sırasıyla 35.6 ve 0.0130 μM olarak hesaplamışlardır (Jecklin, 2009). Lin ve arkadaşları, DNA’ya bağlanan Sandramycin ve Acridine türevi gibi ilaçların hedef DNA’ya bağlanma sabitini (K_D) sırasıyla $9 \cdot 10^{-7}$ ve $5 \cdot 10^{-5}$ M olduğunu belirtmişlerdir (Lin, 2005) Literatürde yapılan bu çalışmalarda elde edilen bağlanma katsayıları ile bizim elde ettiğimiz bağlanma katsayısı kıyaslandığında GOR probunun altın nanopartikül yüzeyine bağlandığı fakat K_D değeri ne kadar küçük olursa bağlanmanın o kadar iyi olduğu bilgisiyle literatürdeki kadar iyi olmadığı şeklinde yorum yapılabilir.

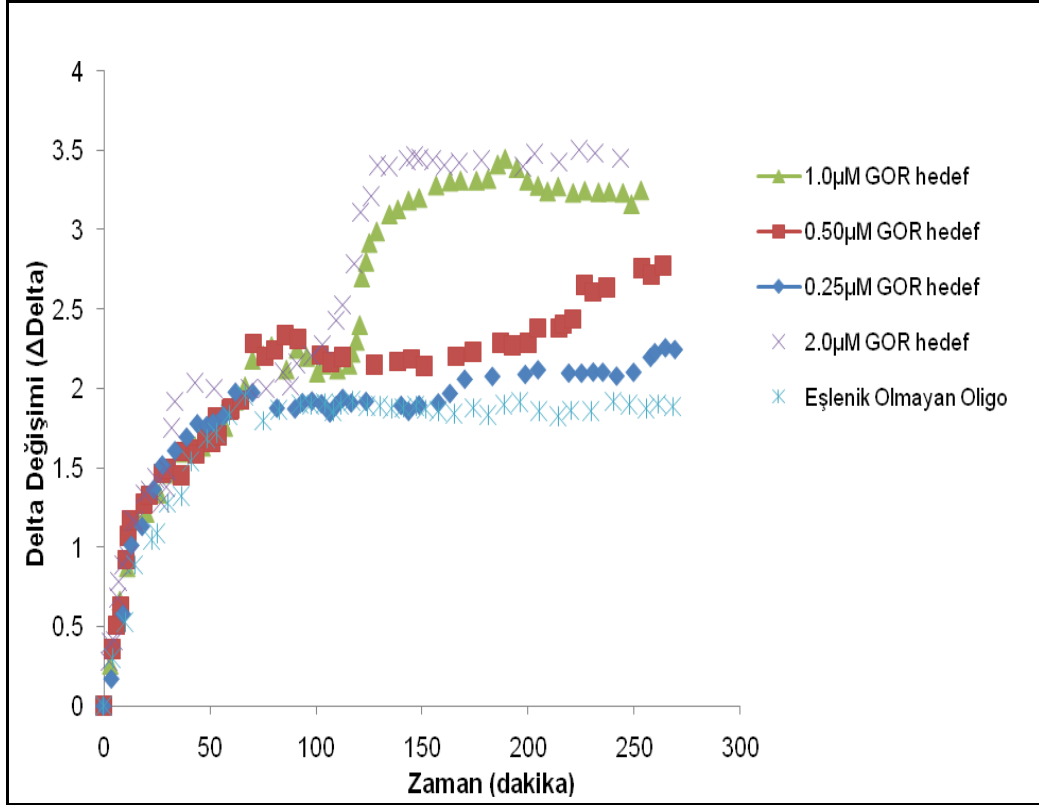
Küresel Altın Nanopartikül Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotit Dizisinin Hedef ile Hibridizasyonu

Hibridizasyon ölçümleri, GOR hedef oligonükleotid çözeltilerinin elipsometrik akış hücresine 25 °C de enjeksiyon edilmesiyle yapılmıştır. Elipsometrik delta ve psi

elipsometrik parametrelerini elde etmek için tek dalga boylu ışık kaynağı kullanılmıştır. Özellikle faz kayması; ışığın yansıdığı tabakaların optik özellikleriyle çok bağlantılıdır. İnce filmlerin (cam slayta birikmiş katmanlar) karmaşık refraksiyon indeksleri tek dalga boylu elipsometre ile ölçülen elipsometrik parametrelerle kolayca ilişkilendirilebilir. Dielektrik malzemelerde, bizim durumumuzda oligonükleotidlerde, homojen tabakalar için refraksiyon parametrelerinin tabaka kalınlığından etkilendiği varsayımı yapmak anlamlıdır. Bu varsayım, hibridize olmuş yüzeylerde kalınlık tayini göreceli elipsometrik parametre varyasyonu olarak rapor edilmiştir. Hibridizasyon süreci sırasında, yüzeyde hedef oligonükleotidler, prob oligonükleotidleri ile hibridize olduğunda elipsometrik açı (delta) gelen ışığın yansımaya dayandırılmıştır (Arwin, 2000). Bu değişim sayesinde, DNA hibridizasyonu elipsometreyle kolayca görüntülenebilmiştir.

Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.25-2.0 μM) GOR hedef dizisi olan oligonükleotit çözeltileri gönderilerek hibridizasyon sonucunda oluşan kalınlık derişim deręerleri ölçülmüştür. Bu işlem için sırası ile yüzeye altın nanopartikül takılmış cam slayt SPR akış hücresine yerleştirilerek 30 dakika 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tampon çözeltisi ve 1 μM 'lık GOR prob çözeltisi 10.2 μl /dakika akış hızında akış hücresinden geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. Tiyol modifiye tek sarmal oligonükleotit problemlerin altın yüzeye hem tiyol gruplarındaki sülfür atomundan kovalent olarak hem de bazı durumlarda nükleotitlerin yapılarında bulunan amin gruplarından özgün olmadan yüzeye yapışıp hedef dizileri ile eşleşmeyi sağlayan amin gruplarının kapalı olmasından dolayı hibridizasyon gerçekleşmemektedir. Bu nedenle prob oligonükleotitlerin hedef dizileri ile eşleşmelerinin en etkili şekilde olmasını sağlamak için bloklama ajanı olan 1 mM'lık 1-merkapt-6-hekzanol (MCH) çözeltisi 30 dakika geçirilerek özgün bağlanmayan oligonükleotit problemler sensör yüzeyinden uzaklaştırılmıştır. Sensör yüzeyine optimum derişimde prob ve bloklama ajanı immobilizasyonu sonrası yüzeydeki problemler hedef dizileri ile eşleşmeye hazır hale gelmiştir. Uygun eşleşmeyi sağlayacak tampon çözeltisi, pH ve sıcaklık parametreleri Mehmet Duman'ın doktora tezi temel alınarak, hibridizasyon tampon çözeltisi pH 7.4 fosfat tamponu (20 mM Na_2HPO_4 , 150mM NaCl, 0.1mM EDTA, %0.005 Tween 20) ve eşleşme sıcaklığı ise oda sıcaklığı (25 $^\circ\text{C}$) olarak belirlenmiştir. Daha sonra akış hücresinden 15 dakika hibridizasyon tampon çözeltisi geçirilmiştir. Çalışma

aralığındaki derişimde hazırlanmış GOR hedef oligonükleotit çözeltisi SPR akış hücresine 10.2 µl/dakika akış hızıyla enjekte edilmiştir. Reaksiyon, yaklaşık 270 dakika süresince izlenmiştir. Bağlanmaya ilişkin analitik sinyal Delta (Δ) değerindeki göreceli değişim olarak rapor edilmiştir. Farklı hedef GOR derişimine bağlı olan DNA hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim Şekil 4.76 'da gösterilmiştir. Ayrıca hedef olmayan oligonükleotit dizisi kullanılarak da kontrol deneyi yapılmıştır.

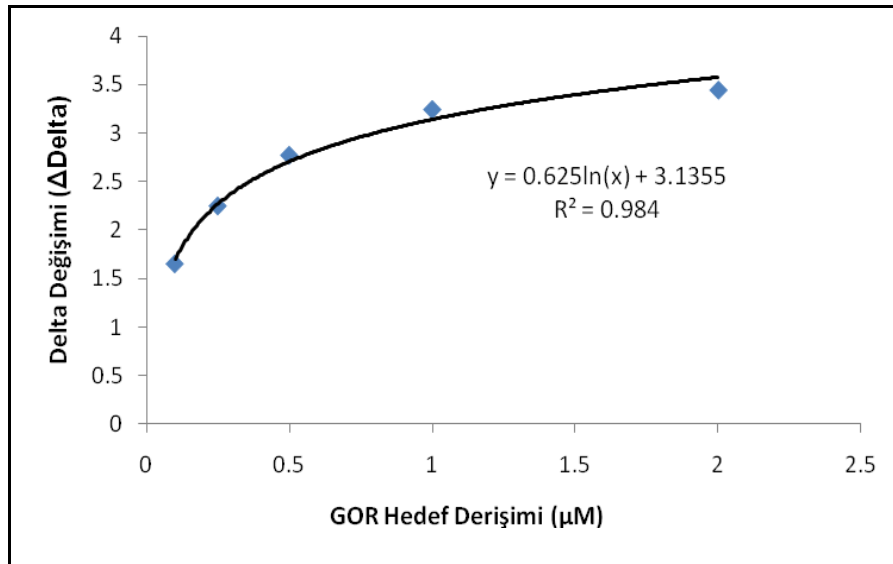


Şekil 4.76. Küresel altın nanopartiküller yüzeyine bağlı GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 1µM.

Şekil 4.76'da görüldüğü gibi SPR akış hücresine yerleştirilen küresel nanopartikül ile genişletilmiş dört cam slayta optimum prob derişiminde oligonükleotit gönderildiğinde hepsinde yaklaşık 100 dk gibi bir zaman aralığında aynı delta değişim değeri ölçülmüştür. Bundan sonra gönderilen hedef oligonükleotit derişimi arttıkça delta değişim değeri artmıştır. Verilen bütün hedef derişimleri için hibridizasyon basamağı, dereceli olarak doyuma yaklaşık 125 dakikada ulaşmıştır. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0.25'ten 2.0 µM'a artmasıyla belirgin olarak artmaktadır. 125 dakika

içindeki delta değişimleri sırasıyla 0.3°, 0.5°, 1.2° ve 1.5°'dir. Bu zaman aralığından sonra, deltadaki değişimler genelde sabittir (plato değerine ulaşır).

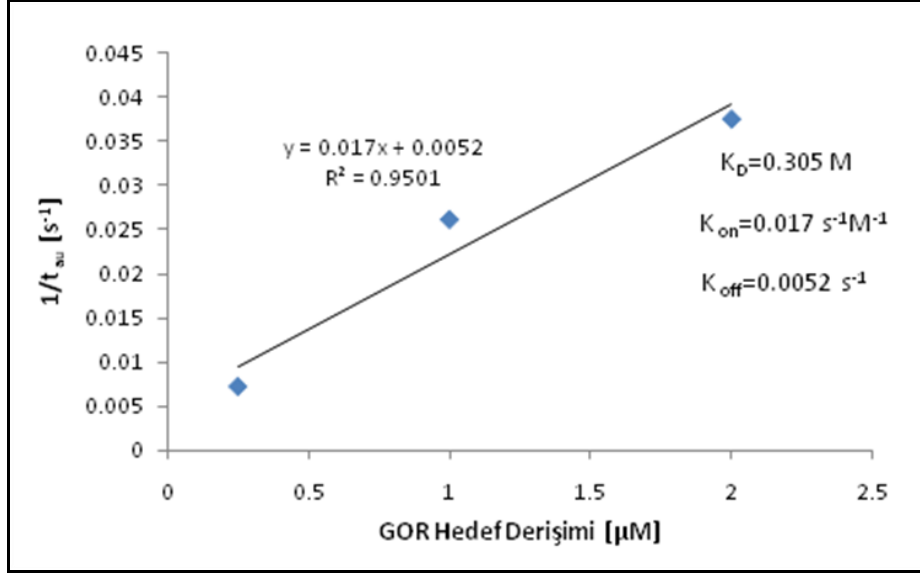
Ayrıca SPR destekli elipsometrik sensörünün seçiciliğini incelemek amacıyla optimum derişimde 1 µM'lık GOR prob immobilize edilmiş cam slayta 2 µM'lık GOR probun eşleniği olmayan bir oligonükleotit çözeltisi gönderilmiştir. Bu çalışmada da yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış olup eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi olarak 5'-C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC-3' sırası kullanılmıştır. Şekil 4.76' da görüldüğü gibi GOR probunun eşleniği olmayan oligonükleotitle hibridize olmadığı Şekil 4.6'da görülen delta değerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir. Optimum GOR hedef oligonükleotit derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki değişim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.77).



Şekil 4.77. Küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotiti ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta değişimleri.

Şekil 4.77'de görüldüğü gibi dengedeki sensör yanıtlarına göre, sensör kalibrasyon eğrisi hedef derişim aralığının (0-2.0 µM) üstünde çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 0.05 µM ile 2.0 µM arasında 0.984 doğrusal regrasyon katsayısıyla lineer sensör yanıt bölgesini vermiştir.

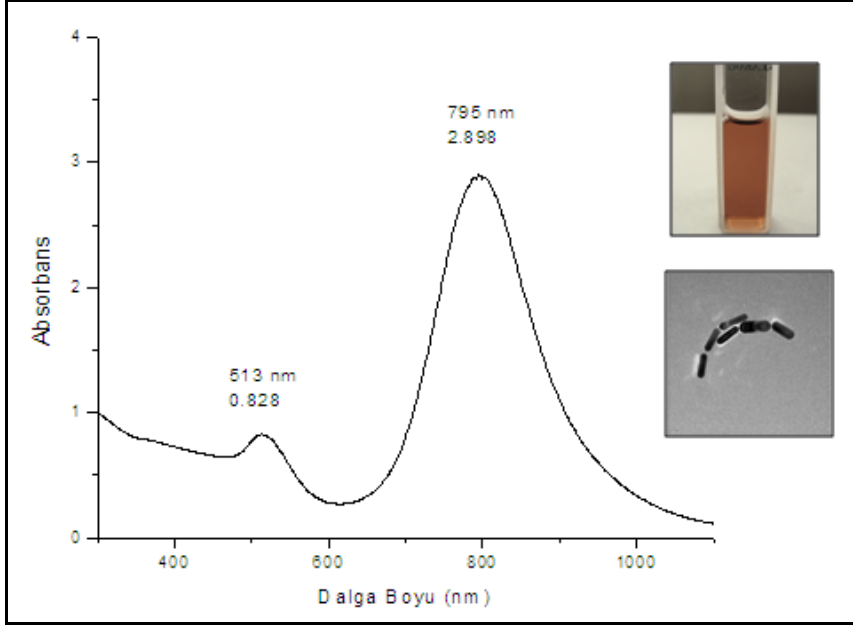
Hedef GOR oligonükleotidinin prob molekülü ile hibridizasyon kinetiği incelenerek Şekil 4.78'de gösterilmiştir. Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.78'de görüldüğü gibi GOR hedef oligonükleotidinin eşleniğine bağlanma sabiti (K_D) 0.305 M olarak bulunmuştur.



Şekil 4.78. GOR hedef oligonükleotidinin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma kinetiği.

4.2.2.2 Altın Nanoçubukların (A.R 3.5) SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı

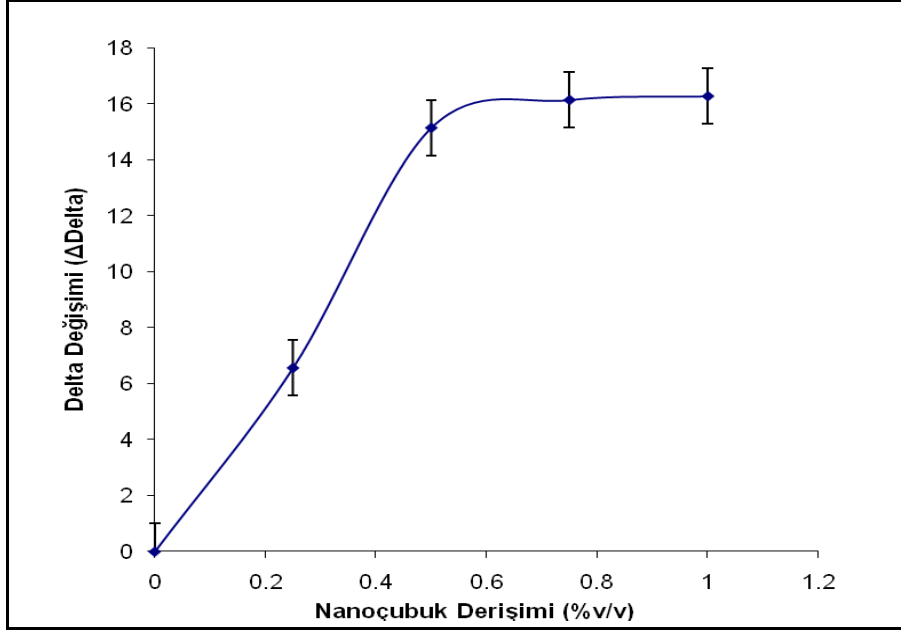
Bölüm 4.1.3'de sentezlenip karakterize edilen ortalama uzunluğu 54 nm, çapı 15 nm (uzunluk/çap oranı 3.5) olan nanoçubuklar, küresel altın nanopartiküller ile yapılmış olan *M. Gordonae* patojenik bakterisine özgü sensör geliştirilmesi çalışmasında olduğu gibi altın nanoçubuk esaslı SPR destekli elipsometre sensörü çalışmasında kullanılmıştır. Eksenel yönde 795 nm radyal yönde 513 nm dalga boylarında absorban veren nanoçubuğun özellikleri Şekil 4.79'da verilmiştir.



Şekil 4.79. SPR destekli elipsometre sensörü çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 3.5) özellikleri.

Cam Slayt Yüzeyine Altın Nanoçubukların İmmobilizasyonu

Özellikleri yukarıda verilen nanoçubukların cam slayt üzerinde tek tabaka oluşturacağı optimum nanoçubuk derişimini belirlemek için farklı derişimlerde (0.25-1.0 (% v/v)) nanoçubuk çözeltileri hazırlanmıştır. Cam slaytlar silanlanma işleminden geçirildikten sonra yüzeylerindeki tiyol uç gruplarından altın nanoçubukların tiyol grubuna olan afinitesinden faydalanarak farklı derişimlerdeki nanoçubuk çözeltileri cam yüzeyleri üzerinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı derişim değerlerine karşılık ölçülen delta değışim değerleri Şekil 4.80'de verilmiştir.



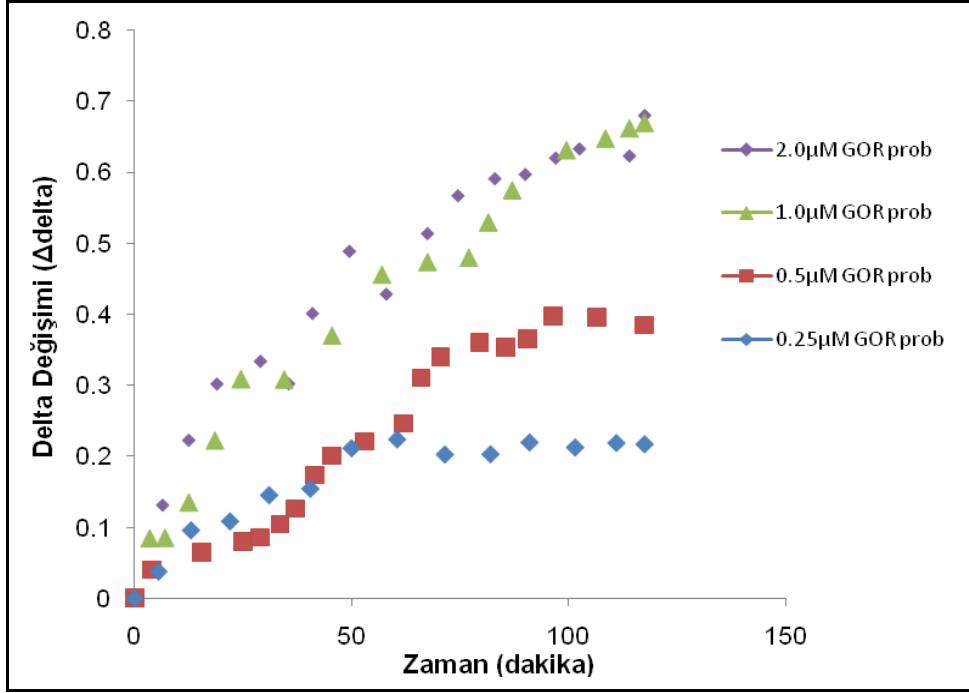
Şekil 4.80. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki altın nanoçubukların (A.R 3.5) kalınlık değişimi.

Şekil 4.80’de görüldüğü üzere nanoçubuk derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmış olup hacimce yüzde 0.6 olan derişimden sonraki nanoçubuk derişimlerinde delta değişim değerlerinde sabitleme görülmüştür. Hacimce yüzde 1.0 (%v/v) küresel altın nanopartikül içeren çözeltinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu gösterdiği delta değişim değeri 80°’lerde iken aynı derişimde nanoçubuğun cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu gösterdiği delta değişim değeri 16°’dir. Bu da küresel altın nanopartiküllerin cam slayt yüzeyinde birden fazla tabaka oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında optimum nanoçubuk derişimi hacimce 0.85 (%v/v) olarak belirlenmiştir.

Altın Nanoçubuk Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması ve Kinetik Bağlanmasının İncelenmesi

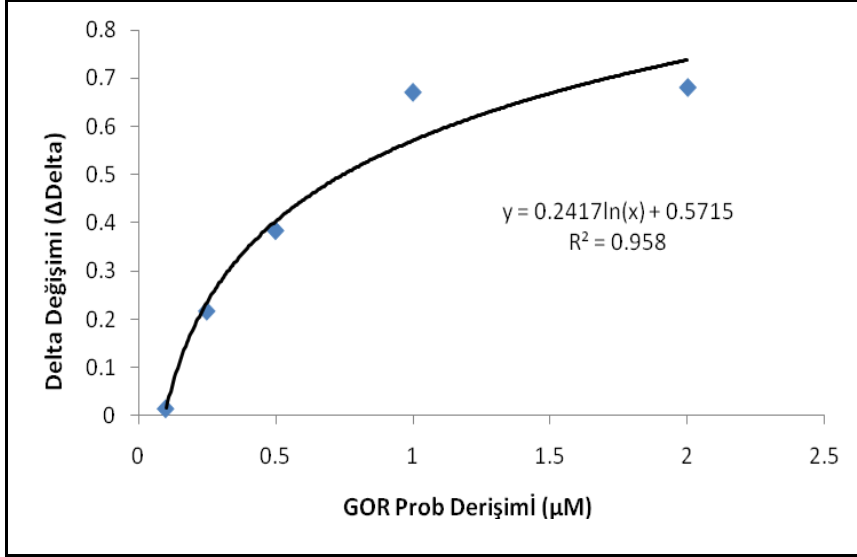
Optimum nanoçubuk derişimi hacimce 0.85 (%v/v) olarak belirlendikten sonra aynı derişimde altın nanoçubuk immobilize edilmiş dört cam slayt hazırlanmıştır. Daha sonra altın nanoçubuk immobilize edilmiş dört cam slayta *M. gordonae* patojenine özgü tiyol modifiye edilmiş farklı derişimlerde GOR prob oligonükleotiti gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum GOR prob derişimi belirlenmiştir. GOR prob derişim değerleri aralığı yine küresel altın nanopartiküller ile yapılan çalışmadaki

0.5-2.0 μM aralığı olarak seçilmiştir. Cam slayt yüzeyine uygun prob immobilizasyonu sağlayacak tampon çözeltisi olarak 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tamponu kullanılmıştır. Farklı derişimlerdeki (0.25-2.0 μM) GOR prob çözeltileri oda sıcaklığında SPR akış hücresinden geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. SPR'de farklı derişimlerde elde edilen delta değışimi değerleri Şekil 4.81'de gösterilmiştir.



Şekil 4.81. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değışimi.

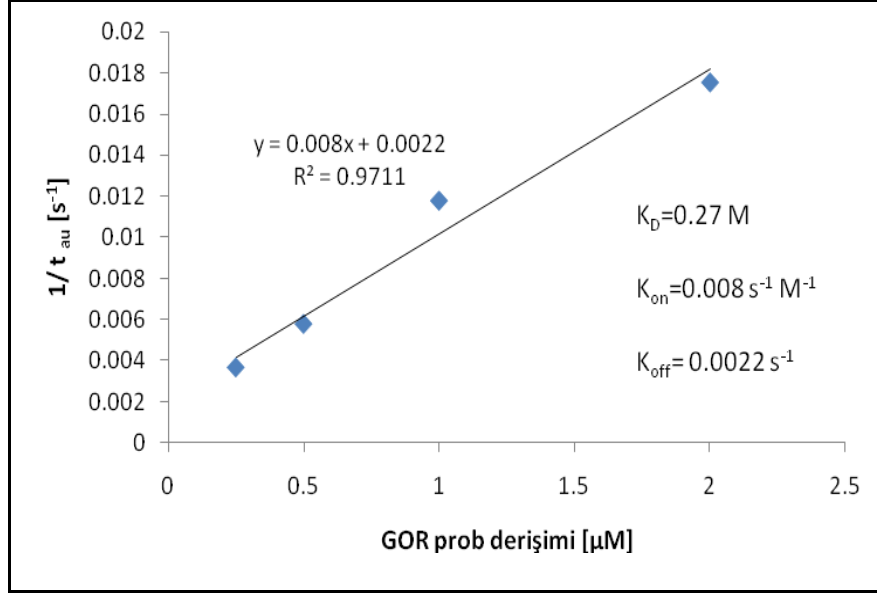
Şekil 4.81'de görüldüğü üzere GOR oligonükleotit prob derişiminin azalmasıyla delta değışimi de azalmıştır. 0.25 μM 'lık GOR prob çözeltilisi SPR akış hücresinden geçirilirken deltada 0.2°'lik gibi çok küçük bir değışim gözlenirken 2 μM 'lık GOR prob derişiminde 0.7°'lik bir değışim gözlenmiştir. Küresel altın nanopartikül yüzeyine farklı derişimde GOR probunun bağlanması sonucu ölçülen en yüksek delta değışim değeri 2.5° iken nanoçubuk ile yapılan aynı çalışmada elde edilen en yüksek delta değışim değeri 0.7° olmuştur. Optimum GOR prob derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki değışim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.82).



Şekil 4.82. Altın nanoçubuk (A.R 3.5) yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değerleri.

Şekil 4.82'den prob derişim değerleri arttıkça delta değerlerinde artışı gözlemlenerek en yüksek tayin limitinin 1 ve 2µM, en düşük tayin limitin ise 0.05µM olarak belirtebiliriz. Sonuç olarak, 1 ve 2µM'lık GOR prob derişim değerlerinde yaklaşık aynı delta değerleri ölçüldüğünden optimum prob derişim değeri 1 µM olarak belirlenmiştir.

Ayrıca GOR prob oligonükleotitinin altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma kinetiği incelenerek Şekil 4.83'de gösterilmiştir. Zamana karşı delta değerleri kullanılarak 4.1 ve 4.2 eşitlikleri kullanılarak yüzeye bağlanma hız sabiti (K_{on}), yüzeyden ayrılma hız sabiti (K_{off}) ve bağlanma sabiti (K_D) değerleri hesaplanmıştır.



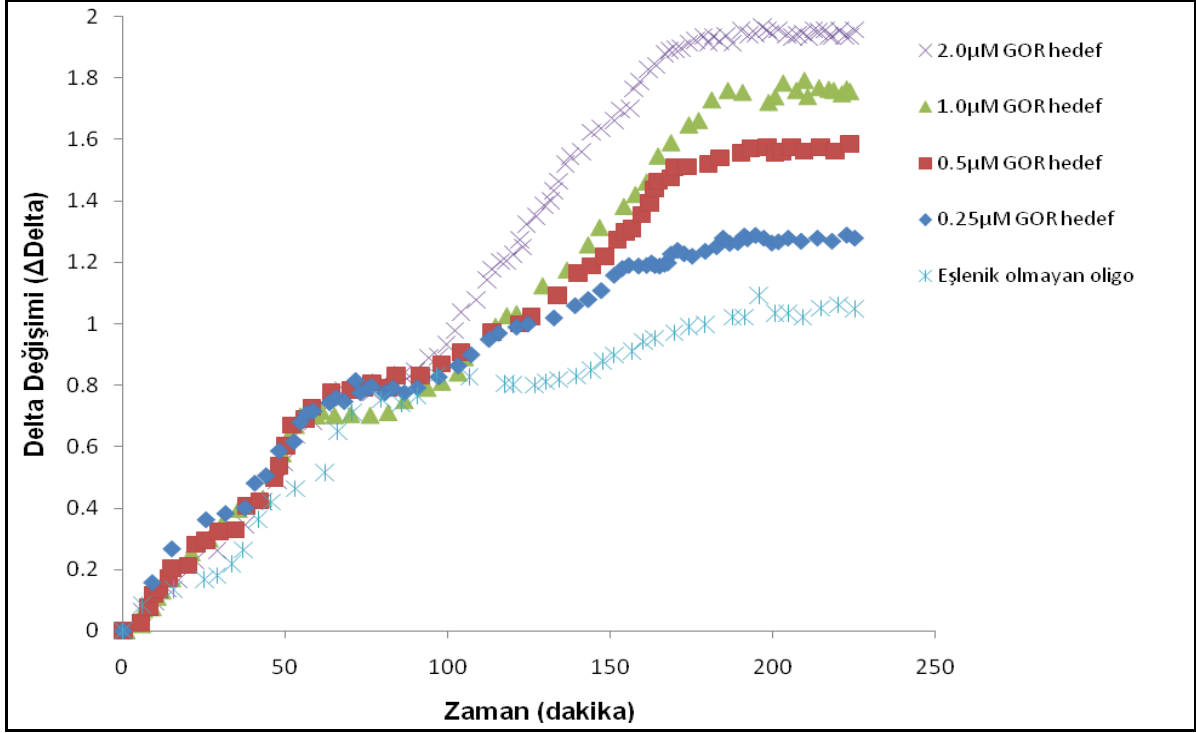
Şekil 4.83. GOR prob oligonükleotitinin altın nanoçubuk (AR 3.5) yüzeyine bağlanma kinetiği.

Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.83’de görüldüğü gibi GOR prob oligonükleotitinin altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabiti (K_D) 0.27 M olarak bulunmuştur. Aynı oligonükleotitin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma sabiti 0.546 M olup altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabitinin iki katıdır. K_D değeri reseptör ile ligand arasındaki affinite ya da bağlanma gücünü belirleyen bir ifadedir. K_D değeri küçüldükçe bağlanmanın gücünün artmasına dayanarak GOR prob oligonükleotitin küresel altın nanopartiküllere nazaran altın nanoçubuk yüzeyine daha iyi bağlandığı söylenebilir.

Altın Nanoçubuk Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotitin Hedef Dizi ile Eşleşmesi

Hibridizasyon çalışması, optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.25-2.0 µM) GOR hedef dizisi olan oligonükleotit çözeltilerinin SPR akış hücreğine gönderilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma da yapılan işlemler küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki GOR probunun hedef dizi ile hibridizasyonu kapsamında ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde aynen uygulanmıştır. Hibridizasyon sonucunda bağlanmaya bağlı analitik sinyal Delta (Δ) değerindeki göreceli değişim olarak rapor edilmiştir. Farklı hedef GOR derişimine bağlı olan DNA

hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim Şekil 4.84'de gsterilmiştir. Ayrıca hedef olmayan oligonkleotit dizisi kullanılarak da kontrol deneyi yapılmıştır.



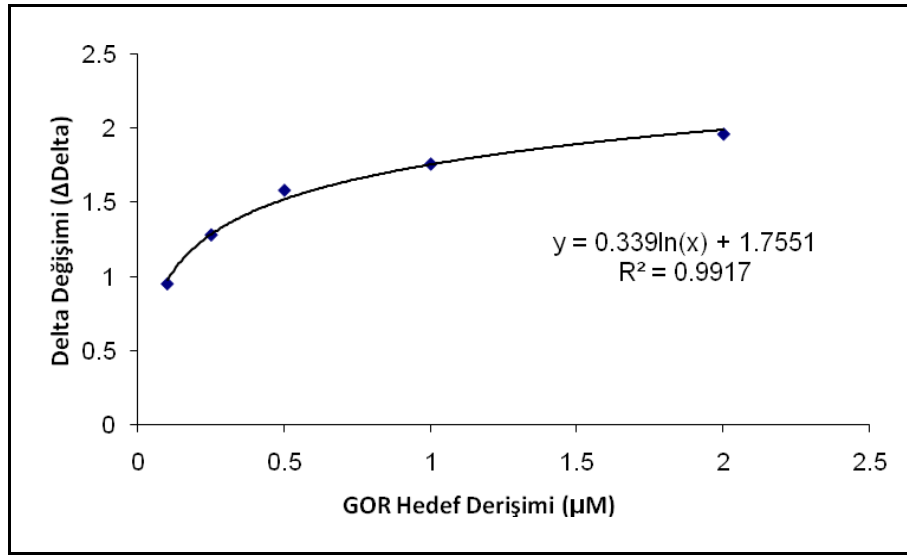
Şekil 4.84. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonkleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyonu sonucu delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonkleotid derişimi; 1 μM.

Şekil 4.84'de görüldüğü gibi SPR akış hüccresine yerleştirilen altın nanoçubuk ile genişletilmiş dört cam slayta optimum prob derişiminde oligonkleotit gönderildiğinde hepsinde yaklaşık 100 dk gibi bir zaman aralığında aynı delta değişim değeri ölçülmüştür. Bundan sonra gönderilen hedef oligonkleotit derişimi arttıkça delta değişim değeri artmıştır. Verilen bütün hedef derişimleri için hibridizasyon basamağı, dereceli olarak doyuma yaklaşık 90 dakikada ulaşmıştır. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0.25'ten 2.0 μM'a artmasıyla belirgin olarak artmaktadır. 90 dakika içindeki delta değişimleri sırasıyla 0.4°, 0.6°, 1.0° ve 1.2°'dir. Bu zaman aralığından sonra, deldadaki değişimler genelde sabittir (plato değeriine ulaşır).

Ayrıca SPR destekli elipsometrik sensörünün seçiciliğini incelemek amacıyla optimum derişimde 2 μM'lık GOR prob immobilize edilmiş cam slayta 2 μM'lık GOR

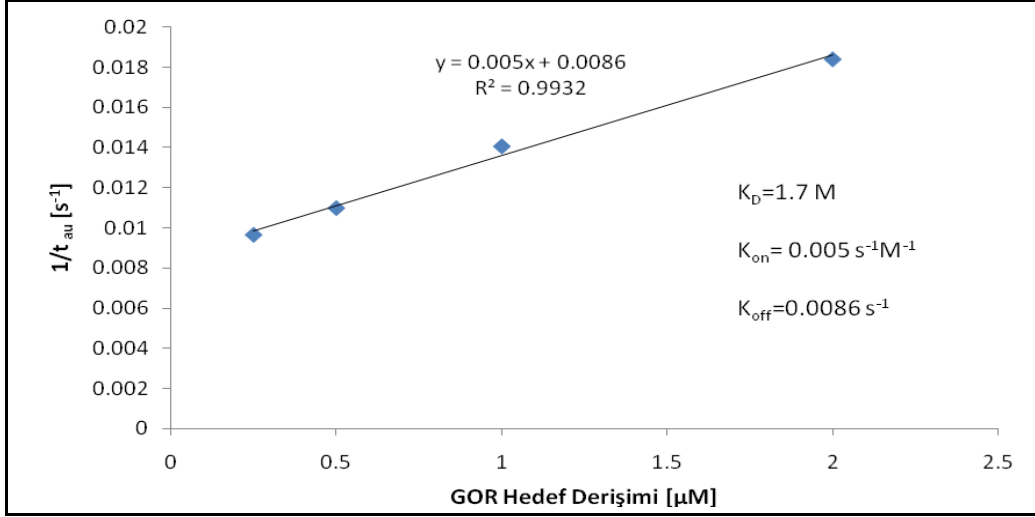
probun eşleniği olmayan bir oligonükleotit çözeltisi gönderilmiştir. Bu çalışmada da yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış olup eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi olarak 5'–C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC–3' sırası kullanılmıştır. Şekil 4.84' de görüldüğü gibi GOR probunun eşleniği olmayan oligonükleotitle hibridize olmadığı Şekil 4.84'de görülen delta değerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Optimum GOR hedef oligonükleotit derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki derişim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.85).



Şekil 4.85. Altın nanoçubukların (A.R 3.5) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotitleri ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta derişimleri.

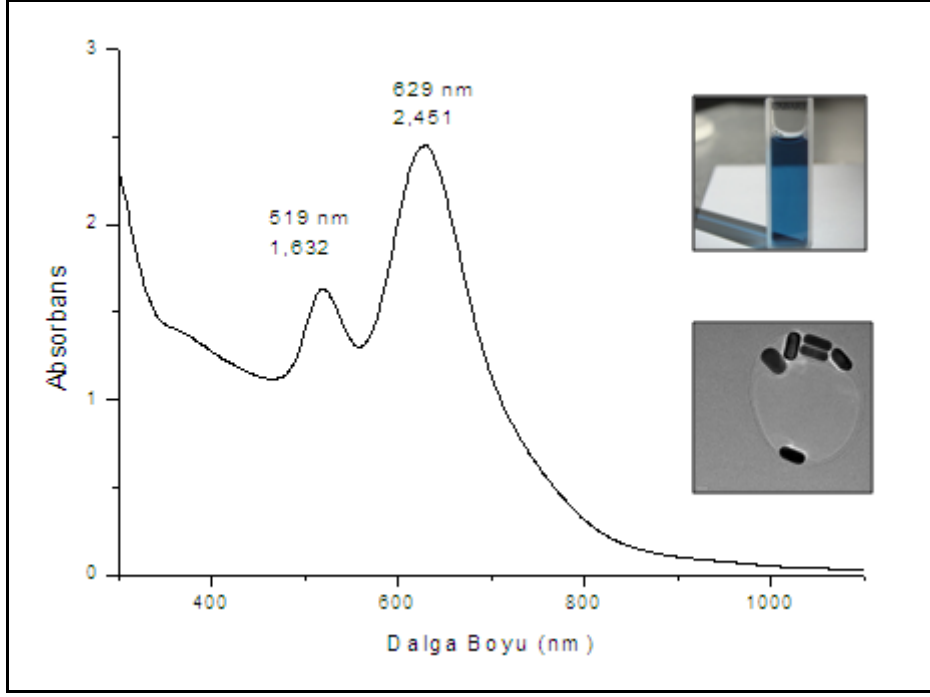
Hedef GOR oligonükleotitinin eşleniği ile hibridizasyon kinetiği incelenerek Şekil 4.86'da gösterilmiştir. Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.86'da görüldüğü gibi GOR hedef oligonükleotitinin eşleniğine bağlanma sabiti (K_D) 1.7 M olarak bulunmuştur. Küresel altın naopartikül yüzeyine immobilize edilmiş GOR probunun eşleniğine bağlanma sabiti 0.305 M olup, altın nanoçubuk yüzeyindeki GOR probunun eşlenik dizi ile hibridizasyonundan daha iyi olduğu söylenebilir.



Şekil 4.86. GOR hedef oligonükleotitinin altın nanoçubuk (AR 3.5) yüzeyine bağlanma kinetiği.

4.2.2.3 Altın Nanoçubukların (A.R 2.6) SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı

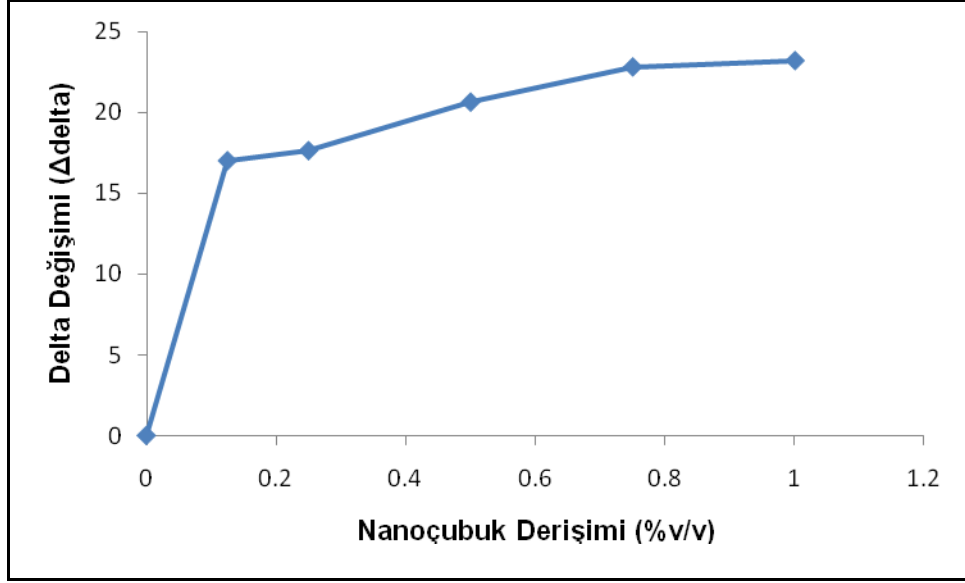
Tez kapsamında *M. Gordonae* patojenik bakterisine özgü sensör geliştirilmesi çalışmasında farklı uzunluk ve çap oranına sahip iki altın nanoçubuk kullanılmıştır. Altın nanoçubuklar farklı uzunluk/çap oranlarına bağlı olarak farklı optik özellik göstermeleri nedeniyle geliştirilen biyosensörlerde uzunluk/çap oranlarına bağlı olarak ne gibi farklılıklar oluşturduğunu incelemek amacıyla aynı çalışmalar ortalama uzunluğu 54 nm, çapı 21 nm (uzunluk/çap oranı 2.6) olan nanoçubuklar da kullanılarak yapılmıştır. Küresel altın nanopartiküller ile yapılmış olan çalışmaların aynısı bu nanoçubuklar ile tekrar yapılarak farklı uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuklarla elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Eksenel yönde 629 nm radyal yönde 519 nm dalga boylarında absorbands veren nanoçubuğun özellikleri Şekil 4.87'de verilmiştir.



Şekil 4.87. SPR destekli elipsometre sensörü çalışmasında kullanılan altın nanoçubuğun (A.R 2.6) özellikleri.

Cam Slayt Yüzeyine Altın Nanoçubukların İmmobilizasyonu

Özellikleri yukarıda verilen nanoçubukların cam slayt üzerinde tek tabaka oluşturacağı optimum nanoçubuk derişimini belirlemek için farklı derişimlerde (0.25-1.0 (% v/v)) nanoçubuk çözeltileri hazırlanmıştır. Cam slaytlar silanlanma işleminden geçirildikten sonra yüzeylerindeki tiyol uç gruplarından altın nanoçubukların tiyol grubuna olan afinitesinden faydalanarak farklı derişimlerdeki nanoçubuk çözeltileri cam yüzeyleri üzerinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı derişim değerlerine karşılık ölçülen delta değişim değerleri Şekil 4.88'de verilmiştir.



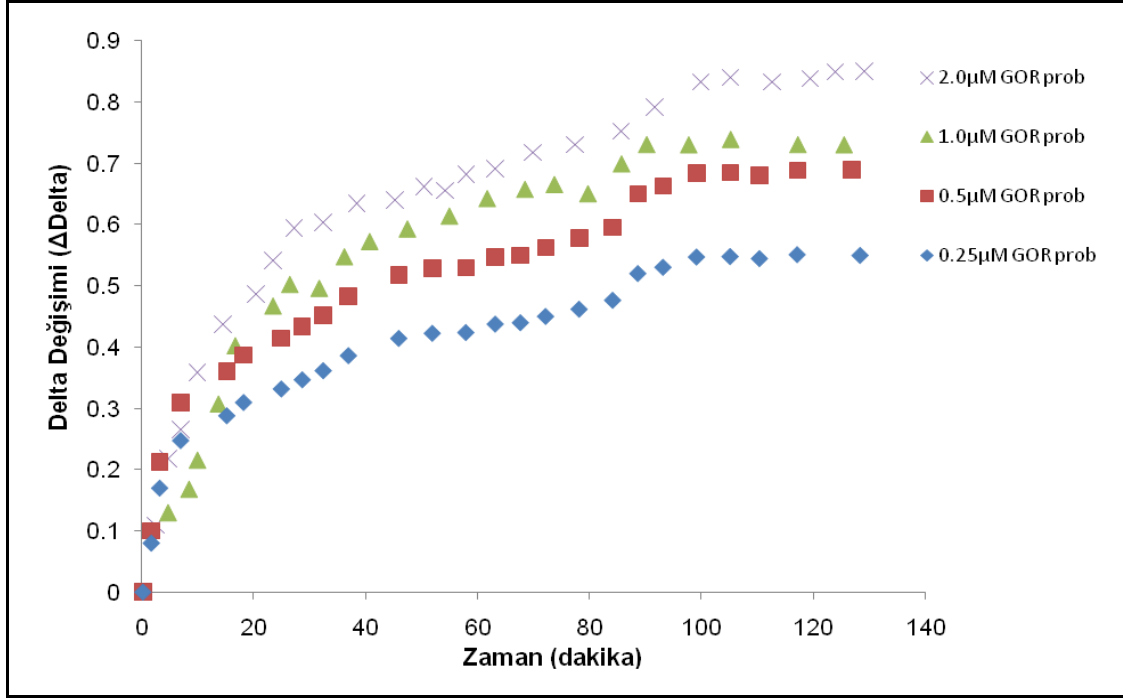
Şekil 4.88. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki altın nanoçubukların (A.R 2.6) kalınlık değişimi.

Şekil 4.88’de görüldüğü üzere nanoçubuk derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmış olup hacimce yüzde 0.80 olan derişimden sonraki nanoçubuk derişimlerinde delta değişim değerlerinde sabitlenme görülmüştür. Hacimce yüzde 1.0 (%v/v) küresel altın nanopartikül içeren çözeltinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu gösterdiği delta değişim değeri 80°, aynı derişimde uzunluk/çap oranı 3.5 olan nanoçubuğun delta değişim değeri 16° iken aynı derişimde uzunluk/çap oranı 2.6 olan nanoçubuğun delta değişim değeri 25°’dir. Küresel altın nanopartiküllerin cam slayt yüzeyinde altın nanoçubuklara göre 4 kat daha fazla bir delta değişim değeri göstermesi cam slayt yüzeyi üzerinde birden fazla tabaka oluşturduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçlar ışığında optimum nanoçubuk derişimi hacimce 0.85 (%v/v) olarak belirlenmiştir.

Altın Nanoçubuk Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması ve Kinetik Bağlanmasının İncelenmesi

Optimum nanoçubuk derişimi hacimce 0.85 (%v/v) olarak belirlendikten sonra aynı derişimde altın nanoçubuk immobilize edilmiş dört cam slayt hazırlanmıştır. Daha sonra altın nanoçubuk immobilize edilmiş dört cam slayta *M. gordonae* patojenine özgü tiyol modifiye edilmiş farklı derişimlerde GOR prob oligonükleotiti gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum GOR prob derişimi belirlenmiştir. GOR

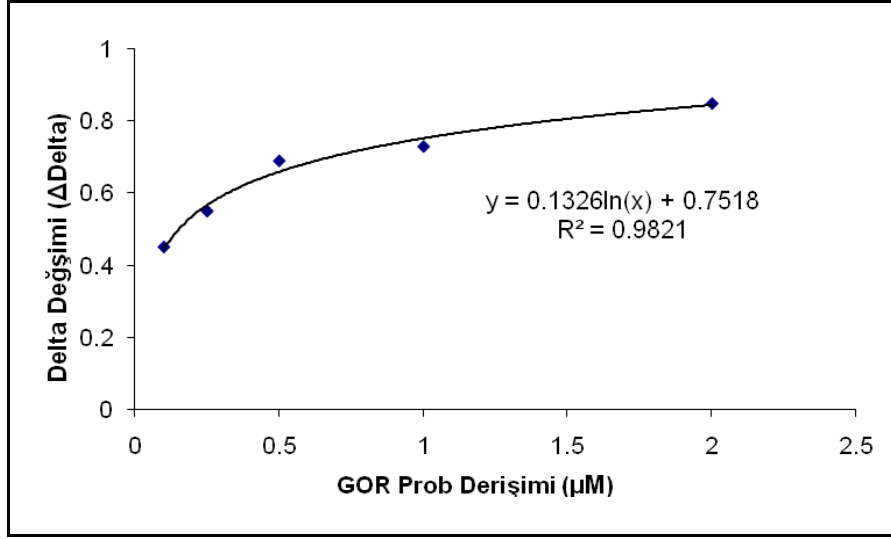
prob derişim değerleri aralığı yine 0.25-2.0 μM aralığı olarak seğilmiştir. Cam slayt yzeyine uygun prob immobilizasyonu sağlayacak tampon zeltisi olarak 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tamponu kullanılmıştır. Farklı derişimlerdeki (0.25-2.0 μM) GOR prob zeltileri oda sıcaklığında SPR akış hücresinden geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölümler alınmıştır. SPR'de farklı derişimlerde elde edilen delta değişimi değerleri şekil 4.89'da gösterilmiştir.



şekil 4.89. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişimi.

şekil 4.89'da görüldüğü yzere GOR oligonükleotit prob derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmıştır. 0.25 μM 'lık GOR prob derişiminde 0.5° , 2 μM 'lık GOR prob derişiminde 0.85° delta değişimi gözlenmiştir. Küresel altın nanopartikül yzeyine farklı derişimde GOR probunun bağlanması sonucu llen en yüksek delta değişim değeri 2.5° iken uzunluk/çap oranı 3.5 olan nanoçubuk ile yapılan aynı çalışmada elde edilen en yüksek delta değişim değeri 0.7° , uzunluk/çap oranı 2.6 olan nanoçubuk için 0.85° olmuştur. Uzunluk/ap oranı 3.5 olan altın nanoubukla uzunluk/çap oranı 2.6 olan nanoçubuk 54 nm aynı uzunluğa sahip olmasına rağmen çapları sırasıyla 15 ve 21 nm olmak yzere farklıdır. Dolayısıyla uzunluk/çap oranı 2.6 olan nanoçubuğun 7 nm daha kalın olması nedeniyle yzeyine immobilize edilmiş

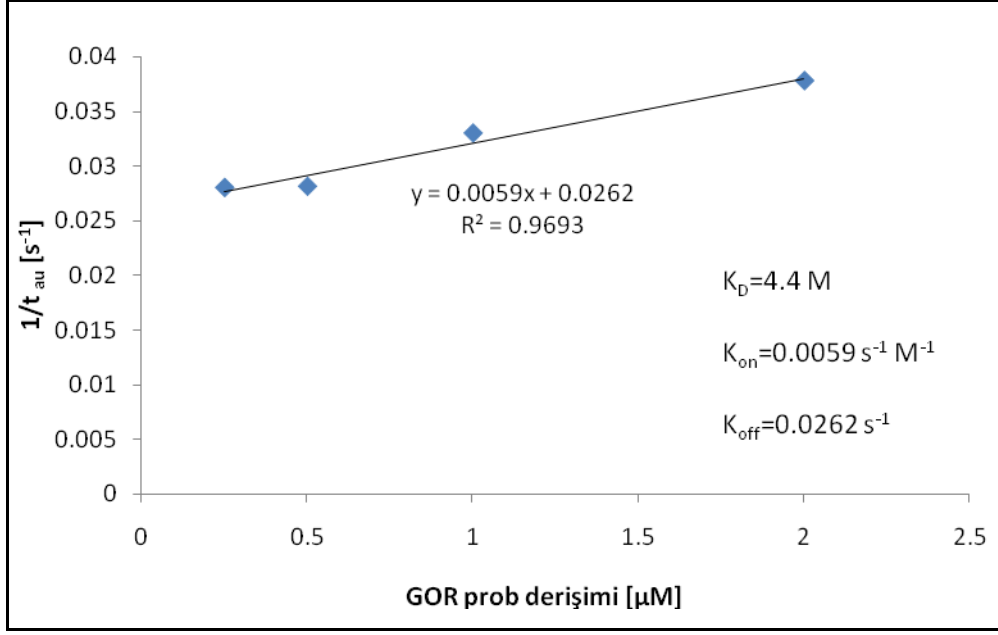
GOR probu sonucu oluşturduğu delta değişim değerinin de diğerine göre biraz daha fazla olduğu görülmüştür. Ayrıca bu veri sonucunda altın nanoçubukların cam slayt yüzeyine yatay olarak immobilize olduğu söylenebilir. Optimum GOR prob derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki değişim değerlerine karşılık derişim grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.90)



Şekil 4.90. Altın nanoçubuk (A.R 2.6) yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değerimleri.

Şekil 4.90'da görüldüğü gibi dengedeki sensör yanıtlarına göre, sensör kalibrasyon eğrisi prob derişim aralığının (0-2.0 µM) üstünde çizilmiştir. Kalibrasyon eğrisi 0.05 µM ile 2.0 µM arasında 0.9821 doğrusal regrasyon katsayısıyla lineer sensör yanıt bölgesini vermiştir. Optimum prob derişim değeri 2 µM olarak belirlenmiştir.

Ayrıca GOR prob oligonükleotitinin yüzeye bağlanma kinetiğı incelenerek Şekil 4.91'de gösterilmiştir. Zamana karşı delta değışim değerleri kullanılarak 4.1 ve 4.2 eşitlikleri kullanılarak yüzeye bağlanma (K_{on} , association hızı), yüzeyden ayrılma (K_{off} , dissociation hızı) ve dengede K_D değeri hesaplanmıştır.



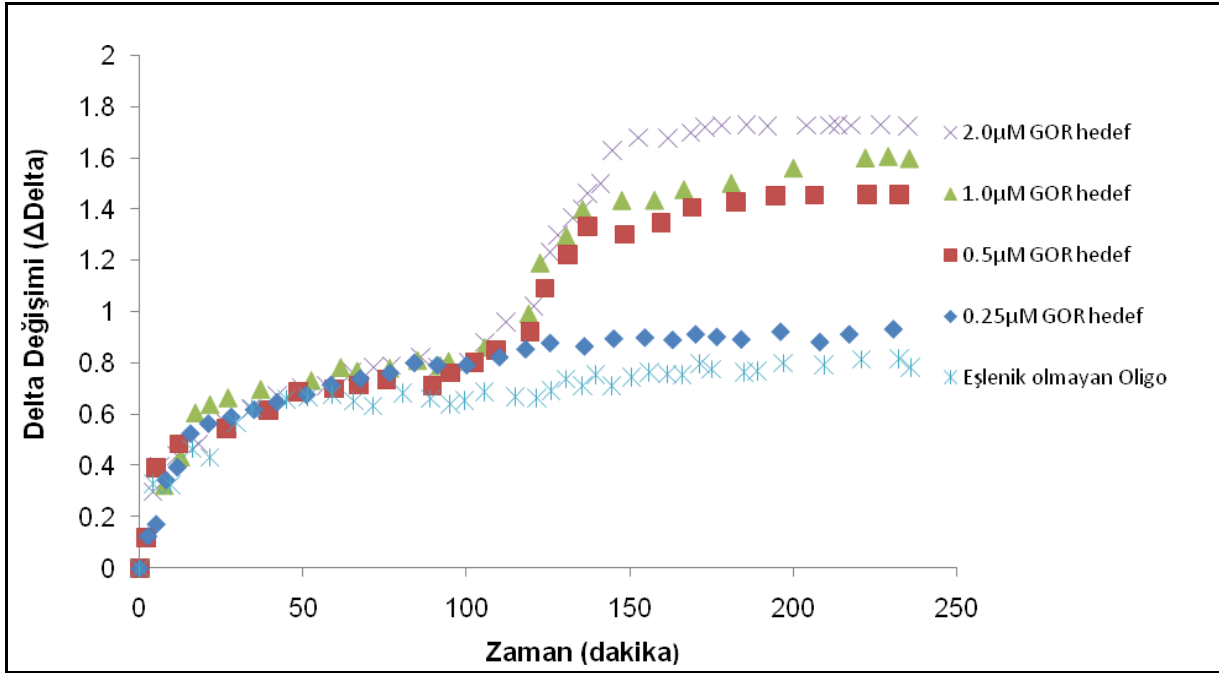
Şekil 4.91. GOR prob oligonükleotitinin altın nanoçubuk (AR 2.6) yüzeyine bağlanma kinetiği.

Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.91’de görüldüğü gibi GOR prob oligonükleotitin uzunluğu 54nm ve çapı 21 nm olan altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabiti (K_D) 4.4 M olarak bulunmuştur. Aynı oligonükleotitin uzunluğu 54 nm çapı 15 nm olan altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabiti 0.27 M olup, aynı uzunlukta ve 7 nm daha kalın olan altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabiti 16 kat daha düşük olduğu görülmüştür. Buna göre GOR prob oligonükleotitin daha küçük çapa sahip altın nanoçubuk yüzeyine daha iyi bağlandığı söylenebilir.

Altın Nanoçubuk Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotitin Hedef Dizi ile Eşleşmesi

Hibridizasyon çalışması, optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.25-2.0 μM) GOR hedef dizisi olan oligonükleotit çözeltilerinin SPR akış hücresine gönderilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma da yapılan işlemler küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki GOR probunun hedef dizi ile hibridizasyonu kapsamında ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde aynen uygulanmıştır. Hibridizasyon sonucunda bağlanmaya bağlı analitik sinyal Delta (Δ) değerindeki göreceli değişim olarak rapor edilmiştir. Farklı hedef GOR derişimine bağlı olan DNA

hibridizasyona bağıl delta-zaman eğrisindeki değişim Şekil 4.92 'de gösterilmiştir. Ayrıca hedef olmayan oligonükleotit dizisi kullanılarak da kontrol deneyi yapılmıştır.



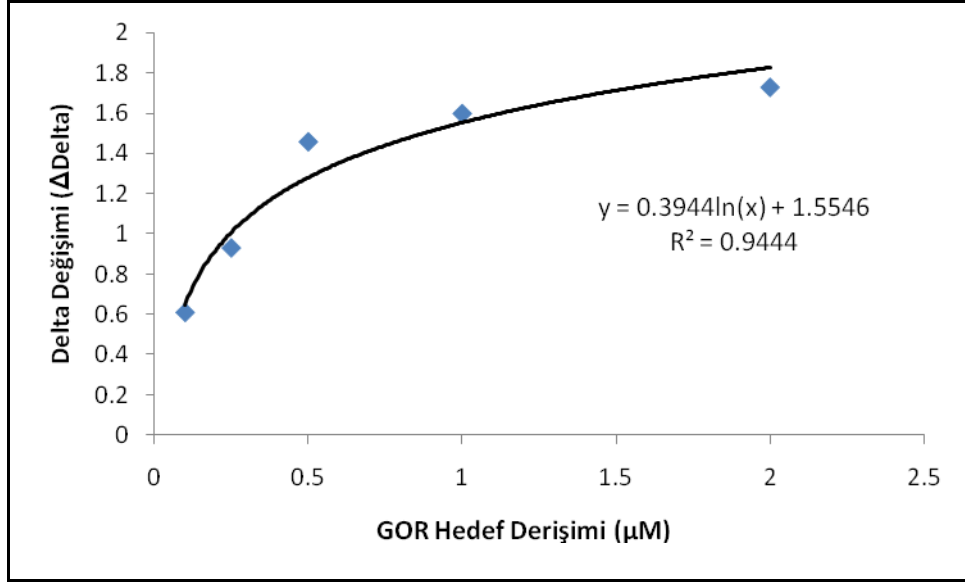
Şekil 4.92. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyonu sonucu delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 2µM.

Şekil 4.92'de görüldüğü gibi SPR akış hücresine yerleştirilen altın nanoçubuk ile genişletilmiş dört cam slayta optimum prob derişiminde oligonükleotit gönderildiğinde hepsinde yaklaşık 100 dk gibi bir zaman aralığında aynı delta değişim değeri ölçülmüştür. Bundan sonra gönderilen hedef oligonükleotit derişimi arttıkça delta değişim değeri artmıştır. Verilen bütün hedef derişimleri için hibridizasyon basamağı, dereceli olarak doyuma yaklaşık 90 dakikada ulaşmıştır. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0.25'ten 2.0 µM'a artmasıyla belirgin olarak artmaktadır. 90 dakika içindeki delta değişimleri sırasıyla 0.2°, 0.8°, 0.9° ve 1.2°'dir. Bu zaman aralığından sonra, deltadaki değişimler genelde sabittir (plato değerine ulaşır).

Ayrıca SPR destekli elipsometrik sensörünün seçiciliğini incelemek amacıyla optimum derişimde 2 µM'lık GOR prob immobilize edilmiş cam slayta 2 µM'lık GOR probun eşleniği olmayan bir oligonükleotit çözeltisi gönderilmiştir. Bu çalışmada da yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış olup eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi

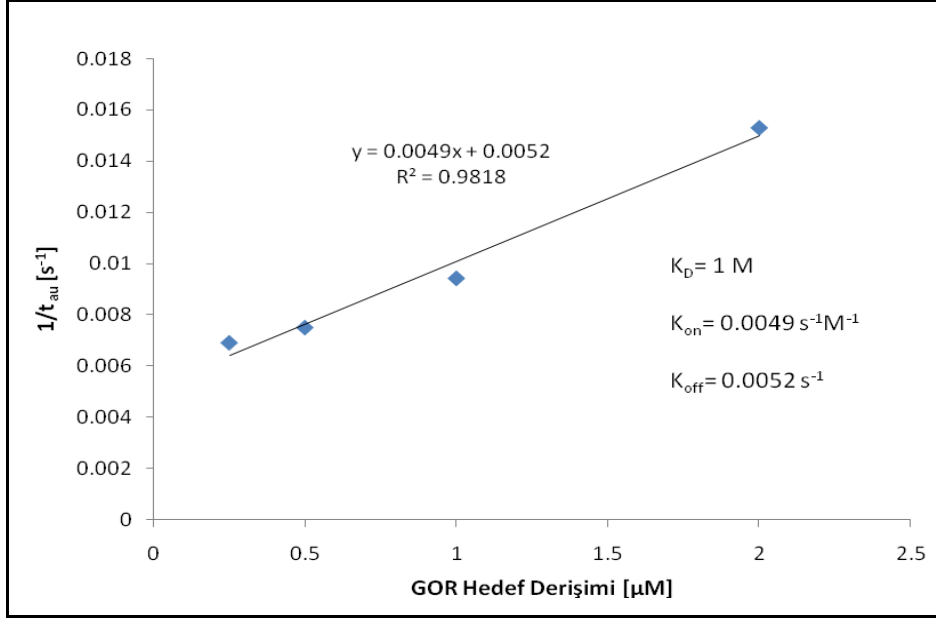
olarak 5'–C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC–3' sırası kullanılmıştır. Şekil 4.92' de görüldüğü gibi GOR probunun eşleniği olmayan oligonükleotitle hibridize olmadığı Şekil 4.22'de görülen delta değerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

Optimum GOR hedef oligonükleotit derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki derişim değerlerine karşılık derişim grafiğı çizilmiştir (Şekil 4.93).



Şekil 4.93. Altın nanoçubukların (A.R 2.6) yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotitleri ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta derişimleri.

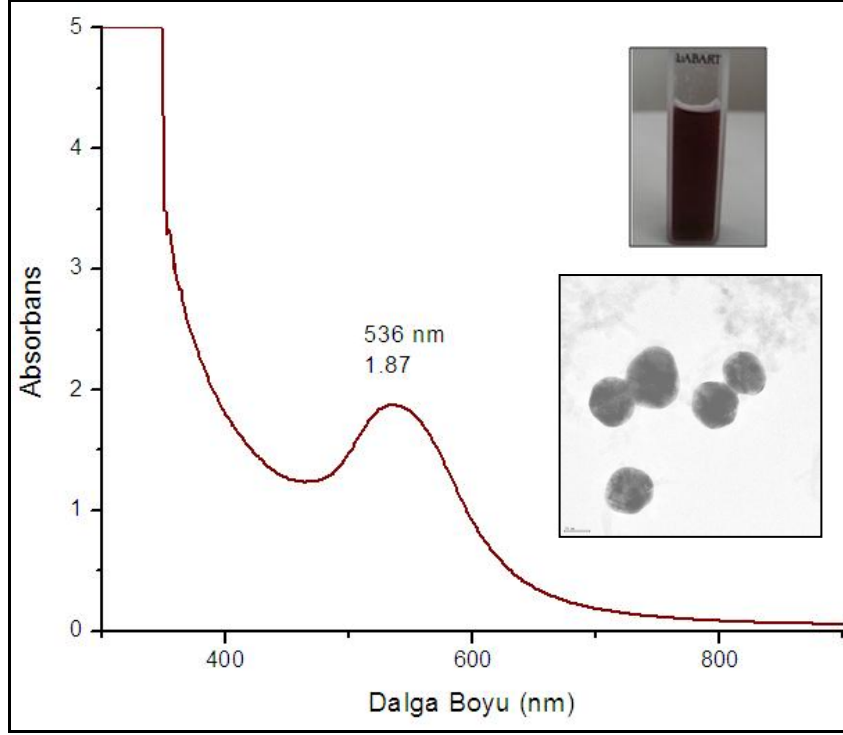
Hedef GOR oligonükleotitinin eşleniğı ile hibridizasyon kinetiğı incelenerek Şekil 4.94'de gösterilmiştir. Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.24'da görüldüğü gibi GOR hedef oligonükleotitinin eşleniğine bağlanma sabiti (K_D) 1.0 M olarak bulunmuştur. Küresel altın nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş GOR probunun eşleniğine bağlanma sabiti 0.305 M olup, altın nanoçubuk yüzeyindeki GOR probunun eşlenik dizi ile hibridizasyonundan daha iyi olduğı söylenebilir.



Şekil 4.94. GOR hedef oligonükleotidinin altın nanoçubuk (AR 2.6) yüzeyine bağlanma kinetiği.

4.2.2.4. Altın Kaplı Manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) Nanopartiküllerin SPR Destekli Elipsometre Sensöründe Kullanımı

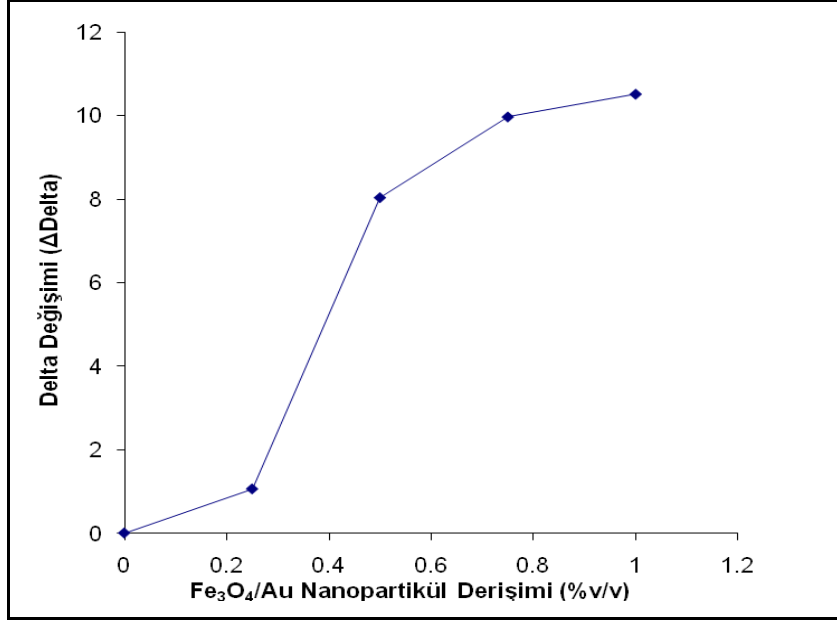
Tez kapsamında *M. Gordanea* patojenine özgü biyosensör geliştirilmesi amacıyla küresel altın nanopartikül, farklı uzunluk/çap oranına sahip nanoçubuklar ile yapılan SPR destekli elipsometre çalışması ortalama 87 nm partikül çapına sahip, 536 nm dalga boyunda maksimum absorbanı veren altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküller ile de yapılmıştır. Kullanılan nanopartikülün özellikleri Şekil 4.95’de verilmiştir.



Şekil 4.95. SPR destekli elipsometre sensöründe kullanılan altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin özellikleri.

Cam Slayt Yüzeyine Manyetit İçeren Altın Kaplı ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) Nanopartiküllerin İmmobilizasyonu

Manyetik özellik gösteren altın kaplı nanopartiküllerin cam slayt üzerinde tek tabaka oluşturacağı optimum nanopartikül derişimini belirlemek için farklı derişimlerde (0.25-1.0 %(v/v)) nanopartikül çözeltileri hazırlanmıştır. Önce cam slaytlar %1'lik 3-merkaptopropiltrimetoksisilan (MPTS) çözeltisi ile modifiye edilerek yüzeyinde tiyol grubu oluşacak şekilde silanlama işleminden geçirilmiştir. Sonra yüzeylerindeki tiyol uç gruplarından altın nanopartiküllerin tiyol grubuna olan afinitesinden faydalanarak farklı derişimlerdeki nanopartikül çözeltileri cam yüzeyleri üzerinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilerek immobilizasyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Farklı derişim değerlerine karşılık ölçülen delta değışim değerleri Şekil 4.96'da verilmiştir.



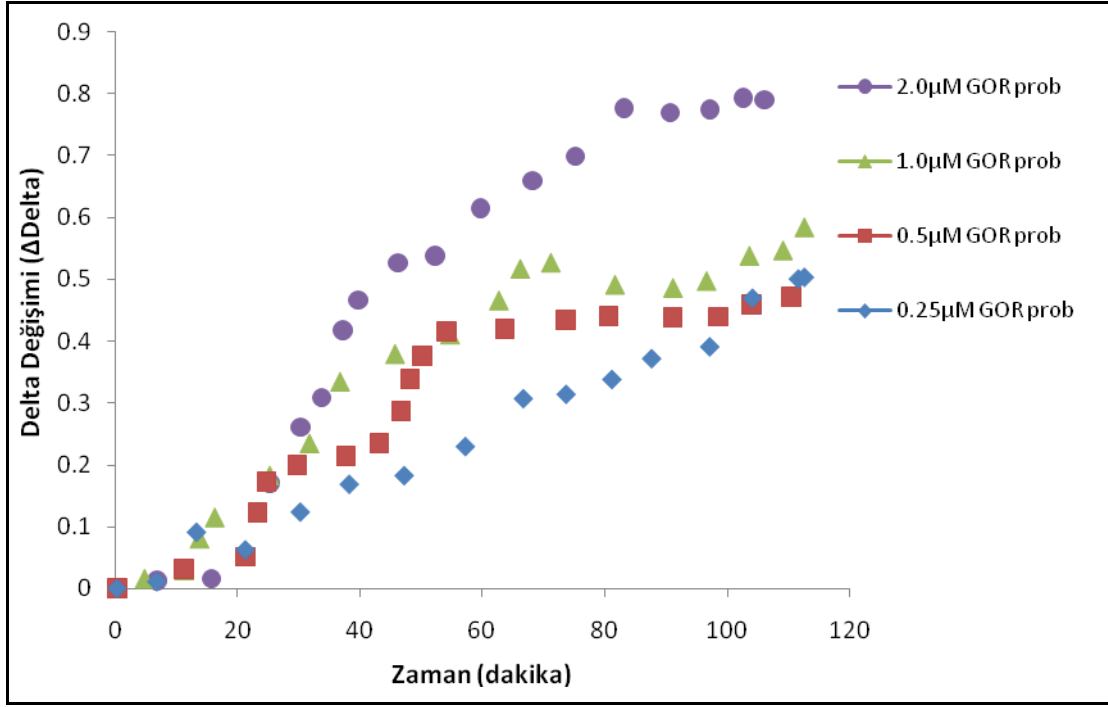
Şekil 4.96. Cam slaytlara immobilize edilmiş farklı derişimdeki manyetik altın kaplı (Fe₃O₄/Au) nanopartiküllerin kalınlık değişimi.

Şekil 4.96'da görüldüğü üzere nanopartikül derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmıştır. Hacimce yüzde 0.25 nanopartikül içeren çözeltilinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu deltada 1°'lik bir değişim gözlenmiştir. Hacimce yüzde 1.0 nanopartikül içeren çözeltilinin cam slayt yüzeyine immobilizasyonu sonucu delta değişim değeri 11°'lerde ölçülmüştür. Bu şekilde ölçülen yüksek delta değişim değerleri cam slayt yüzeyinde nanopartiküllerin tek tabaka değil de çoklu tabaka oluşturduğunu göstermiştir. Bu nedenle cam yüzeyini tek tabakalı kaplıyacak optimum nanopartikül derişimi 1.0 (%v/v) olarak belirlenmiştir.

Manyetit İçeren Altın Kaplı (Fe₃O₄/Au) Nanopartikül Yüzeyine GOR Prob Oligonükleotitin Bağlanması ve Bağlanmanın Kinetik İncelenmesi

Optimum nanopartikül derişimi hacimce 1.0 (%v/v) olarak belirlendikten sonra aynı derişimde altın kaplı manyetik nanopartikül immobilize edilmiş dört cam slayt hazırlanmıştır. Daha sonra nanopartikül immobilize edilmiş dört cam slayta *M. gordonae* patojenine özgül tiyol modifiye edilmiş farklı derişimlerde GOR prob oligonükleotiti gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum GOR prob derişimi belirlenmiştir. GOR prob derişim değerleri aralığı yine 0.25-2.0 µM aralığı olarak seçilmiştir. Cam slayt yüzeyine uygun prob immobilizasyonu sağlayacak

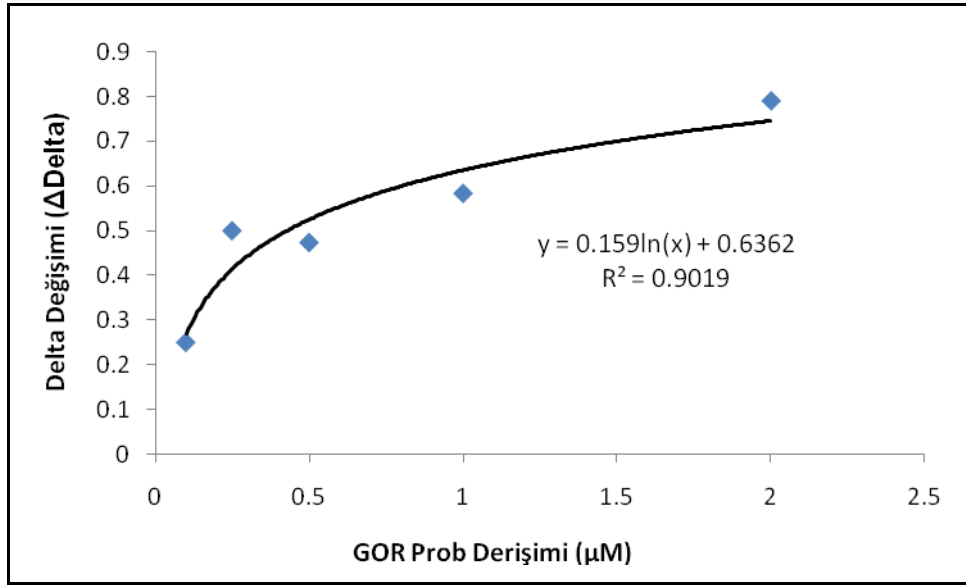
tampon çözeltisi olarak 1M'lık pH 3.8 fosfat (KH_2PO_4) tamponu kullanılmıştır. Farklı derişimlerdeki (0.25-2.0 μM) GOR prob çözeltileri oda sıcaklığında SPR akış hücresinden geçirilerek dengeye gelinceye kadar ölçümler alınmıştır. SPR'de farklı derişimlerde elde edilen delta değişimi değerleri Şekil 4.97'de gösterilmiştir.



Şekil 4.97. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim.

Şekil 4.97'de görüldüğü üzere GOR oligonükleotit prob derişiminin artmasıyla delta değişimi de artmıştır. 0.25 μM 'lık GOR prob derişiminde 0.5° , 2 μM 'lık GOR prob derişiminde 0.85° delta değişimi gözlenmiştir. GOR prob oligonükleotitinin küresel altın nanopartikül ve farklı uzunluk/çap oranına sahip altın nanoçubuk yüzeylerine bağlanması sonucu ölçülen en yüksek delta değişim değerleri sırasıyla 2.5° , 0.7° ve 0.85° olmuştur. Altın kaplı manyetik nanopartikül çalışmasında elde edilen en yüksek delta değişim değeri de altın nanoçubuklarla yapılan çalışmadakilerle yaklaşık aynı değer elde edilmiştir. Görüldüğü gibi en yüksek delta değişim değeri küresel altın nanopartiküllerle yapılan çalışmada elde edilmiştir.

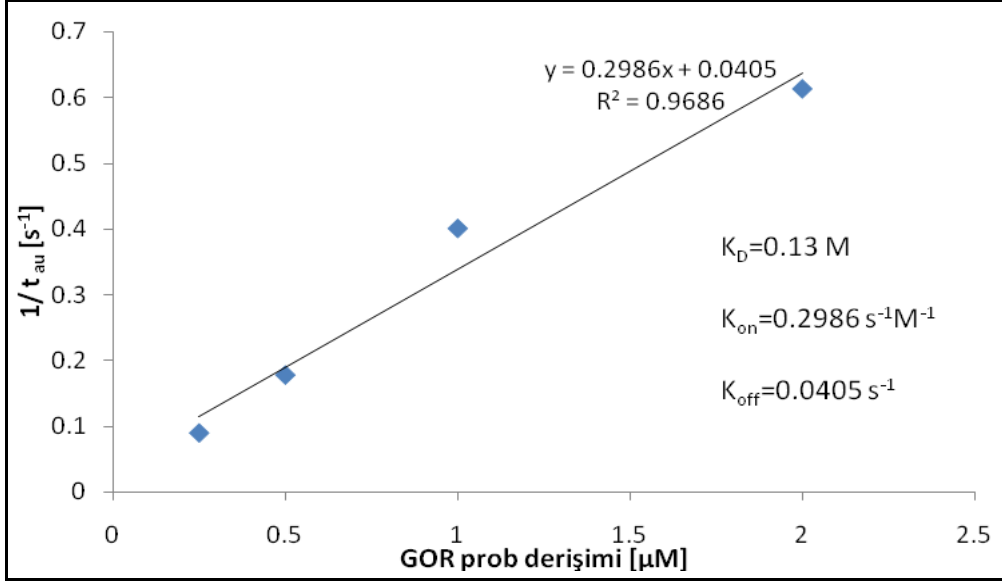
Optimum GOR prob derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki değişim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.98).



Şekil 4.98. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanan GOR prob oligonükleotit derişim değerlerine karşılık delta değişimleri.

Şekil 4.98'den prob derişim değerleri arttıkça delta değişim değerlerinde artığı gözlemlenerek en yüksek tayin limitini $2\mu\text{M}$, en düşük tayin limitin ise $0.05\mu\text{M}$ olarak belirtebiliriz. Optimum prob derişim değeri $2\mu\text{M}$ olarak belirlenmiştir.

Ayrıca GOR prob oligonükleotitinin yüzeye bağlanma kinetiği incelenerek Şekil 4.99'da gösterilmiştir. Zamana karşı delta değişim değerleri kullanılarak 4.1 ve 4.2 eşitlikleri kullanılarak yüzeye bağlanma hız sabiti (K_{on}), yüzeyden ayrılma hız sabiti (K_{off}) ve bağlanma sabiti (K_D) değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.99. GOR prob oligonükleotitinin manyetik altın kaplı nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) yüzeyine bağlanma kinetiği.

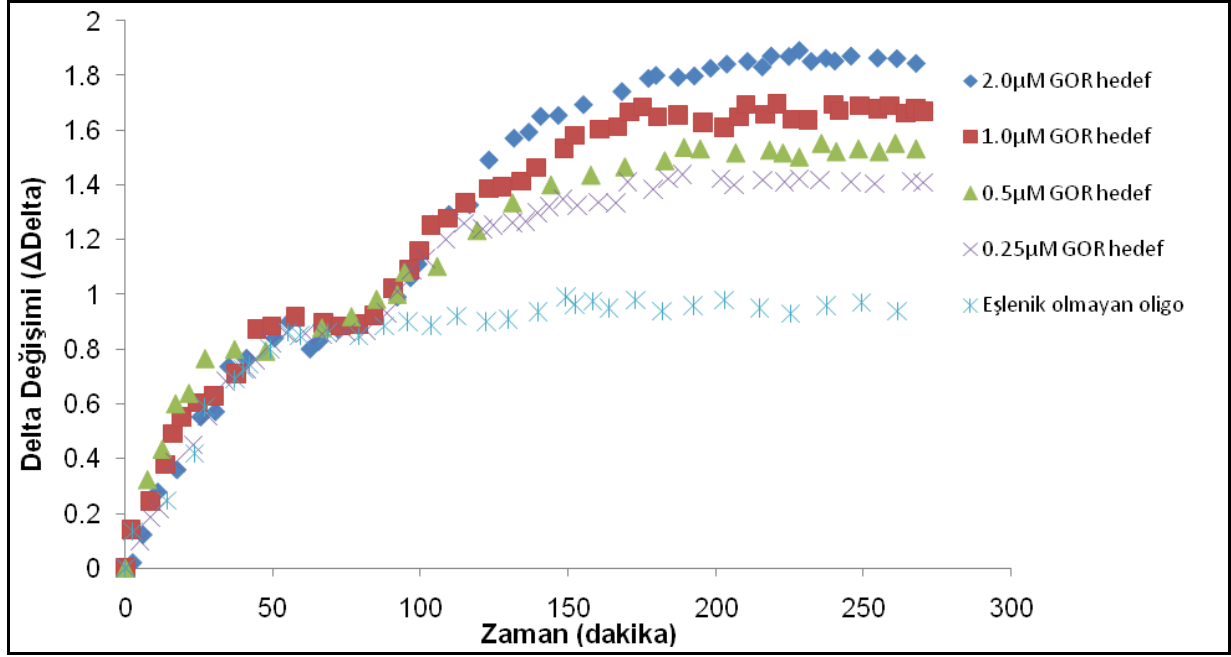
Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.99’da görüldüğü gibi GOR prob oligonükleotitinin altın kaplı manyetik nanopartikül yüzeyine bağlanma sabiti (K_D) 0.13 M olarak bulunmuştur. Aynı oligonükleotitin küresel altın nanopartikül ve farklı uzunluk ve çap oranına sahip altın nanoçubuk yüzeyine bağlanma sabitleri (K_D) sırasıyla, 0.546, 0.27, 4.4 M’dır. Görüldüğü gibi en düşük bağlanma sabitine altın kaplı manyetik nanopartiküller ile yapılan çalışmada elde edilmiştir. K_D değeri ne kadar küçük olursa bağlanmanın o kadar iyi olduğu bilgisi ile GOR prob oligonükleotitin diğer nanopartiküllere nazaran altın kaplı manyetik nanopartikül yüzeyine daha iyi bağlandığı söylenebilir.

Literatürde buna benzer yapılan çalışmalarda elde edilen bağlanma katsayısı değerleri nM ve μM seviyesinde olduğundan bizim elde ettiğimiz bağlanma katsayıları ile kıyaslandığında GOR probunun nanopartikül ve nanoçubuk yüzeyine bağlanmasının literatürdeki kadar iyi olmadığı görülmüştür.

Manyetit İçeren Altın Kaplı ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) Nanopartikül Yüzeyindeki GOR Prob Oligonükleotitin Hedef Dizi ile Eşleşmesi

Hibridizasyon çalışması, optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.25-2.0 μM) GOR hedef dizisi olan oligonükleotit çözeltilerinin SPR akış hücreğine gönderilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma da

yapılan işlemler küresel altın nanopartiküllerin yüzeyindeki GOR probunun hedef dizi ile hibridizasyonu kapsamında ayrıntılı olarak anlatıldığı şekilde aynen uygulanmıştır. Hibridizasyon sonucunda bağlanmaya bağlı analitik sinyal Delta (Δ) değerindeki göreceli değişim olarak rapor edilmiştir. Farklı hedef GOR derişimine bağlı olan DNA hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim Şekil 4.100 'de gösterilmiştir. Ayrıca hedef olmayan oligonükleotit dizisi kullanılarak da kontrol deneyi yapılmıştır.

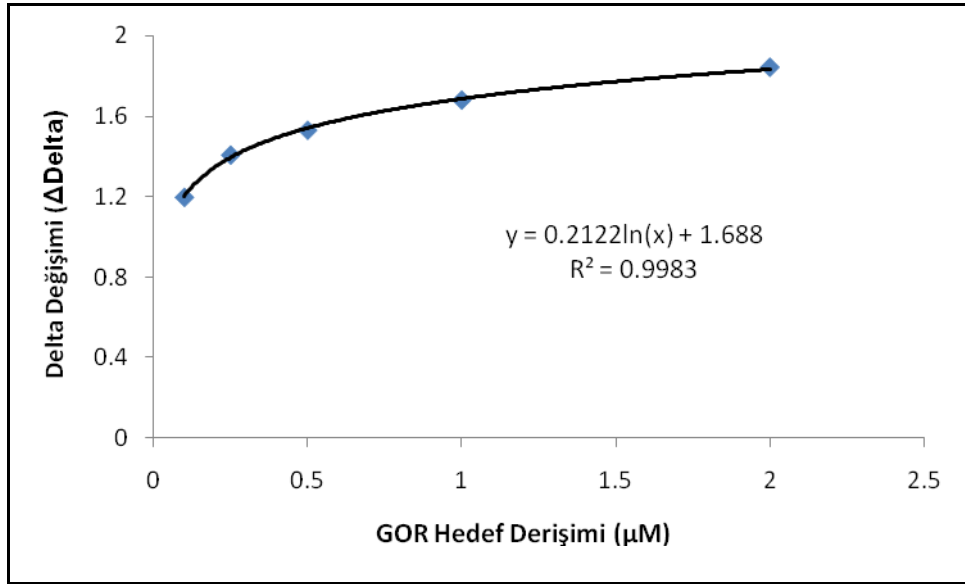


Şekil 4.100. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin farklı derişimlerdeki hedef ile hibridizasyona bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim. GOR prob oligonükleotid derişimi; 2 μM.

Şekil 4.100'de görüldüğü gibi SPR akış hücreğine yerleştirilen altın kaplı manyetik nanopartikül ile genişletilmiş dört cam slayta optimum prob derişiminde oligonükleotit gönderildiğinde hepsinde yaklaşık 75 dk gibi bir zaman aralığında aynı delta değişim değeri ölçülmüştür. Bundan sonra gönderilen hedef oligonükleotit derişimi arttıkça delta değişim değeri artmıştır. Verilen bütün hedef derişimleri için hibridizasyon basamağı, dereceli olarak doyuma yaklaşık 80 dakikada ulaşmıştır. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0.25'ten 2.0 μM'a artmasıyla belirgin olarak artmaktadır. 80 dakika içindeki delta değişimleri sırasıyla 0.4°, 0.6°, 0.7° ve 1.0°'dir. Bu zaman aralığından sonra, deltadaki değişimler genelde sabittir (plato değerine ulaşır).

Ayrıca SPR destekli elipsometrik sensörünün seçiciliğini incelemek amacıyla optimum derişimde 2 µM'lık GOR prob immobilize edilmiş cam slayta 2 µM'lık GOR probun eşleniği olmayan bir oligonükleotit çözeltisi gönderilmiştir. Bu çalışmada da yukarıdaki işlemler aynen uygulanmış olup eşlenik olmayan oligonükleotit dizisi olarak 5'–C CAA CTT TGT TGT CAT GCA CCC–3' sırası kullanılmıştır. Şekil 4.100' de görüldüğü gibi GOR probunun eşleniği olmayan oligonükleotitle hibridize olmadığı Şekil 4.100'de görülen delta değerinde herhangi bir değişim gözlenmemiştir.

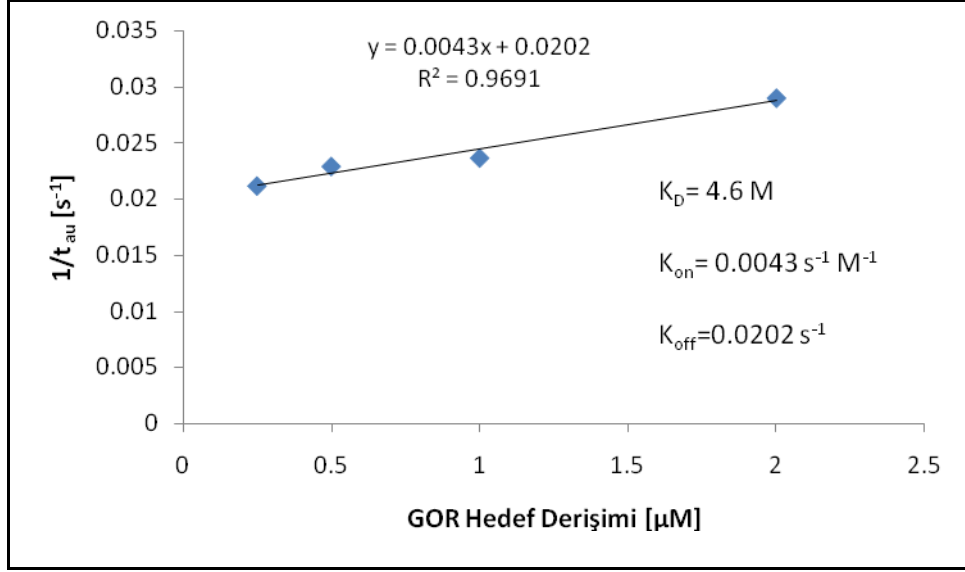
Optimum GOR hedef oligonükleotit derişim tayin sınırını belirlemek için deltadaki derişim değerlerine karşılık derişim grafiği çizilmiştir (Şekil 4.101).



Şekil 4.101. Manyetik kaplı altın nanopartiküller yüzeyine bağlanmış GOR prob oligonükleotitinin GOR hedef oligonükleotiti ile eşleşmesi sonucu derişim değerlerine karşılık delta derişimleri.

Hedef GOR oligonükleotitinin eşleniği ile hibridizasyon kinetiği incelenerek Şekil 4.101'de gösterilmiştir. Yapılan kinetik hesaplamalar sonucu Şekil 4.101'de görüldüğü gibi GOR hedef oligonükleotitinin eşleniğine bağlanma sabiti (K_D) 4.6 M olarak bulunmuştur. Küresel altın nanopartikül, farklı uzunluk ve çap oranına sahip altın nanoçubuk yüzeylerine immobilize edilmiş GOR prob oligonükleotitlerin eşlenik dizisine bağlanma sabitleri (K_D) sırasıyla, 0.305, 1.7, 1.0 M'dir. Görüldüğü gibi en düşük bağlanma sabitine küresel altın nanopartiküller ile yapılan çalışmada elde

edilmiştir. Küresel altın nanopartikül yüzeyindeki GOR prob oligonükleotidinin eşleniğine iyi bağlandığı söylenebilir.



Şekil 4.102. GOR hedef oligonükleotidinin manyetik altın kaplı nanopartikül ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) yüzeyine bağlanma kinetiği.

Genel olarak değişik nanopartiküller ile yapılan SPR destekli elipsometre çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar şöyledir. Altın küresel nanopartiküllerde delta değişimi manyetik etrafı altın kaplıya göre daha fazladır. Altın nanopartikülleri 520 nm de absorbans verdiği için kullandığımız lazer kaynağı bu dalga boyundaki altın nanopartikülleri rezonansa getirmektedir. Manyetik etrafı altın kaplı nanopartiküller ise 535 nm de absorbans verirken lazer kaynağımız bunlarıda bu dalga boyunda rezonansa getirebilir; ancak çekirdekte bulunan manyetik partikülleri bu rezonansı sönmeye uğrattığından daha az delta değişimi gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Ayrıca altın nanoçubuklardaki delta değişiminin de az olduğu görülmüştür. Bu da kullandığımız lazer kaynağının sadece radyal dalga boyunda rezonans oluşturabilirken aksinel yöndeki dalga boyunda oluşturamamaktadır. Aksinel yöndeki absorbans dalga boyu 600-800 nm dalga boyunda olduğu için ve altın nanoçubukların cam yüzeyine yatay yerleştiği için kullandığımız lazer kaynağı bunları rezonansa getirmek için uygun dalga boyunda değildir.

5. SONUÇLAR

- Altın nanopartiküller boyutuna bağlı olarak farklı radyal plasmon dalga boyu vermektedirler. Altın nanopartikülün boyutu ise indirgeyici alan olarak kullanılan trisodyum sitrat ve altın tuzu arasındaki oranla kontrol edilmektedir. Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 1.0- 4.5 arasında değiştirilerek trisodyum sitrat miktarının optik özelliklerine, partikül boy ve boy dağılımına etkileri incelenmiştir. Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı arttıkça üretilen altın nanopartiküllerin çapı azalmıştır.
- Trisodyum sitrat/HAuCl₄ mol oranı 4.5 iken 13 nm bu oran 1.0'e düşürüldüğünde 66 nm çapında küresel altın nanopartiküller elde edilmiştir. Ayrıca zeta potansiyel değerlerine bakıldığında küresel altın nanopartiküllerin negatif yüklü olduğu belirlenmiştir.
- Küresel altın nanopartiküller sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermektedirler. Altın nanopartiküllerin partikül çapı arttıkça radyal plasmon dalga boylarında arttığı görülmüştür. Ortalama partikül çapı 13 nm olan altın nanopartikül 519 nm'de plasmon dalga boyu verirken partikül çapı 66 nm'ye arttığında plasmon dalga boyu 545 nm olarak ölçülmüştür. Partikül boyu arttıkça dalga boyu kayması (red-shift) olduğu görülmüştür.
- Üretilen ortalama partikül çapı 13 nm olan küresel altın nanopartiküllerin floresan özelliği incelenmiştir. Altın nanopartiküller 249 nm'de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Floresan sinyal şiddetlerine bakıldığında altın nanopartiküller 170 civarında bir sinyal şiddeti verirken altın nanoçubuklar uzunluğuna bağlı olarak 650 ve 1000 civarında sinyal şiddeti vermişlerdir. Buna göre altın nanoçubukların altın nanopartiküllere göre daha iyi floresan özellik gösterdiği görülmüştür. Altın nanopartiküllerin derişimi azaldıkça floresan sinyal şiddeti azalmıştır.
- Altın nanopartiküllerin FTIR spektrumunda trisodyum sitrat yapısındaki C=O gerilme titreşimi ve CH₂-O deformasyon ile ilgili karakteristik pikleri 1543 ve 1458 cm⁻¹ dalga sayısında gözlenmiştir.

- Altın nanopartiküllerin X-RD spektrumundaki piklerin literatür ile uyumlu olduğu görülmüştür. Altının kristal yapısına özgü (111), (200) (220) ve (311) pikleri sırasıyla 37, 43, 63 ve 77, 2 teta değerlerinde gözlenmiştir.
- Sentezlenen altın nanopartiküllerin manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiştir. Altın nanopartiküllerin diyamanyetik malzemeler olduğu ve herhangi bir manyetik alana karşı manyetik özellik göstermediği görülmüştür.
- Altın nanopartikülü 522 nm dalga boyunda absorpsiyon verirken manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülün herhangi bir dalga boyunda absorpsiyon vermediği gözlenirken manyetit nanopartiküllerin altınla kaplanması sonucu elde edilen Fe_3O_4/Au nanopartikülünün 547 nm dalga boyunda absorpsiyon verdiği gözlenmiştir. Dolayısıyla buna dayanarak manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplandığı görülmüştür.
- Altın tuz miktarı oluşturulan manyetik altın kaplı nanopartiküllerin etrafındaki altın kabuk kalınlığını etkilemektedir. $HAuCl_4$ miktarının partikül boyuna ve plasmon özelliğine olan etkileri incelenmiştir. Altın tuz miktarı arttıkça partikül boyunun arttığı dolayısıyla plasmon dalga boyununda sağa kaydığı görülmüştür. Altın tuzu derişimi 10 mM iken ortalama partikül çapı 87 nm, 20 mM iken 147 nm çapında Fe_3O_4/Au nanopartikülü elde edilmiştir. 87 nm çapındaki Fe_3O_4/Au nanopartikülü 536 nm dalga boyunda plasmon verirken 147 nm çapındaki nanopartiküller 548 nm dalga boyunda absorpsiyon vermiştir.
- Ortalama partikül çapı 90 nm olan Fe_3O_4 nanopartikülü ile elde edilen altın kaplı manyetik (Fe_3O_4/Au) nanopartikülün çapı 175 nm ölçülmüş olup 551 nm dalga boyunda absorpsiyon verdiği görülmüştür.
- Fe_3O_4/Au nanopartiküller sadece radyal yönde olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermiş olup, partikül çapı arttıkça radyal plasmon dalga boylarında arttığı görülmüştür.

- $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülün ortalama partikül boyu 87 nm olarak ölçülmüş olup, küresel şekilde çekirdek/kabuk yapısında yapıların oluştuğu görülmüştür.
- Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin floresan özelliği Floresan spektrofotometre cihazı ile incelenmiştir. Manyetik özellik gösteren manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülleri herhangi bir floresan özellik göstermezken bunların altın ile kaplanması sonucu elde edilen $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin floresan özellik gösterdiği görülmüştür. Bu floresan özellikleri etrafındaki altın kabuktan kaynaklandığı ve buna dayanarak manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplandığı sonucuna varılmıştır. Altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküller 249 nm'de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Floresan sinyal şiddetlerine bakıldığında $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülleri 500 civarında bir sinyal şiddeti vermişlerdir. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin derişimi azaldıkça floresan sinyal şiddeti azalmıştır.
- Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartiküllerin kimyasal yapısı FTIR spekturumu ile incelenmiştir. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) FTIR spektrumundaki 670 cm^{-1} ve 417 cm^{-1} dalga sayılarında pikler manyetitin 673 cm^{-1} ve 408 cm^{-1} dalga sayılarında oktahedral ve tetrahedral bölgelerdeki Fe-O geriliminden kaynaklanmaktadır. FTIR spekturumuna dayanarak altın kaplı manyetik nanopartiküllerin yapısında manyetit (Fe_3O_4) nanopartiküllere özgü karakteristik piklerin görülmesi nedeniyle yapı içerisinde manyetit nanopartiküllerin olduğu sonucuna varılmıştır.
- Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) kristal yapılarının belirlenmesi için X-ışınları kırılması (X-RD) analizi yapılmış 30, 35 ve 62 2 teta değerlerinde manyetit nanopartikülleri sırasıyla (220), (311) ve (440) kristal yapısına özgü karakteristik piklerini gösterirken, altın kaplı manyetik nanopartikülleri 37, 43, 63 ve 77, 2 teta değerlerinde (111), (200), (220) ve (311) altının kristal yapısına özgü pikler vermiştir. 37, 43 ve 77 iki teta değerlerinde manyetit nanopartikülleri herhangi bir pike sahip değilken altın ile kaplanması sonucu bu teta değerlerinde altının kristal yapısına özgü pikler gözlemlenmiştir. Dolayısıyla altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) manyetit

nanopartiküllerin kristal yapısına özgü piklerin görülmemesi nedeniyle manyetit nanopartiküllerin yüzeyinin tamamen altın ile kaplandığı sonucuna varılmıştır.

- Manyetit (Fe_3O_4) ve altın kaplı manyetik nanopartiküllerinin ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiştir. Manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülü 10000 Gauss manyetik alanda 24 emu/g (Ms) doyumluk mıknatıslığı gösterirken altın kaplı manyetik nanopartikülü ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) ise 10000 Gauss manyetik alanda 0.003 emu/g (Ms) doyumluk mıknatıslığı göstermiştir. Manyetit nanopartiküllerinin altın ile kaplanması sonucu doyumluk mıknatıslığının azaldığı dolayısıyla manyetik özelliğinin azaldığı görülmüştür.
- Manyetit nanopartikülü, manyetik alana karşı mıknatıslık eğrisinde histeresis eğrisi oluşturmadığından süperparamanyetik davranış gösterdiği bunların altın ile kaplanması sonucu elde edilen nanopartiküllerinde süperparamanyetik özelliğini devam ettirdiği gözlenmiştir.
- 40 ve 90 nm çapındaki manyetit nanopartiküllerin altın ile kaplanması sonucu elde edilen nanopartiküllerin manyetik özelliklerindeki değişim incelenmiştir. 40 nm çapında manyetit içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü 0.0030 emu/g (Ms) doyumluk mıknatıslığı gösterirken 90 nm çapında manyetit içeren $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikülü 0.0090 emu/g (Ms) doyumluk mıknatıslığı göstermiştir. Manyetik özellik kazandıran çekirdek de bulunan manyetit (Fe_3O_4) nanopartikülünün boyunun artmasıyla doyumluk mıknatıslığının üç kat arttığı görülmüştür.
- Altın nanoçubukların üretimi, küresel yapıda altın çekirdeklerinin hazırlanıp bu çekirdeklerin büyütme çözeltisinde silindirik yapıya dönüştürülmesi olmak üzere iki ana prosesten oluşan çekirdek geliştirme metodu (Seed Growth method) ile sentezlenmiştir.
- Farklı boyutta altın nanoçubukların sentezlenmesi için uzunluk/çap oranını (aspect ratio) etkileyen AgNO_3 miktarı, çekirdek çözelti miktarı, askorbik asit miktarı, surfaktant türü ve derişimi, reaksiyon sıcaklığı, farklı çekirdek çözeltilerinin ve farklı sürelerde bekletilmiş çekirdek çözeltilerinin kullanılması gibi parametrelerin

uzunluk/çap oranına dolayısıyla çözelti rengi ve optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir.

- Altın nanoçubukların çekirdek geliştirilmesi yöntemiyle sentezi sırasında nanoçubukların uzunluk ve çapına etki eden faktörler arasında çekirdek çözeltisinin yapısının önemli bir rolü olmaktadır. CTAB kaplı (pozitif yüklü) çekirdek çözeltileri ile elde edilen altın nanoçubuk veriminin sitrat kaplı (negative yüklü) çekirdek çözeltileri ile elde edilen altın nanoçubuklara göre daha iyi olduğu görülmüştür. CTAB kaplı çekirdekle daha yüksek aspect ratio oranında altın nanoçubuklar elde edilmiştir. CTAB kaplı pozitif yüklü çekirdek çözeltisi ile tamamen silindirik şekilde altın nanoçubukların elde edilirken, sitrat kaplı negatif yüklü çekirdek çözeltileri ile oluşturulan altın nanoçubukların yanı sıra küresel büyük boyutta nanopartiküllerinde olduğu görülmüştür (Şekil 4.21 A ve B). Yapılan çalışma sonucu en iyi çekirdek çözeltisinin CTAB kaplı pozitif yüklü çekirdek çözeltisi olduğu belirlenmiştir.
- Çekirdek çözeltisindeki en ufak değişiklik çubuğun morfoloji ve boyutunda büyük değişikliklere neden olmaktadır. Altın nanoçubuk sentezinin ilk aşamasında hazırlanan çekirdek çözeltilerin reaktif hale gelmesi için belli bir süre karanlıkta bekletilmektedir. Farklı aging sürelerinde bekletilen çekirdek çözeltileri ile altın nanoçubuk oluşturularak uzunluk/çap oranına dolayısıyla optik özelliğine olan etkisi incelenmiştir. Farklı aging sürelerinde bekletilmiş çekirdek çözeltileri ile hazırlanan altın nanoçubukların aging süresi arttıkça eksenel yöndeki plasmon dalga boylarının ve üretilen altın nanoçubukların verimlerinin azaldığı görülmüştür. 5 saatten daha fazla sürede aging edilmiş çekirdek çözeltileri ile elde edilen altın nanoçubukların TEM görüntülerinde kübik ve sivri uçlu şekilsiz yapıların olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.23. A, B ve C).
- Sürfaktant türünün nanoçubuğun verimine ve aspect ratio oranına etkisini incelemek amacıyla CTAB (setil trimetilamonyum bromid), CTAC (setil trimetilamonyum klorid) ve BDAC/CTAB (benzildimetilamonyum klorid/ setil trimetilamonyum bromid) ikili surfaktant karışımı olmak üzere üç farklı surfaktant kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. CTAC surfaktantı ile küresel altın nanopartiküller elde edilmesi, BDAC/CTAB ikili surfaktantı ile daha

az verimde altın nanoçubuk oluşturulması nedeniyle en iyi surfactant türü olarak CTAB belirlenmiştir.

- Surfaktant (CTAB) derişiminin oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranına olan etkisini incelemek için üç farklı derişimde CTAB kullanılarak altın nanoçubuklar elde edilmiştir. CTAB derişimi arttıkça oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranının azaldığı görülmüştür.
- Altın nanoçubuk geliştirme çözeltilinde kullanılan $AgNO_3$ miktarının oluşturulan altın nanoçubukların verimine ve aspect ratio oranına dolayısıyla optik özelliğine olan etkisini incelemek amacıyla dört farklı miktarda $AgNO_3$ kullanılarak altın nanoçubuk sentezi gerçekleştirilmiştir. $AgNO_3$ miktarı arttıkça nanoçubuk oluşum verimi artmış ve aspect ratio oranının da arttığı görülmüştür. Literatürde kritik bir Ag^+ iyonu miktarından daha büyük miktarlarda aspect ratio oranının tekrar azaldığı rapor edilmiş olup bu kritik $AgNO_3$ miktarının 375 μl olduğu belirlenmiştir. Bu değerden fazla $AgNO_3$ miktarlarında çapı büyüyen dolayısıyla aspect ratio oranı azalan altın nanoçubuklar elde edilmiştir. (Şekil 4.29. A, B, C ve D).
- Silindirik şekilde yapıların oluşabilmesi için kullanılacak olan indirgeme ajanının kuvvetli olmayıp zayıf bir indirgeme ajanı olması gerekmektedir. İndirgeme ajanı olarak askorbik asit kullanılmıştır. Askorbik asit derişiminin altın nanoçubukların oluşumuna etkisini incelemek amacıyla 100 μM 'lık askorbid asit çözeltilisinden 135 μl ; 270 μl ; 540 μl ; 675 μl ve 810 μl olmak üzere beş farklı miktarda kullanılarak altın nanoçubuk üretimi gerçekleştirilmiştir. Askorbik asit miktarı arttıkça altın nanoçubuk oluşum verimi artmıştır. 540 μl 'ye kadar artan askorbik asit miktarında altın nanoçubukların uzunluk/çap oranı artmış bu değerden fazla askorbik asit miktarlarında uzunluk/çap oranı tekrar azalmıştır. Ayrıca askorbik asit miktarı arttıkça altın prekürsörlerin daha hızlı indirgenmesi nedeniyle dambıl şeklinde nanoçubukların oluştuğu görülmüştür (Şekil 4.31 D ve E).
- Altın nanoçubuk sentezi sırasında geliştirme çözeltilisine eklenen çekirdek çözeltilisi miktarının oluşturulan altın nanoçubukların aspect ratio oranlarına olan etkisini incelemek amacıyla üç farklı miktarda çekirdek çözeltilisi kullanılmıştır. Çekirdek çözeltili miktarı arttıkça altın nanoçubukların eksenel yöndeki plasmon dalga boylarının dolayısıyla aspect ratio oranlarının azaldığı görülmüştür. Çekirdek

çözelti miktarı arttıkça verim artmıştır. Her üç çekirdek çözelti miktarında silindirik yapılar elde edilmiş olup, çekirdek çözelti miktarının artması ile oluşturulan altın nanoçubukların çapının uzunluğuna göre daha fazla arttığı bu nedenle aspect ratio oranlarının azaldığı görülmüştür (Şekil 4.33 A, B ve C).

- Reaksiyon sıcaklığının nanoçubuğun uzunluk/çap oranına ve dolayısıyla optik özelliğine olan etkisini incelemek için üç farklı sıcaklıkta altın nanoçubuklar üretilmiştir. Sıcaklığın artmasıyla nanoçubukların ortalama çap değerlerinin arttığı bu da uzunluk/çap oranının azalmasına neden olduğu dolayısıyla eksenel plasmon dalga boyunun azaldığı görülmüştür. Sıcaklık arttıkça nanoçubuk oluşum verimi de azalmıştır. 20 °C de uzun ve ince silindirik yapılar oluşurken 50 °C'de daha kısa ve kalın silindirik yapılar oluşmuştur (Şekil 4.35 A, B ve C).
- Yapılan bütün bu çalışmalar sonucunda farklı uzunluk/çap oranına sahip farklı renkte ve farklı optik özellik gösteren altın nanoçubuklar üretilmiştir. Çözelti rengi mavi ve tonları olan altın nanoçubukların aspect ratio oranları düşüken bu oran arttıkça çözelti rengi kırmızımsı kahve ve açık kahveye dönmektedir. Bu şekilde eksenel plasmon dalga boyu 600-900 nm aralığında aspect ratio oranı 2.0-5.0 aralığında olan gök kuşağı şeklinde farklı optik özelliklere sahip altın nanoçubuklar elde edilmiştir.
- Uzunluk/çap oranı 4.8 (kırmızımsı-kahve renkli) ve 2.1 (mavi renkli) olan altın nanoçubukların fluoresan özelliği incelenmiştir. 4.8 ve 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuklar 249 nm'de uyarıldığında 498 nm dalga boyunda emisyon vermişlerdir. Görüldüğü gibi aspect ratio oranının değişmesi ile uyarılma ve emisyon dalga boylarında herhangi bir değişim olmayıp her ikisinde aynı dalga boylarında uyarılıp aynı dalga boylarında emisyon vermişlerdir. Aspect ratio oranı 4.8 ve 2.1 olan altın nanoçubuklar sırasıyla 650 ve 1000 civarında fluoresan sinyal şiddeti göstermiştir. Nanoçubukların eksenel uzunlukları arttıkça fluoresan özelliklerinin arttığı gözlemlenmiştir. Altın nanoçubuğun derişimi azaldıkça fluoresan sinyal şiddeti azalmıştır.
- Sentezlenen altın nanoçubukların kimyasal yapısı ATR spektrumu ile incelenmiş olup, sentez sırasında surfactant olarak kullanılan CTAB molekülünden gelen -CH₂ titreşim frekansı spektrumda 1640 cm⁻¹, -C-N gerilim titreşimi 1280 cm⁻¹

civarında açığa çıkmaktadır. 1107, 960, 890, 817 cm^{-1} deki piklerin varlığı CTAB molekülünün altın nanoçubuk yüzeyine $\text{CTA}^+\text{-Au}$ bağı ile bağlandığını göstermiştir.

- Sentezlenen altın nanoçubukların kristal yapılarının belirlenmesi için X-RD analizi yapılmıştır. 2 teta değeri 37 iken (111) difraksiyon pikinin altın nanoçubukların uzun eksenine paralel yönde uzadığını gösterdiğinden bu pikin sinyal şiddetinin literatüre göre düşük olması nedeniyle uzunluk/çap oranı küçük altın nanoçubuk olduğu belirlenmiştir.
- Altın nanoçubukların manyetik özellikleri titreşimli manyetometre (VSM) cihazı ile belirlenmiş olup, diyamanyetik malzemeler olduğu ve herhangi bir manyetik alana karşı manyetik özellik göstermediği görülmüştür.
- Mikroemülsiyon fazda tanı kiti veya nanoarray geliştirilmesi çalışmalarında; altın nanoçubuklar (aspect ratio oranı 4.8 ve 2.1), küresel altın nanopartikül ve $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül yüzeyine farklı derişimlerde (0.5-3.0 μM) tiyollu oligonükleotitler (MTB ve GOR) immobilize edilerek nanopropalar hazırlanmıştır. Prob derişimine bağılı olarak dört farklı altın nanopartikülün plasmon dalga boylarındaki kaymalar incelenmiştir.
- Eksenel yönde 836 nm radyal yönde 525 nm dalga boylarında absorbands veren 4.8 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuğun yüzeyine farklı derişimlerde GOR prob bağlanması sonucu eksenel plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiş olup, GOR prob derişimi arttıkça eksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbandsın azaldığı görülmüştür.
- 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde (1.0-3.0 μM) hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu gerçekleştirilerek dalga boyu kaymaları incelenmiştir. GOR hedef derişimi arttıkça eksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 μM , 2.0 μM , 3.0 μM derişimlerinde GOR hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu eksenel plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 20 nm, 57 nm ve 61 nm olarak ölçülmüştür.

- Süspansiyon fazda altın nanoçubukların aksenel plasmon dalga boyu kaymalarına dayanan DNA tanı kiti geliştirilmesi çalışmasının seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanoçubuk probuna 2.0 μM derişiminde GOR probun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. 2.0 μM derişiminde GOR hedefi olmayan MTB hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 3 nm gibi küçük bir dalga boyu kayması ölçülmüş olup, diğer dalga boyu kayma değerlerine göre çok küçük bir dalga boyu kayması olduğundan sistemin hassas olduğu sonucuna varılmıştır.
- Altın nanoçubuk (4.8 A.R) yüzeyine GOR prob oligonükleotit bağlandıktan ve hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu fluoresan sinyal şiddetindeki değişim incelenmiştir. Fluoresan sinyal şiddeti 650 olan altın nanoçubuk yüzeyine 2.0 μM derişiminde GOR prob bağlandığında 450, 2.0 μM derişiminde GOR hedef ile hybridize olduğunda 20'lerde fluoresan sinyal şiddeti ölçülmüş olup, 2.0 μM derişiminde GOR probunun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotiti ile etkileşimi sonucu tekrar fluoresan sinyal şiddetinin 200'lere yükseldiği görülmüştür.
- Altın nanoçubuk yüzeyindeki GOR probunun hedefi ile hibridizasyonu sonucu fluoresan sinyal şiddeti 20 civarında iken ısıtılarak hibridizasyonun bozulması sonucu ölçülen sinyal şiddeti tekrar 350'ye yükselmiştir. Yapıdan hedef oligonükleotitinin ayrılması ile sinyal şiddeti tekrar arttığı görülmüştür. Süspansiyon fazda altın nanoçubuklar ile geliştirilen DNA tanı kiti sistemi, aksenel yöndeki plasmon dalga boylarındaki kaymalarının incelenmesinin yanı sıra fluoresan sinyal şiddetindeki değişimler ile de desteklenmiştir.
- Aksenel yönde 639 nm radyal yönde 515 nm dalga boylarında absorbans veren 2.1 aspect ratio oranındaki altın nanoçubuğun yüzeyine farklı derişimlerde MTB prob bağlanması sonucu aksenel plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiş olup, MTB prob derişimi arttıkça aksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbansın azaldığı görülmüş olup, 0.5 μM , 1.0 μM , 2.0 μM ve 3.0 μM derişimlerinde MTB prob bağlanmış altın nanoçubukların aksenel plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 15 nm, 19 nm, 46 ve 60 nm olarak ölçülmüştür.

- 2.0 μM derişimde MTB prob bağlanmış altın nanoçubuk probunun farklı derişimlerde (1.0-3.0 μM) hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu gerçekleştirilerek dalga boyu kaymaları incelenmiştir. MTB hedef derişimi arttıkça aksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 μM , 2.0 μM , 3.0 μM derişimlerinde MTB hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu aksenel plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 18 nm, 36 nm ve 60 nm olarak ölçülmüştür.
- Süspansiyon fazda altın nanoçubukların aksenel plasmon dalga boyu kaymalarına dayanan DNA tanı kiti geliştirilmesi çalışmasının seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde MTB prob bağlanmış altın nanoçubuk probuna 2.0 μM derişiminde MTB probun hedefi olmayan GOR hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. 2.0 μM derişiminde MTB hedefi olmayan GOR hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 4 nm gibi küçük bir dalga boyu kayması ölçülmüş olup, diğer dalga boyu kayma değerlerine göre çok küçük bir dalga boyu kayması olduğundan sistemin hassas olduğu sonucuna varılmıştır.
- 520 nm dalga boyunda radyal yönde plasmon veren küresel altın nanopartikül yüzeyine farklı derişimlerde GOR prob bağlanması sonucu radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiş olup, GOR prob derişimi arttıkça aksenel plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbansın azaldığı görülmüş olup, 0.5 μM , 1.0 μM , 2.0 μM ve 3.0 μM derişimlerinde GOR prob bağlanmış küresel altın nanopartiküllerin radyal plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 2 nm, 3 nm, 5 ve 7 nm olarak ölçülmüştür. En yüksek GOR prob derişiminde 7 nm'lik bir red-shift göstermiş olup altın nanoçubuklar kadar yüksek bir dalga boyu kayması göstermemiştir. Küresel altın nanopartiküllerin altın nanoçubuklar kadar ortamın refraktif indeksi değişimine çok duyarlı olmadığı görülmüştür.
- 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanopartikül probunun farklı derişimlerde (1.0-3.0 μM) hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu gerçekleştirilerek dalga boyu kaymaları incelenmiştir. GOR hedef derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 μM , 2.0 μM , 3.0 μM derişimlerinde hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal

plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 2 nm, 5 nm ve 8 nm olarak ölçülmüştür.

- Süspansiyon fazda altın nanopartiküllerin radyal plasmon dalga boyu kaymalarına dayanan DNA tanı kiti geliştirilmesi çalışmasının seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde GOR prob bağlanmış altın nanopartikül probuna 2.0 μM derişiminde GOR probun hedefi olmayan MTB hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. 2.0 μM derişiminde GOR hedefi olmayan MTB hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 2 nm'lik dalga boyu kayması ölçülmüş olup, diğer dalga boyu kayma değerlerine yakın bir dalga boyu kayması olduğundan küresel altın nanopartiküller ile oluşturulan süspansiyon fazda DNA tanı kiti sisteminin hassasiyeti altın nanoçubuklar kadar iyi olmadığı görülmüştür.
- 536 nm dalga boyunda radyal yönde plasmon veren $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül yüzeyine farklı derişimlerde MTB prob bağlanması sonucu radyal plasmon dalga boylarında kayma gözlenmiş olup, MTB prob derişimi arttıkça aksenal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı absorbansın azaldığı görülmüş olup, 0.5 μM , 1.0 μM , 2.0 μM ve 3.0 μM derişimlerinde MTB prob bağlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin radyal plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 2 nm, 4 nm, 8 ve 12 nm olarak ölçülmüştür. Küresel altın nanopartiküller gibi altın nanoçubuklar kadar ortamın refraktif indeksi değişimine çok duyarlı olmadığı görülmüştür.
- 2.0 μM derişimde MTB prob bağlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül probunun farklı derişimlerde (1.0-3.0 μM) hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu gerçekleştirilerek dalga boyu kaymaları incelenmiştir. MTB hedef derişimi arttıkça radyal plasmon dalga boylarının ve dalga boyu kaymalarının arttığı görülmüştür. 1.0 μM , 2.0 μM , 3.0 μM derişimlerinde hedef oligonükleotiti ile hibridizasyonu sonucu radyal plasmon dalga boylarındaki kayma sırasıyla 2 nm, 5 nm ve 9 nm olarak ölçülmüştür.
- Süspansiyon fazda $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküllerin radyal plasmon dalga boyu kaymalarına dayanan DNA tanı kiti geliştirilmesi çalışmasının seçiciliğini belirlemek amacıyla da 2.0 μM derişimde MTB prob bağlanmış $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartikül probuna 2.0 μM derişiminde MTB probun hedefi olmayan GOR

hedef oligonükleotit çözeltisi kullanılmıştır. 2.0 μM derişiminde MTB hedefi olmayan GOR hedefi ile yapılan çalışma sonucunda 2 nm'lik dalga boyu kayması ölçülmüş olup, diğer dalga boyu kayma değerlerine yakın bir dalga boyu kayması olduğundan $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$ nanopartiküller ile oluşturulan süspansiyon fazda DNA tanı kiti sisteminin hassasiyeti altın nanoçubuklar kadar iyi olmadığı görülmüştür.

- Farklı prob lar takılmış iki farklı şekil ya da yapıdaki altın nanopartikül karışım larını içeren mikroemülsiyon lar ("nanoarrayler") hazırlanmıştır. Bunlar; altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı, küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB prob karışımı, altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu ile altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikül MTB prob karışımı, küresel altın nanopartikül GOR probu ile altın kaplı manyetik ($\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au}$) nanopartikül MTB prob karışımıdır.
- Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu 868 nm dalga boyunda, altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu 686 nm dalga boyunda eksenel plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoçubuk karışımı ise biri 685 nm diğer 871 nm'de olmak üzere iki tane eksenel plasmon dalga boyu vermiştir. 685 nm'deki plasmon dalga boyu MTB probu bağlanmış aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuk probunu 871 nm'deki plasmon dalga boyu ise GOR probu bağlanmış aspect ratio oranı 4.8 olan altın nanoçubuk probunu göstermektedir. Dolayısıyla farklı iki nanoçubuk prob karışımının her bir nanoçubuğa özgü pikini kaybetmeden çok az dalga boyu kayması göstererek taşıdığı görülmüştür.
- İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı GOR hedefi ile etkileşimi sonucu 687 nm ve 906 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 2 nm'lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 35 nm'lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla GOR probu bağlanmış altın nanoçubuğun GOR hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının olduğu görülmüştür. MTB probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için önemli bir derecede dalga boyu kayması görülmemiştir.

- İki farklı prob takılı altın nanoçubuk karışımı MTB hedefi ile etkileşimi sonucu 712 nm ve 880 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 27 nm'lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 9 nm'lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun MTB hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu görülmüştür. GOR probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için 9 nm'lik birdalga boyu kayması görülmüş olup 27 nm'lik kaymanın yanında çok fazla önem arz etmemektedir.
- Altın nanoçubuk (A.R. 2.1) MTB probu 517 nm 'de radyal 686 nm'de aksenal plasmon dalga boyu verirken altın nanopartikül GOR probu sadece 527 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise biri 522 nm diğeri 691 nm'de olmak üzere iki tane plasmon dalga boyu vermiştir. 522 nm'deki plasmon dalga boyu GOR probu bağlanmış altın nanopartikül probuna 691 nm'deki plasmon dalga boyu ise MTB probu bağlanmış aspect ratio oranı 2.1 olan altın nanoçubuk probuna ait olduğu söylenebilir. Dolayısıyla farklı iki nanoprob karışımının hem altın nanopartikül probuna hem de altın nanoçubuk probuna özgü pikini kaybetmeden taşıdığı görülmüştür.
- İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı GOR hedefi ile etkileşimi sonucu 540 nm ve 686 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 5 nm'lik dalga boyu azalması şeklinde blue-shift gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 17 nm'lik dalga boyu kayması (red-shift) gözlemlenmiştir. Dolayısıyla GOR probu bağlanmış altın nanoçubuğun GOR hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu görülmüştür.
- İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı GOR hedefi ile etkileşimi sonucu 533 nm ve 712 nm dalga boylarında plasmon dalga boyu vermiştir. Görüldüğü gibi MTB probuna özgü plasmon dalga boyunda 21 nm'lik dalga boyu kayması gösterirken GOR probuna özgü plasmon dalga boyunda 10 nm'lik dalga boyu kayması gözlemlenmiştir. Dolayısıyla MTB probu bağlanmış altın nanoçubuğun MTB hedefi ile etkileştiği bunun sonucunda dalga boyu kaymasının oluştuğu

görülmüştür. GOR probu takılı altın nanoçubukta ise eşleniği GOR hedef olmadığı için 10 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüş olup 21 nm'lik kaymanın yanında çok fazla önem arz etmediği düşünülmektedir.

- Altın nanoçubuk (A.R. 4.8) GOR probu 528 nm'de radyal 868 nm'de aksenal plasmon dalga boyu verirken, Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probu sadece 544 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise biri 542 nm diğeri 870 nm'de olmak üzere iki tane plasmon dalga boyu vermiştir. Dolayısıyla farklı iki nanoprob karışımının hem Fe_3O_4/Au nanopartikül probuna hem de altın nanoçubuk probuna özgü pikini kaybetmeden taşıdığı görülmüştür.
- İki farklı prob takılı altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe_3O_4/Au nanopartikül karışımı GOR hedefi ile etkileştirilip manyetik olarak ayrılmıştır. Manyetik özellik göstermeyen çözeltinin 536 nm'de radyal 898 nm'de aksenal plasmon dalga boyu vermiştir. GOR probu taşıyan altın nanoçubuk (A.R 4.8) ise 528 nm'de radyal 868 nm'de aksenal plasmon dalga boyu göstermektedir. Radyal yönde 8 nm'lik aksenal yönde ise 30 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüştür dolayısıyla prob karışımı içindeki GOR probu taşıyan altın nanoçubuğun GOR hedef oligonükleotiti ile etkileşmiştir.
- İki farklı prob takılı altın nanoçubuk (A.R 4.8) ve Fe_3O_4/Au nanopartikül karışımı MTB hedefi ile etkileştirilip manyetik olarak ayrılmıştır. Manyetik özellik gösteren çözeltinin 559 nm'de radyal 871 nm'de aksenal plasmon dalga boyu vermiştir. MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülü ise 544 nm'de radyal plasmon dalga boyu göstermektedir. Radyal yönde 15 nm'lik bir dalga boyu kayması görülmüştür. Prob karışımı içindeki MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülün MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştiği ve bunun sonucu 15 nm'lik bir dalga boyu kayması oluşturduğu görülmüştür.
- Altın nanopartikül GOR probu 527 nm'de radyal plasmon dalga boyu verirken Fe_3O_4/Au nanopartikül MTB probu 544 nm dalga boyunda radyal plasmon dalga boyu göstermiştir. İki farklı prob takılı bu altın nanoprob karışımı ise sadece küresel partiküllerden oluştuğu için sadece 535 nm dalga boyunda olmak üzere tek bir plasmon dalga boyu vermiştir. Farklı iki nanoprob karışımının hem

Fe_3O_4/Au nanopartikül probuna hem de altın nanoçubuk probuna özgü piki göstermediği görülmüştür. Fe_3O_4/Au nanopartikül probuna göre 9 nm'lik blue-shift altın nanopartikül probuna göre 8 nm'lik bir red-shift oluşmuştur.

- İki farklı prob takılı altın nanopartikül karışımı 2.0 μM derişiminde GOR hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısım birbirinden ayrılmıştır. Manyetik ayırma sonucu manyetik olmayan kısım 535 nm dalga boyunda plasmon vermiş olup, manyetik olmayan kısımda küresel altın GOR prob ve GOR hedef çözeltisi bulunmaktadır. Dolayısıyla altın nanopartikül GOR probu 527 nm dalga boyunda plasmon verdiğiinden GOR prob ve GOR hedefin etkileşimi sonucu 8 nm'lik bir dalga boyu kayması gerçekleşmiştir. Manyetik özellik gösteren kısım 544 nm dalga boyunda plasmon göstermiş olup, Fe_3O_4/Au MTB probunun gösterdiği plasmonu vermiştir. Dolayısıyla GOR hedefin MTB probu taşıyan Fe_3O_4/Au nanopartikülü ile etkileşmediği dolayısıyla herhangi bir dalga boyu kayması oluşturmadığı görülmüştür.
- İki farklı prob takılı altın nanoprob karışımı 2.0 μM derişiminde MTB hedef oligonükleotiti ile etkileştirildiğinde manyetik ayırma sonucu manyetik özellik gösteren ve göstermeyen kısım birbirinden ayrılmıştır. Manyetik ayırma sonucu manyetik olan kısım 550 nm dalga boyunda plasmon vermiş olup, manyetik özellik gösteren kısımda Fe_3O_4/Au -MTB prob ve MTB hedef çözeltisi bulunmaktadır. Dolayısıyla Fe_3O_4/Au -MTB probu 544 nm dalga boyunda plasmon verdiğiinden MTB prob ve MTB hedefin etkileşimi sonucu 6 nm'lik bir dalga boyu kayması gerçekleşmiştir. Manyetik olmayan kısım ise 527 nm dalga boyunda plasmon vermiş olup Au nanopartikül GOR probunun gösterdiği plasmonu vermiştir. MTB hedefin GOR probu taşıyan altın nanopartikülü ile etkileşmediği dolayısıyla herhangi bir dalga boyu kayması oluşturmadığı görülmüştür.
- SPR destekli elipsometrik biyosensör çalışmalarında, temizlenmiş cam slaytlar MPTS çözeltisiyle silanize edilip tiyol uç grubundan dört tip altın nanopartikülün kimyasal olarak immobilizasyonu sağlanmıştır. Uzunluk/çap oranı 3.5 ve 2.6 olan altın nanoçubuklar, küresel altın nanopartikül ve Fe_3O_4/Au nanopartikülleri ile çalışmalar yapılmıştır.

- Farklı derişimlerde (0.25-1.0 %(v/v)) dört tip altın nanopartikül cam yüzeyine immobilize edilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum nanopartikül derişimi belirlenmiştir. Küresel altın nanopartikül için 0.25 %(v/v), uzunluk/çap oranı 3.5 ve 2.6 olan nanoçubuklar için 0.85 %(v/v) ve Fe₃O₄/Au nanopartikül için 1.0 %(v/v) optimum nanopartikül derişimi 0.25 %(v/v) olarak belirlenmiştir.
- Dört farklı altın nanopartiküller ile genişletilmiş cam slaytlara farklı derişimlerde (0.25-2.0 µM) GOR oligonükleotit problemleri gönderilerek SPR destekli elipsometrik ölçümlerle optimum prob derişimi incelenmiştir. Küresel altın nanopartikül ve uzunluk/çap oranı 3.5 olan altın nanoçubuk için 1.0 µM, uzunluk/çap oranı 2.6 olan nanoçubuk ve Fe₃O₄/Au nanopartikül için 2.0 µM optimum GOR prob derişimi olarak belirlenmiştir. Her dört farklı nanopartikül için GOR oligonükleotit prob derişiminin artmasıyla delta değışimi de artmıştır. Küresel altın nanopartikül için 2.5°, uzunluk/çap oranı 3.5 olan altın nanoçubuk için 0.7°, uzunluk/çap oranı 2.6 olan altın nanoçubuk ve Fe₃O₄/Au nanopartikül için 0.85° delta değışim değeri ölçülmüştür. En yüksek delta değışim değeri küresel altın nanopartiküllerle yapılan çalışmada elde edilmiştir.
- Altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan oligonükleotitlerin bağlanma katsayısını belirlemek için kinetik çalışmalar da yapılmıştır. GOR prob oligonükleotitini nanopartikül yüzeyine bağlanma sabitleri (K_D) küresel altın nanopartikül için 0.546 M, uzunluk/çap oranı 3.5 olan altın nanoçubuk için 0.27 M, uzunluk/çap oranı 2.6 olan altın nanoçubuk için 4.4 M, Fe₃O₄/Au nanopartikül için 0.13 M olarak bulunmuştur. GOR probunun nanopartikül yüzeylerine bağlandığı fakat K_D değeri ne kadar küçük olursa bağlanmanın o kadar iyi olduğu bilgisiyyle literatürdeki kadar iyi olmadığı görülmüştür.
- Optimum prob derişiminde oligonükleotit takılmış dört cam slayta dört farklı derişimde (0.25-2.0 µM) GOR hedef dizisi olan oligonükleotit çözeltileri gönderilerek hibridizasyon sonucunda oluşan kalınlık değışim değeri ölçülmüştür. Hibridizasyon hızı hedef derişiminin 0.25'ten 2.0 µM'a artmasıyla belirgin olarak artmıştır. Küresel altın nanopartiküller için 125 dakika içindeki delta değışimleri sırasıyla 0.3°, 0.5°, 1.2° ve 1.5°; uzunluk/çap oranı 3.5 olan altın nanoçubuk için 90 dakika içindeki delta değışimleri sırasıyla 0.4°, 0.6°, 1.0° ve 1.2°; uzunluk/çap oranı 2.6 olan altın nanoçubuk için 90 dakika içindeki delta

değişimleri sırasıyla 0.2°, 0.8°, 0.9° ve 1.2°; Fe₃O₄/Au nanopartikül için 80 dakika içindeki delta değişimleri sırasıyla 0.4°, 0.6°, 0.7° ve 1.0°'dir.

- Nanopartikül immobilize edilmiş cam slayt üzerindeki nanopartikül problemlerine hedef olmayan oligonükleotit çözeltisi gönderilerek sistemin seçiciliği araştırılmıştır. Herhangi bir delta değişimi gözlenmeyerek prob oligonükleotitlerin hedef olmayan oligonükleotitler ile hibridize olmadığı sistemin hassas olduğu belirlenmiştir.
- Nanopartikül yüzeyindeki GOR prob oligonükleotitinin hedef oligonükleotiti ile hibridizasyon kinetiği incelenerek bağlanma sabitleri belirlenmiştir. Küresel altın nanopartikül için bağlanma sabiti (K_D) 0.305 M, uzunluk/çap oranı 3.5 olan altın nanoçubuk için bağlanma sabiti (K_D) 1.7 M, uzunluk/çap oranı 2.6 olan altın nanoçubuk için bağlanma sabiti (K_D) 1.0 M, Fe₃O₄/Au nanopartikül için bağlanma sabiti (K_D) 4.6 M olarak belirlenmiştir. En düşük bağlanma sabitine küresel altın nanopartiküller ile yapılan çalışmada elde edilmiştir. Küresel altın nanopartikül yüzeyindeki GOR prob oligonükleotitinin eşleniğine iyi bağlandığı söylenebilir.
- Genel olarak değişik nanopartiküller ile yapılan SPR destekli elipsometre çalışması sonucunda elde edilen sonuçlar şöyledir. Altın küresel nanopartiküllerde delta değişimi manyetik etrafı altın kaplıya göre daha fazladır. Altın nanopartikülleri 520 nm de absorban verdiği için kullandığımız lazer kaynağı bu dalga boyundaki altın nanopartikülleri rezonansa getirmektedir. Manyetik etrafı altın kaplı nanopartiküller ise 535 nm de absorban verirken lazer kaynağımız bunları da bu dalga boyunda rezonansa getirebilir fakat çekirdekte bulunan manyetik partikülleri bu rezonansı sönmeye uğrattığından daha az delta değişimi gerçekleştirdiği düşünülmektedir. Ayrıca altın nanoçubuklardaki delta değişiminin de az olduğu görülmüştür. Bu da kullandığımız lazer kaynağının sadece radyal dalga boyunda rezonans oluşturabilirken aksenel yöndeki dalga boyunda oluşturamamaktadır. Aksenel yöndeki absorban dalga boyu 600-800 nm dalga boyunda olduğu için ve altın nanoçubukların cam yüzeyine yatay yerleştiği için kullandığımız lazer kaynağı bunları rezonansa getirmek için uygun dalga boyunda değildir.

6.KAYNAKLAR

- Afshar, R., Gold nanorods: Synthesis and self assembly, Master Project, (2007).
- Alekseeva, A.V., Bogatyrev V.A., Dykman L.A., Applied Optics 44, (2005) 6285-95.
- Ambrosi A., Castaneda M.T., Killard A.J., Smyth M.R., Alegret S., Merkoci A., Anal. Chem. 79 (2007) 5232.
- Arwin, H. İn: Baskin, A., Norde W., Eds., Physical Chemistry of Biological Interfaces, Marcel Dekker, New York, (2000), 577.
- Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J., Whyman R., J. Chem. Soc., Chem.Comm. (1994) 801.
- Burda C., Chen X., Narayanan R., El-Sayed M.A., Chem. Rev. 105 (2005) 1025.
- Chen C.-D., Cheng S.-F., Chau L.-K., Wang C.R.C., Biosensors and Bioelectronics 22 (2007) 926-932.
- Chen P. C., Mwakwari S. C., Oyelere A. K., Nanotechnology, Science and applications, (2008), I 45-66.
- Cui Y., Wang Y., Hui W., Zhang Z., Xin X., Chen C., Biomedical Microdevices 7:2, (2005) 153–156.
- Çağlayan, M.O, 2009,Biyomoleküler Tanı Sistemleri için Taşınabilir, Gerçek Zamanlı ve Etiketsiz Biyosensör Geliştirilmesi ve Karakterizasyonu, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Daniel M.C., Astruc D., Chem. Review, (2004) 104 (1), 293-346.
- Demirel, G., Caglayan, M.O., Garipcan, B., Pişkin, E., Surface Science 602 (2008) 952–959.
- Dickson, R.M., Lyon, L.A., J.Phys.Chem. B, (2000), 104,6095.
- Dong X.C., Lau C.M., Lohani A., Mhaisalkar S.G., Kasim J., Shen Z.X., Ho X.N., Rogers J.A., Li L.J., Adv. Mater. 20 (2008) 2389.

- Dong S., Wang Y., Li D., Ren W., Liu Z., Wang E., Chem. Commun. (2008) 2520.
- Duman, M., 2007, Patojenik Mikroorganizmaların Tayini için SPR Esaslı DNA-Çip Tasarımı ve Uygulaması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Durr N.J., Larson, T., Smith D.K., Nano Letters 7 (2007) 941-5.
- Elghanian R., Storhoff J.J., Mucic R. C., Letsinger R. L., Mirkin C. A., Science (1997), 227, 5329, 1078-1081.
- Englebienne P.,Analyst (1998) 123, 7, 1599-1603.
- Englebienne, P.; Van Hoonacker, A.; Valsamis, J. Clin. Chem., (2000), 46, 2000-2003.
- Fan C., Zhang J., Song S., Wang L., Pan D., Nat. Protoc., 2 (2007) 2888.
- Frens G., Nature 241, (1973), 20.
- Gao, J., Bender, C.M., Murphy, C., Langmuir, (2003), 19, 9065-9070.
- Garipcan, B., 2008, Elipsometre Temelli Oligonükleotid ve Oligopeptid Problemleri Taşıyan Tekli ve Çoklu Sensör Yüzeylerinin Hazırlanması, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Glökler, J., Angenendt, P., Journal of Chromatography B, (2003), 797: 229-240.
- Gole, A., Murphy, C., Chem. Mater., 16, (2004), 3363-3640.
- Goon I. Y., Leon M., Lai H., Lim M., Munroe P., Gooding J. J., Amal P., Fabrication and dispersion of gold-shell protected Magnetic Nanoparticles: systematic control using polyethyleneimine, Chemistry of Materials, (2009), vol21.
- Haes A.J., Chang L., Klein W.L., Van Duyne R.V., J. Am. Chem. Soc. 127 (2005) 2264-2271.
- Haes A.J., Stuart D.A., Nie S., Van Duyne R.V., Journal of Fluorescence, Vol. 14. No.4 (2004) 355-367.

- Huang, H., He, C., Zeng, Y., Xia, X., Yu, X., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 317 (2008) 56–61.
- Herne, T.M. and Tarlov, M.J., J. Am. Chem. Soc., 119, (1997), 8916-8920.
- Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed, M.A., Nano Letters 7, (2007) 1591.
- Huang H., Tang C., Zeng Y., Yu X., Liao Bo., Xia X., Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 68 (1), (2009), 83-87.
- Huang X., El-Sayed I.H., Qian W., El-Sayed M.A., Journal of the American Chemical Society 128, (2006), 2115-20.
- Huff T.B., Tong L., Zhao Y., Nanomedicine 2, (2007) 125-32.
- Hussain I., Graham S., Wang Z.X., Tan B., Sherrington D.C., Rannard S.P., Cooper A.I., Brust M., J. Am. Chem. Soc. 127, (2005), 16398.
- Imura, K., Nagahara, T., Okamoto, H., J. Am. Chem. Soc., (2004), 126, 12730.
- Jafari T., Simchi A., Khakpash N., Journal of Colloid and Interface Science 345, (2010) 64–71.
- Jana N.R., Gearheart C. J., Murphy C.J., Chem. Mater. 13, (2001), 2313.
- Jana R.N., Small, 1, (2005), 875-882.
- Jecklin M. C., Schauer S., Dumelinc C. E., Zenob R., J. Molecular. Recognition. (2009); 22: 319–329.
- Jeong J., Hwan Ha T., Chung B. H., Analytica Chimica Acta 569, (2006), 203–209.
- Jiang, T., Minunni, M., Wilson, P, Zhang,J., Turner, A.P.F., Mascini, M., Biosensors and Bioelectronics, (2005), 20:1939-1945.
- Jiang, X.C., Brioude A., Pileni, M.P., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 277 (2006), 201-206.
- Jiang, X.C., Pileni, M.P., Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 295, (2007), 228-232.

Jin, R.; Wu, G.; Li, Z.; Mirkin, C. A.; Schatz, G. C. *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, 1643-1654.

Kim, C.K., Kalluru, R.R., Singh, J.P., Fortner, A., Griffin, J., Darbha, G.K., Ray, P.C., *Nanotechnology* 17 (2006), 3085-3093.

Kim, K., Huang S.-W., Ashkenaz, S., *Applied Physics Letters* 90, (2007) DOI: 10.1063/1.2743752.

Kneipp J., Kneipp H., McLaughlin M., Brown D., Kneipp K., *Nano. Lett.* 6 (2006) 2225.

Kneipp J., Kneipp H., Rice W.L., Kneipp K., *Anal. Chem.* 77 (2005) 2381.

Kretschmann, E., *Z. Phys.* 241 (1971), p. 313.

Lee, S.; Perez-Luna, H. *Anal. Chem.* (2005), 77, 7204-7211.

Li, C., Male, K. B., Hrapovic S., Luong H.T., *Chem. Commun.*, (2005), 3924-3926.

Li, D., He, Q., Cui, Y., Duan, Li., Li, J., *Biochemical and Biophysical Research Communications* 355, (2007), 488–493.

Li, P.-C., Wei C.-W., Liao C.-K., *IEEE: Transactions on Ultrasonics Ferroelectrics and Frequency Control* 54, (2007) 1642-7.

Liao H., Hafner J. H., *Chem. Matter.*, (2005), 17, 4636-4641.

Lin P.L., Huang L.S., Lin C. W., Lee C., Chen J., Hsu S., Lin S., *Current Drug Targets - Immune, Endocrine & Metabolic Disorders*, (2005), 5, 61-72.

Liu H. L., Sonn C. H., Wu J. H., Lee K.M., Y. K. Kim, *Biomaterials* 29, (2008) 4003–4011.

Liu J., Lu Y., *J. Am. Chem. Soc.* 129, (2007), 8634.

Liu, Z.L., Liu, Y.J., Yao, K.L., Ding, Z.H., Tao, J., Wang, X., 2002, Synthesis and magnetic properties of Fe₃O₄ nanoparticles, *Journal of Materials Synthesis Processing*, 10, 83-87.

- Lu Q.H., Yao K.L., Xi D., Liu Z.L., Luo X.P., Ning Q., *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* 301, (2006), 44–49.
- Maier I., Morgan M.R.A., Lindner W., Pittner F., *Anal. Chem.* 80, (2008), 2694.
- Mandal M., Kundu S., Ghosh S. K., Panigrahi S., Sau T. K., Yusuf S.M., Pal T., *Journal of Colloid and Interface Science* 286, (2005), 187–194.
- Manneli, I., Minunni, M., Tombelli, S., Wang, R., Spiriti, M.M., Mascini, M., (2005), *Bioelectrochemistry* 66:129-138.
- Martin C.R., *Chem. Mater.* 8, (1996), 852.
- Megan E. P., Jessica B. M. and Aliasger K. Salem, *Pharmaceutical Research*, vol 24, no:12, (2007), 2335-2351.
- Mirkin C.A., Hill H.D., Vega R.A., *Anal. Chem.* 79, (2007), 9218.
- Mirkin C.A., Letsinger R.L., Mucic R.C., Storhoff J.J., *Nature* 382, (1996), 607.
- Mirkin C.A., Xu X., Han M.S., *Angew. Chem. Int. Ed.* 46, (2007), 3468.
- Mirkin, C. A.; Elghanian, R.; Storhoff, J. J.; Mucic, R. C.; Letsinger, R. L., *Science* (1997), 277, 1078-1081.
- Mohamed, M.B., Volkov, V., Link, S., El-Sayed, *Chem. Phys. Lett.*, (2000), 317,517.
- Murphy C.J., Busbee B.D., Obare S. O., *Adv. Mater.* 15, (2003), 414.
- Murphy C.J., Gole A.M., Stone J.W., Sisco P.N., Alkiany A.M., Goldsmith E.C., Baxter S.C., *Acc. Chem. Res.* 41, (2008), 1721.
- Murphy C.J., Jana N.R., Gearheart C. J., *J. Phys. Chem. B* 105, (2001), 4065.
- Murphy C.J., Jana N.R., Gearheart C. J., *Langmuir* 17, (2001), 6782.
- Myroshnychenko V., Rodríguez-Fernández J., Pastoriza-Santos I., Funston A.M., Novo C., Mulvaney P., Liz-Marzán L.M., García de Abajo F.J., *Chem. Soc. Rev.* 37, (2008).

Nanofilm Surface Analysis, Application Note. www.nanofilm.de.

Natan M.J., Brown K.R., Langmuir 14, (1998) 726.

Nath N., Chilkoti A., Anal. Chem., (2004) 76, 5370-5378.

Nghiem, T.H.L., La, T. H., Vu, X. H., Chu V. H., Nguyen, T. H., Le, Q. H., Fort E., Do, Q. H., and Tran, H. N., Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol. 1, (2010), 025009.

Niazov T., Pavlov V., Xiao Y., Gill R., Willner I., Nano. Lett. 4, (2004), 1683.

Nicewarner-Pena, S.R., Carado, A.J., Shale, K.E., Shale and Keating, C.D., J.Phys.Chem.B, (2003), 107,7360.

Nidhi, N., Ashutosh, C., Anal. Chem., (2004), 76, 5370-5378.

Nikoobakht B., El Sayed M.A., Chem. Matter., 15, (2003), 1957-1962.

Oyelere, A.K., Chen, P.C., Huang, X., El-Sayed, I, H., , El-Sayed, M.A., Bioconjugate Chem. (2007), 18, 1490-1497.

Otto, A ., Phys.Stat.Sol., (1968), 26: K99-K101.

Pan B., Cui D., Xu P., Li Q., Huang T., He R., Gao F., Colloid and surfaces A: Pysicochem. Eng. Aspects 295, (2007), 217-222.

Perez-Juste J., Pastoriza S. I., Liz-Marzan L.M., Mulvaney P., Coordination Chemistry Reviews 249, (2005), 1870-1901.

Perez-Juste J., Liz-Marzan L.M., Carnie S., Chan D.Y.C., Mulvaney P., Adv. Func. Matter. 14, (2004), 571-579.

Perez-Juste, J., Correa-Duarte, M.A., Liz-Marzan, L.M., Appl. Surf. Sci. 226, (2004), 137.

Perez-Juste, J., Pastoriza-Santos, I., Liz-Marzan, L.M., Mulvaney, P., Coordination Chemistry Reviews 249, (2005), 1870-1901.

- Peterlinz, K.A., Georgiadis, R., Herne, T.M., Tarlov, M.J., J. Am. Chem. Soc., (1997),119, 3401-3402.
- Pham, T. T., Cao, C., Sim, S.J., Journal of Magnetism and Magnetic Materials, (2008), vol. 320, no. 15, 2049–2055.
- Pissuwan D., Valenzuela S.M., Killingsworth M.C., Xu X., Cortie M.B., Journal of Nanoparticle Research 9, (2007) 1109-24.
- Pissuwan D., Valenzuela S.M., Cortie M. B., Biotechnology and Genetic Engineering Reviews - Vol. 25, (2008) 93-112.
- Pita M., Abad J. M., Vaz-Dominguez C., Briones C., Mateo-Martí E., Martín-Gago J., Morales M.P., Fernández V.M., Journal of Colloid and Interface Science 321, (2008), 484–492.
- Pradhan A., Jones R. C., Caruntu D., J. O'Connor C., Tarr M.A., Ultrasonics Sonochemistry 15, (2008), 891–897.
- Roll D., Malicka J., Gryczynski I., Gryczynski Z., Lakowicz J.R., Anal. Chem. 75 (14), (2003), 3440-3445.
- Russell D.A., Schofield C.L., Field R.A., Anal. Chem. 79, (2007), 1356.
- Salem, A.K., Searson, P.C., Leong K.W., Nature Materials 2, (2003), 668-71.
- Sayar, F., 2004, Mikroemülsiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle Mma/Aac/Peg-Ma Esaslı Manyetik Nanopartiküllerin Üretimi, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Sharma V., Park K., Srinivasarao M., Materials Science and Engineering R 65, (2009),1-38.
- Silva I. E., Vilas-Vilela J.L., López-Quintela M.A., Rivas J., Rodríguez M., León L.M., Journal of Non-Crystalline Solids 356 (2010) 1233–1235.
- Singer J.M., Plotz C.M., Am. J. Med 21 (1956) 888-896.

- Storhoff J.J., Elghanian R., Mucic R. C., Mirkin C. A., Letsinger R. L., J. Am. Chem. Soc., (1998) 120, 9, 1959-1964.
- Sun H., Zhu X., Zhang L., Zhang Y., Wang D., Materials Science and Engineering C 30, (2010), 311–315.
- Tan W., Medley C.D., Smith J.E., Tang Z., Wu Y., Bamrungsap S., Anal. Chem. 80, (2008), 1067.
- Taton T.A., Mirkin C.A., Letsinger R.L., Science ,(2000), 289, 1757-1760.
- Torigoe, K., Esumi, K., Langmuir 8, (1992), 59-63.
- Turkevich J., Stevenson P.C., Hillier J., Faraday Soc. 11, (1951), 55.
- Varnavski, O.P., Mohamed, M.B., El-Sayed, M.A., Goodson, T., III, J. Phys.Chem.B, (2003),107, 3101.
- Wang C., Irudayaraj J., Small (2008), No.4, 2204-2208. DOI: 10.1002/sml.200800309.
- Wang C.R.C., Chang S. S., Shih C.-W., Chen C.-D., Lai W.-C., Langmuir 15, (1999), 701.
- Wang F.H., Lee I.H., Holmström N., Yoshitake T., Kim D.K., Muhammed M., Frisen J., Olson L., Spenger C. and Kehr J., Nanotechnology 17, (2006), 1911–1915.
- Wang H., Brandl D.W., Le F., Nordlander P., Halas N.J., Nano Letters, (2006), Vol. 6, No. 4, 827-832.
- Wang J., Zhou H.S., Anal. Chem. 80, (2008), 7174.
- Wang Z., Ma L., Coordination Chemistry Reviews 253, (2009), 1607–1618.
- Wang, J. And Bard, A., J. Anal. Chem. 73, (2001), 2207.
- Wang, R., Minunni, Tombelli, S., Mascini, M., (2004b), Biosensors and Bioelectronics, 20:598-605.

- Wang, R., Tombelli, S., Minunni, M., Spiriti, M.M., Mascini, M., (2004a), *Biosensors and Bioelectronics*, 20:967-974.
- Willner I., Yan Y.M., Tel-Vered R., Yehezkeli O., Cheglakov Z., *Adv. Mater.* 20, (2008), 2365.
- Wu, H., Huang, W., Huang, M., *Crystal Growth and Design*, (2007), vol.7, No.4, 831-835.
- Yamada S., Nishioka K., Kawasaki H., *Chem. Commun.*, (2003), 2376.
- Yang P., Kim F., Song J.H., *J. Am. Chem. Soc.*, 124, (2002), 14316.
- Yonzon C.R., Jeoung E., Zou S., Schatz G.C., Mirksich M., Van Duyne R.V, *J. Am. Chem. Soc.*, 126, (2004), 12669-12676.
- Yu, C., Irudayaraj, J., *Analytical Chemistry*, (2006), A-H.
- Zhao J., Zhang X., Yonzon C. R., Haes A. J., Van Duyne R.V., *Nanomedicine*, (2006),1, (2), 219-228.
- Zhu, J., Wang, Y.C., Yan, S. N., *Chin. Phys. Lett.*, (2004), 21, 559.
- Zijlstra P., Bullen C., Chon J. W.M., Gu M., *J. Phys. Chem. B*, (2006), 110, 19315-19318.

EKLER

EK-1 Oligonükleotitlerin Altın Nanopartikül Yüzeyine Bağlanma Kinetiğinin İncelenmesi

Tez kapsamında SPR destekli elipsometre çalışmaları sonucu elde edilen veriler kullanılarak altın nanopartiküllerin yüzeyine bağlanan oligonükleotitlerin bağlanma katsayısını belirlemek için kinetik çalışmalar da yapılmıştır. Küresel altın nanopartiküller reseptör GOR prob oligonükleotiti ligand olarak düşünüldüğünde GOR prob oligonükleotitin yüzeye bağlanma kinetiği incelenmiştir.

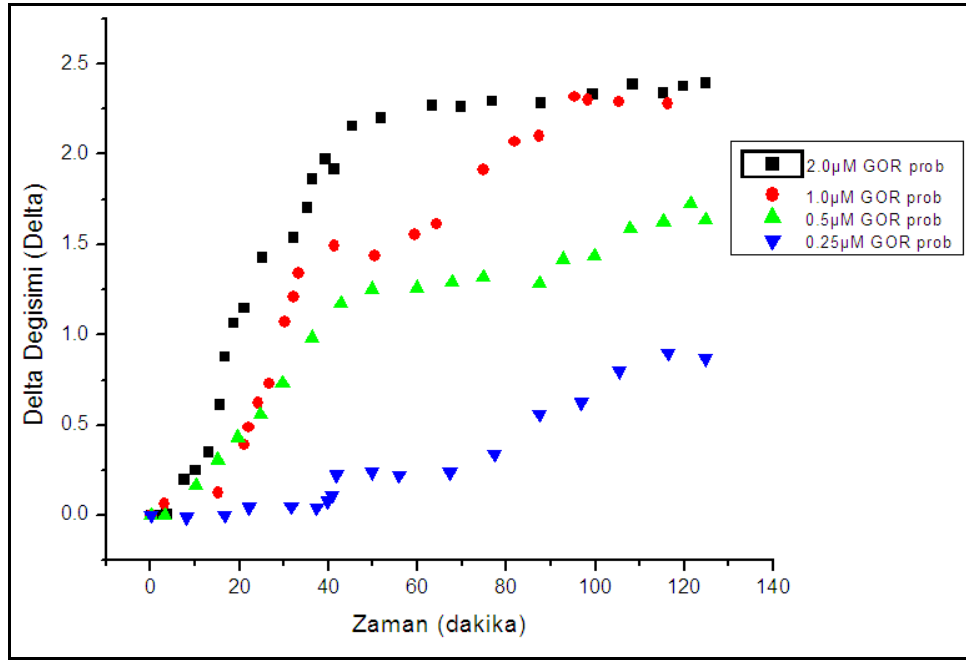
Zamana karşı delta değişim değerleri kullanılarak 4.1 ve 4.2 eşitlikleri kullanılarak yüzeye bağlanma hız sabiti (K_{on} , association rate constant), yüzeyden ayrılma hız sabiti (K_{off} , dissociation rate constant) ve bağlanma katsayısı (K_D) değerleri hesaplanmıştır. Bu hesaplamalar tez kapsamı boyunca kullandığımız SPR cihazının software kitapçığında yer alan kinetik bağlanma çalışmasında verilmiş 4.1 ve 4.2. eşitlikleri kendi sistemimize uyarlanarak Origin 8.0 programı kullanılarak yapılmıştır.

$$\Delta f(t) = \Delta f_{equ} \left(1 - \exp\left(-\frac{t}{\tau}\right) \right) + a \cdot t \quad \dots\dots\dots(4.1)$$

$$\frac{1}{\tau} = k_{on} c_{L,0} + k_{off} \quad \dots\dots\dots(4.2)$$

Küresel altın nanopartikül yüzeyine GOR prob oligonükleotiti bağlanma katsayısının (K_D) belirlenmesi:

Farklı GOR prob derişimde zamana karşı delta değişim grafiği origin sayfasında açılmıştır. Her bir GOR prob derişim eğrisi için “non-linear curve fit” yapılarak yo,A_1 ve t_1 değerleri elde edilmiştir.



Şekil 4.73. Küresel altın nanopartiküller yüzeyine farklı derişimdeki GOR prob oligonükleotitlerin bağlanmasına bağlı delta-zaman eğrisindeki değişim.

2.0 μM GOR prob derişimini için “non-linear curve fit” yapıldığında elde edilen veriler aşığıdaki gibidir.

NL Fit (ExpGro1) (8/5/2010 02:06:36)

+ Notes

+ Input Data

- Parameters

| | Value | Standard Error |
|------|-----------|----------------|
| y0 | 2.48428 | 0.07525 |
| B A1 | -2.81731 | 0.1021 |
| t1 | -28.18426 | 2.59907 |

Iterations Performed = 8

Total Iterations in Session = 8

Fit converged - tolerance criterion satisfied.

Some input data points are missing.

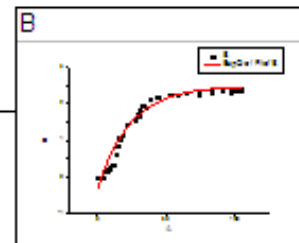
- Statistics

| | B |
|-------------------------|----------------|
| Number of Points | 27 |
| Degrees of Freedom | 24 |
| Reduced Chi-Sqr | 0.02605 |
| Residual Sum of Squares | 0.62511 |
| Adj. R-Square | 0.96691 |
| Fit Status | Succeeded(100) |

Fit Status Code :

100 : Fit converged

- Fitted Curves Plot



1.0 μM GOR prob derişimini için non-linear curve fit yapıldığında elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.

NL Fit (ExpGro1) (8/5/2010 02:07:36)

Notes

Input Data

Parameters

| | | Value | Standard Error |
|---|----|-----------|----------------|
| | y0 | 1.75479 | 0.09078 |
| D | A1 | -1.87451 | 0.0856 |
| | t1 | -47.30135 | 6.55684 |

Iterations Performed = 5

Total Iterations in Session = 5

Fit converged - tolerance criterion satisfied.

Some input data points are missing.

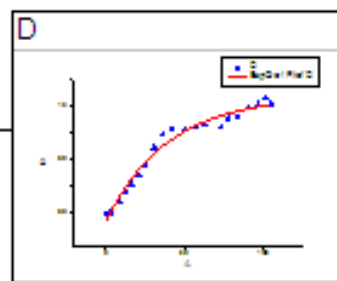
Statistics

| | D |
|-------------------------|----------------|
| Number of Points | 20 |
| Degrees of Freedom | 17 |
| Reduced Chi-Sqr | 0.00998 |
| Residual Sum of Squares | 0.1697 |
| Adj. R-Square | 0.96956 |
| Fit Status | Succeeded(100) |

Fit Status Code :

100 : Fit converged

Fitted Curves Plot



0.5 μM GOR prob derişimini için non-linear curve fit yapıldığında elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.

NL Fit (ExpGro1) (8/5/2010 02:07:20)

Notes

Input Data

Parameters

| | | Value | Standard Error |
|---|----|-----------|----------------|
| | y0 | 3.03228 | 0.38517 |
| C | A1 | -3.2132 | 0.32938 |
| | t1 | -70.53273 | 17.18585 |

Iterations Performed = 5

Total Iterations in Session = 5

Fit converged - tolerance criterion satisfied.

Some input data points are missing.

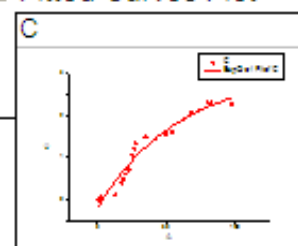
Statistics

| | C |
|-------------------------|----------------|
| Number of Points | 21 |
| Degrees of Freedom | 18 |
| Reduced Chi-Sqr | 0.03105 |
| Residual Sum of Squares | 0.55894 |
| Adj. R-Square | 0.95122 |
| Fit Status | Succeeded(100) |

Fit Status Code :

100 : Fit converged

Fitted Curves Plot



0.25 μM GOR prob derişimini için non-linear curve fit yapıldığında elde edilen veriler aşağıdaki gibidir.

NL Fit (ExpGro1) (8/5/2010 02:07:51)

Notes

Input Data

Parameters

| | Value | Standard Error |
|------|----------|----------------|
| y0 | -0.38063 | 0.19939 |
| E A1 | 0.3239 | 0.16913 |
| t1 | 87.29983 | 24.28154 |

Iterations Performed = 12

Total Iterations in Session = 12

Fit converged - tolerance criterion satisfied.

Some input data points are missing.

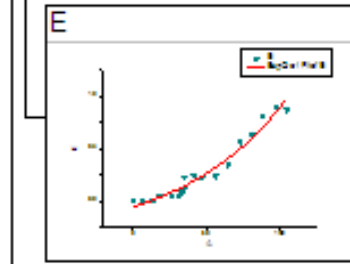
Statistics

| | E |
|-------------------------|----------------|
| Number of Points | 18 |
| Degrees of Freedom | 15 |
| Reduced Chi-Sqr | 0.00404 |
| Residual Sum of Squares | 0.06056 |
| Adj. R-Square | 0.95909 |
| Fit Status | Succeeded(100) |

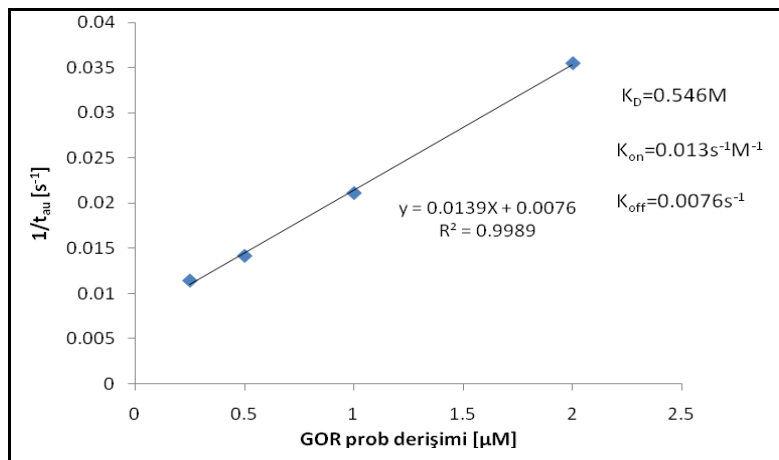
Fit Status Code :

100 : Fit converged

Fitted Curves Plot



t_1 değeri ζ değerine eşittir. Her bir GOR prob derişimi için bu şekilde ζ değeri belirlenmiştir. GOR prob derişimine karşı $1/\zeta$ grafiğı çizilerek K_{on} ve K_{off} değerleri belirlenerek $K_{on}/K_{off} = K_D$ değeri hesaplanmıştır.



Şekil 4.75. GOR prob oligonükleotitinin küresel altın nanopartikül yüzeyine bağlanma kinetiğı.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Filiz Sayar

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Yılı : 1979

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dil : İngilizce

EĞİTİM VE AKADEMİK DURUMU

Lise : 1993-1997, Fatih Sultan Mehmet Süper Lisesi, ANKARA.

Lisans : 1997-2001, Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, ANKARA.

Yüksek Lisans : 2001-2004, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, ANKARA.

Doktora : 2004-2010, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyümühendislik Ana Bilim Dalı, ANKARA.

İŞ DURUMU

2001-2009: Araştırma Görevlisi, Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Biyomühendislik Ana Bilim Dalı, ANKARA.

ARAŞTIRMA KONULARI

Metallik ve Polimerik Nanopartiküllerin Sentezi, Karakterizasyonu ve Kimyasal Modifikasyonu; Biyolojik Moleküllerin Polimerlere Bağlanmaları; Polimer-Biyomolekül Konjugatlarının Biyomühendislik Uygulamaları.

TEZLER

1. Mikroemülsiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle MMA/AAc/PEG-MA Esaslı Manyetik Nanopartiküllerin Üretimi (Yüksek Lisans).
2. Nanopartiküllerin Üretimi ve Nanotıp Uygulamaları (Doktora).

ULUSLAR ARASI DERGİLERDE YAYINLANMIŞ MAKALALAR

1. **F. Sayar**, G. Güven, E. Pişkin, 2006, "Magnetically Loaded Poly(Methyl Methacrylate-co-Acrylic Acid) Nanoparticles", Colloid and Polymer Science, 284, 965-978.
2. A. Erdem, **F. Sayar**, H. Karadeniz, G. Guven, M. Ozsoz, E. Pişkin, 2007, "Development of Streptavidin Carrying Magnetic Nanoparticles And Their Applications in Electrochemical Nucleic Acid Sensor Systems", Electroanalysis, volume 19, issue7-8, 798-804.
3. S. Odabaş, **F. Sayar**, G. Guven, G. Y. Demirel, E. Pişkin, 2008, "Separation of mesenchymal stem cells with magnetic nanosorbents carrying CD105 and CD73 antibodies in flow-through and batch systems", Journal of Chromatography B, 861, 74–80.
4. M.O. Çağlayan, G. Demirel, **F. Sayar**, B. Otman, B. Çelen, E. Pişkin, "Stepwise Formation Approach to Improve Elipsometric Response", Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine, Volume 5, Issue 2, 152-161, (2009).
5. G. Utkan, **F. Sayar**, P. Batat, S. İde, M. Kriechbaumd, E. Pişkin, "Synthesis and characterization of nanomagnetite particles and their polymer coated forms", Journal of Colloid and Interface Science 353 (2011) 372–379.