

**YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ
TEKNİĞİ KULLANILARAK HEDEF DNA DİZİ TAYİNİ**

**DETECTION OF TARGET DNA SEQUENCE BY USING
SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY
TECHNIQUE**

MEHMET ŞÖFÖROĞLU

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
GIDA Mühendisliği Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2013

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bu çalışma jürimiz tarafından **GIDA MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI 'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Başkan :.....
Prof. Dr. Mehmet Mutlu

Üye (Danışman) :.....
Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

Üye :.....
Prof. Dr. Nihal Aydoğan

Üye :.....
Doç. Dr. Uğur Tamer

Üye :.....
Doç. Dr. Ali Topcu

ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından/...../..... tarihinde uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulunca/...../..... tarihinde kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Fatma Sevin Düz
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ TEKNİĞİ KULLANILARAK HEDEF DNA DİZİ TAYİNİ

Mehmet ŞÖFÖROĞLU

ÖZ

Bu çalışma kapsamında yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) tekniği kullanılarak hassas deoksiribonükleik asit (DNA) biyosensörü geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla farklı özelliklere sahip iki manyetik partikül (Altın kaplı manyetik küre ve silika kaplı 3-aminopropiltrioksilan (APTS) modifiyeli manyetik nanopartikül) kullanılmıştır. Bunların yanında, YGRS etiketi olan 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoik asit) (DTNB) ile kaplanarak YGRS aktif hal getirilen ve bu sayede hedef dizilim varlığının saptanmasına olanak sağlayan altın nanoçubuklar kullanılmıştır. Çalışmada ilk adım olarak kullanılacak tüm partiküllerin yüzey modifikasyonlarını en düzgün şekilde yapabilmek ve ardından kurgulanan sistemden en iyi şekilde yararlanabilmek adına deney basamaklarındaki parametrelerin optimizasyonu yapılmıştır. Ardından genetik modifiye organizmaların (GMO) hızlı, seçici ve hassas bir şekilde analiz edilebilmesi amacıyla 'sandviç analizi' olarak bilinen sistem uygulanmıştır. Bu sisteme göre hedef dizilime spesifik problemlerle modifiye edilmiş manyetik partikül, hedef dizilimin ortamdaki seçici olarak ayırımına olanak sağlarken; DTNB ile kaplanmış altın nanoçubuklar ise DTNB molekülüne ait olan simetrik NO₂ gerilmesine ait bant üzerinden gidilerek hedef dizilimin tayinine olanak sağlamaktadır. GMO analizine yönelik geliştirilen sisteme ait oluşturulan kalibrasyon eğrisinde 50-1000 nM aralığında çalışılmış ve elde edilen bant şiddetleri arasındaki R² değeri 0,955 olarak bulunmuştur.

Anahtar Kelimeler: YGRS, DTNB, Altın kaplı manyetik küre, Silika kaplı APTS modifiyeli manyetik nanopartikül, GMO

Danışman: Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI, Hacettepe Üniversitesi, Gıda Mühendisliği Bölümü

DETECTION OF TARGET DNA SEQUENCE BY USING SURFACE ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY TECHNIQUE

Mehmet ŞÖFÖROĞLU

ABSTRACT

Within the scope of this study, development of a sensitive deoxyribonucleic acid (DNA) biosensor by using surface enhance Raman spectroscopy (SERS) technique was studied. For this purpose two kinds of magnetic nanoparticles (Gold coated magnetic sphere and silica coated 3-aminopropyltriethoxysilane (APTS) modified magnetic nanoparticle) were used. Besides all these, gold nanorods which were become SERS active by coating with one of the SERS label molecule 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoic acid) (DTNB) and thus enables the detection of target sequences were used. In the first step of the study, all of the parameters in each step were optimized to ensure proper surface modifications for the nanoparticles and get the most out of the edited system. After that a system that is called 'sandwich assay' was applied for rapid, selective and sensitive detection of genetic modified organisms (GMO). According to the system magnetic particles coated with target specific probes were enabled selective separation of the target sequence from the media and DTNB coated nanorods made it possible to detect target sequence by following the symmetric NO_2 stretching band that incident to DTNB molecule. To obtain calibration curve from the system that developed for GMO analysis, it was studied between 50-1000 nM target sequence molarities and R^2 between the band intensities was 0,955.

Keywords: SERS, DTNB, gold coated magnetic sphere, silica coated APTS modified magnetic nanoparticle, GMO

Advisor: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı, Hacettepe University, Department of Food Engineering

TEŞEKKÜR

Tezım sırasında bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarıma yön veren, maddi ve manevi her türlü desteği sağlayarak verimli bir çalışma ortamı yaratan, değerli hocam ve tez danışmanım Sayın Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Çalışma kapsamında kullanılan nanopartiküllerin sentezi ve karakterizasyonu konularında yardımlarından dolayı değerli hocam Sayın Doç. Dr. Uğur TAMER, Araç. Gör. Akif Göktuğ Bozkurt, Kimyager Aykut ÖNAY, Uzm. Kimyager Adem ZENGİN'e

Her türlü desteklerinden ötürü Dr. Ceyda DUDAK ŞEKER, Dr. Deniz BAŞ, Dr. Esra ACAR SOYKURT, Arş. Gör. Burcu GÜVEN, yüksek mühendis Özlem TORUN, Arş. Gör. Nazife Nur YAZĖAN, Arş. Gör. Tuğba BULAT, Gıda Müh. Havva Tümay TEMİZ ve burada isimlerini tek tek sıralayamadığım araştırma grubumuza ve H.Ü. Gıda Mühendisliği Bölümü'ne,

Çalışmalarım boyunca manevi destekleriyle hep yanımda olan özel insanlar Diğdem YOĞUNALI, Kadri ŐENER, yengelerim Yonca ŞÖFÖROĞLU, Sinem ŞÖFÖROĞLU, teyzem Meral İNAN ve eniştem Cemal İNAN'a,

Hayatım boyunca maddi ve manevi konularda bana en iyi Şekilde destek veren, bugünlere gelebilmemde çok büyük emekleri olan değerli ailem; babam Suat ŞÖFÖROĞLU, annem Nural ŞÖFÖROĞLU, abilerim Burak ŞÖFÖROĞLU ve Bora ŞÖFÖROĞLU'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

	<u>Sayfa</u>
ÖZ	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Raman Spektroskopisi	3
2.1.1 Raman spektroskopisinin bileşenleri	8
2.2. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi	10
2.2.1. YGRS substratları	12
2.2.2. Raman etiketleri ve çoklu analizler	13
2.3. Nanopartiküller	14
2.3.1. Nanopartiküllerin genel özellikleri.....	16
2.3.2. Nanobiyosensörler	17
2.3.3. Biyosensör uygulamalarında kullanılan nanopartiküller üzerine biyomoleküllerin immobilizasyon stratejileri.....	18
2.4. Deoksiribonükleik Asit'in Genel Özelliği.....	18
2.4.1. DNA yapısını etkileyen faktörler	19
2.4.2. DNA biyosensörleri	20
2.5. Genetik Modifiye Organizmalar	21
2.5.1. Genetik modifiye organizmaların protein temelli analiz yöntemleri.....	22

2.5.2. Genetik modifiye organizmaların DNA temelli analiz yöntemleri	23
3. MATERYAL VE METOT	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kimyasal ve biyokimyasal materyaller.....	25
3.1.2. Oligonükleotit dizilimleri.....	25
3.1.3. Tampon çözeltiler	25
3.1.4. Ölçüm sistemleri.....	26
3.2. Metot	26
3.2.1. Tampon çözeltilerinin hazırlanması	26
3.2.2. Nanopartiküllerin sentezi	27
3.2.2.1. Demir nanopartiküllerin sentezlenmesi	27
3.2.2.2. Altın kaplı Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerin sentezlenmesi	28
3.2.2.3. Altın nanoçubukların sentezi	28
3.2.2.4. Silika kaplanmış APTS modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllerin sentezi	29
3.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu	29
3.2.4. DNA tayinine yönelik analiz yönteminin geliştirilmesi	30
3.2.4.1. Optimizasyon çalışmaları	30
3.2.4.2. Nanopartiküllerin yüzeyine kendiliğinden düzenlenen tabakanın oluşturulması	31
3.2.4.3. Yüzeyde oluşturulan grupların aktivasyonu	32
3.2.4.4. Probların nanopartiküller üzerine immobilizasyonu	32
3.2.4.5. Nanopartiküllerin üzerinde açıkta kalan aktif grupların blokasyonu ...	33
3.2.4.6. Ortamdaki hedef molekülün nanopartiküllerle yakalanması ve sandviç yapının oluşturulması.....	33
3.2.4.7. Sandviç yapı oluşturularak yakalanan hedef dizilimlerin YGRS ölçümleri	34

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA	36
4.1. APTS Modifiyeli Manyetik Nanopartiküller İle İlgili Yapılan Optimizasyonlar ..	36
4.2. Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül ve Altın Nanoçubuk Partiküllerin Karakterizasyonu.....	39
4.3. Altın Kaplı Manyetik Küre ile İlgili Yapılan Optimizasyon Çalışmaları.....	41
4.4. Altın Nanoçubuklar ile İlgili Yapılan Optimizasyon Çalışmaları.....	43
4.5. Farklı Yapılara Sahip Nanopartiküller Kullanılarak Hedef Dizilim Tayini.....	48
4.5.1. Optimizasyon çalışmaları	48
4.5.2 Blokasyon ajanları kullanılarak ve yıkama prosedürü uygulanarak spesifik olmayan bağlanmaların minimize edilmesi.....	50
4.5.3. Optimize edilen verilerle sistemin uygulanabilirliğinin kontrolü	52
4.5.4. Sandviç yapı oluşturulurken sıcaklığın ve sandviç yapı oluşturma basamağının sistem üzerine etkisi	54
4.5.5. YGRS kullanılarak hedef dizilim tayini.....	55
5. TARTIŞMA VE YORUM	58
KAYNAKLAR	60
ÖZGEÇMİŞ	66

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 2.1. a) Raman etkisi: UV, görünür bölge ve yakın kızılötesi uyarma stratejileri. b) Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması.	4
Şekil 2.2. a) CO ₂ molekülüne ait dipol moment ve polarlanabilirlik değişimi b) proteinlerin alifatik gruplarının titreşim şekilleri.	6
Şekil 2.2.(devamı) a) CO ₂ molekülüne ait dipol moment ve polarlanabilirlik değişimi b) proteinlerin alifatik gruplarının titreşim şekilleri.	7
Şekil 2.3. Raman spektroskopisinin bileşenleri.....	10
Şekil 2.4. Biyoanaliz uygulamalarında nanopartiküllerin kullanım şekilleri: a) DNA sandviç yapı tayininde etiket olarak; b) çoklu analizde, hedef moleküle eşlenik yapıya sahip substrat olarak; c) DNA problemleri sayesinde nanopartiküllerin bir araya gelmeleri ve agregat oluşturmaları (sinyal transdüksiyonunu artırıcı); d) üstteki gösterimde au nanopartikül ile etiketlenmiş DNA diziliminin sıcaklık uygulamasıyla selektif olarak hibridize olmuş yapının ayrılması, alttakinde ise sadece belirli boyutlardaki altın nanopartiküllerin hücre içerisine girebileceği gösterilmektedir.	15
Şekil 2.5. DNA çift sarmal yapısı ve bazlar arası bağ yapısı.....	19
Şekil 3.1. 11-merkaptoundekanoik asit ve 5-5 ditiobismerkaptonitrobenzoik asit'in kimyasal yapısı.	32
Şekil 3.2. Hedef dizilimin tayini amacıyla nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından YGRS ölçümlerine kadar izlenen yöntemin akış şeması.....	34
Şekil 3.2.(devamı) Hedef dizilimin tayini amacıyla nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından YGRS ölçümlerine kadar izlenen yöntemin akış şeması.....	35
Şekil 4.1. a) Glutaraldehit aktivasyonuna tampon etkisi, b) BSA molekülü ile yüzey aktivasyonunun kontrolü, c) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül üzerine bağlanan prob miktarı, d) prob dizilimlerin % bağlanma oranları.....	38
Şekil 4.1.(devamı) a) Glutaraldehit aktivasyonuna tampon etkisi, b) BSA molekülü ile yüzey aktivasyonunun kontrolü, c) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül üzerine bağlanan prob miktarı, d) prob dizilimlerin % bağlanma oranları.....	39

Şekil 4.2. a) Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsü, b) Altın nanoçubukların TEM görüntüsü.....	40
Şekil 4.3. a) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve b) altın nanoçubukların UV görünür bölge spektrumları.....	40
Şekil 4.4. Farklı su-etanol karışımlarının SAM oluşumuna ve avidin bağlanmasına etkileri.	42
Şekil 4.5. a) Altın kaplı manyetik küre üzerine bağlanan prob 1 miktarları, b) % bağlanma oranları.....	43
Şekil 4.6. a) DTNB konsantrasyonunun bant şiddetine etkisi, b) farklı konsantrasyonlardaki altın nanoçubukların bant şiddetine etkisi, c) yüzeyde birden çok SAM oluşturulmasının bant şiddetine etkisi.....	44
Şekil 4.6.(devamı) a) DTNB konsantrasyonunun bant şiddetine etkisi, b) farklı konsantrasyonlardaki altın nanoçubukların bant şiddetine etkisi, c) yüzeyde birden çok SAM oluşturulmasının bant şiddetine etkisi.....	45
Şekil 4.7. Modifiye edilmiş altın nanoçubukların seyreltme yapılarak elde edilen Raman bant şiddetleri (a ve b).....	46
Şekil 4.8. a) Altın nanoçubukların üzerine immobilize olan prob 2 miktarı, b) Prob “2” dizilimlerinin % bağlanma verileri.....	47
Şekil 4.9. a) NaCl konsantrasyonunun hibridizasyona etkisi, b) sıcaklığın hibridizasyona etkisi, c) sürenin hibridizasyona etkisi.....	49
Şekil 4.9.(devamı) a) NaCl konsantrasyonunun hibridizasyona etkisi, b) sıcaklığın hibridizasyona etkisi, c) sürenin hibridizasyona etkisi.....	50
Şekil 4.10. a) APTS modifiyeli manyetik partikül ve altın nanoçubuğun kullanıldığı durumda blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmaya etkisi, b) Altın kaplı manyetik partikül ve altın nanoçubuğun kullanıldığı durumda blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmaya etkisi.....	51
Şekil 4.11.Yıkama prosedürünün spesifik olmayan bağlanma üzerine etkisi.....	52
Şekil 4.12. a) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı, b) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı.....	53
Şekil 4.12.(devamı) a) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı, b) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı.....	54

Şekil 4.13. a) Manyetik ve işaretçi nanopartiküllerin aynı anda ortama katılarak farklı sıcaklıklarda sandviç yapının oluşturulması, b) Hedef dizilimin önce manyetik partikül ile ortamdan alınıp işaretçi partikül ile işaretlenerek farklı sıcaklıklarda sandviç yapının oluşturulması.....55

Şekil 4.14. a) Yüzey ölçümlerine ait spektrumlar, b) Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlere ait bantlar, c) Yüzey ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.....56

Şekil 4.14.(devamı) a) Yüzey ölçümlerine ait spektrumlar, b) Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlere ait bantlar, c) Yüzey ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.....57

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

Çizelge 3.1. Oligonükleotit dizilimleri.....25

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

α	: Polarlanabilirlik
μ	: Dipol Momenti
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu
APTS	: 3-aminopropiltrietoksisilan
BT	: Biyoteknolojik Türetilmiş
CARS	: Eş Fazlı Anti-Stokes Raman Spektroskopisi
CHEM	: Kimyasal (Kısa menzilli)
DLS	: Dinamik Işık Saçıcı
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
DTNB	: 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoik asit)
ELISA	: Enzim bağlantılı İmmünosorbent Analizi
EM	: Elektromanyetik (Uzun Menzilli)
FDA	: Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi
FTIR	: Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GM	: Genetik Modifikasyon
GMO	: Genetik Modifiye Organizma
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
$h\nu_0$: Enerji Seviyesi
IR	: Kızılötesi Spektroskopisi
MES	: 2-morfolinoetanesulfonik Asit Monohidrat
NIR	: Yakın Kızılötesi Spektroskopisi

NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
NRS	: Normal Raman Spektroskopisi
PBS	: Fosfat Tamponlu Tuz
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	: Ribonükleik Asit
RRS	: Rezonans Raman Spektroskopisi
SAM	: Kendiliğinden Düzenlenen Tabaka
SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu
T_m	: Erime Noktası
TEM	: Geçişli Elektron Mikroskobu
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UV	: Ultraviyoleet
XPS	: X Işını fotoelektron Spektroskopisi
XRD	: X Işını Difraksiyon Spektroskopisi
YGRS	: Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

1. GİRİŞ

Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sırasında, saçılan ışığın çok az bir kısmının molekül ile etkileşmeye giren ışığın enerjisinden daha farklı enerjilerle saçıldığı elastik olmayan saçılmalar gerçekleşmektedir. Raman saçılması adı verilen bu tür saçılma olaylarının spektroskopik olarak incelenmesine ise Raman spektroskopisi adı verilmektedir [1]. Fotonların inelastik olarak saçılmaları moleküllerin soy metal, geçiş metali veya yarı iletken substratlar üzerine adsorbe olmasıyla 10^2 - 10^{14} kadar güçlendirilebilmekte ve bu duruma yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (YGRS) adı verilmektedir. YGRS tekniğinin fizik, kimya, eczacılık, yüzey bilimleri, nano-bilim ve biyomedikal alanlarında artan bir ilgiye sahip olması yanında, moleküllerin üç boyutlu yapı değişiklikleri ve yapısal farklılıklarının belirlenmesinde oldukça kullanışlı olduğu belirtilmektedir. Ayrıca YGRS tekniğinin yüksek hassasiyet, yüksek seçicilik ve floresana sönmüleme gibi özellikleri dolayısıyla çok etkili bir yöntem olduğu söylenmektedir [2].

Literatürde YGRS tekniğinin kullanıldığı çok geniş bir alan bulunmaktadır. DNA bazlarının [3], patlayıcıların [4], tedavi ajanlarının [5], kötü amaçlı kullanılan ilaçların [6], gıda katkı maddelerinin [7, 8] , hücre ve sporların [9] belirlenmesi YGRS tekniğinin kullanıldığı çalışmalara örnek olarak verilmektedir. Bunların yanında DNA tayini [10], bakteri tayini [11] ve gıda bulaşanlarının tayini [12] gibi konularda da YGRS tekniğinden yararlanılan çalışmalara rastlanmaktadır.

Nanoteknolojinin, biyomoleküllerin tespitinde kullanılması konusunda son yıllarda önemli adımlar atılmıştır. Bu yönde atılan adımlar üzerine katı destek materyali üzerinde ve çözelti içerisinde gerçekleştirilen biyolojik tanımlamalarda kullanılan optik, elektrokimyasal ve diğer birçok teknikteki gelişmeler eklendiği zaman hızlı, hassas, seçici ve pratik yöntemlerin geliştirilmesi üzerine büyük çaba sarfedildiği belirtilmektedir [13]. Mirkin et. al. tarafından gerçekleştirilen ve altın nanopartiküllerin optik özelliklerinin kullanılarak DNA analizinin gerçekleştirilmesi, optik tespit konusunda dönüm noktası olarak nitelendirilmektedir [14]. Daha sonra manyetik mikropatiküllerle beraber altın nanopartiküllerin de kullanıldığı ve ölçüm aşamasında gümüş zenginleştirmesinden de yararlanılan çalışmada 500 zM gibi oldukça düşük bir tespit limitine ulaşılması bu alanda kat edilen gelişmeyi desteklemektedir [15].

Altın ve gümüş nanopartiküllerin oldukça yüksek ışık saçılma kuvvetine sahip oldukları, aynı zamanda antijen ve DNA gibi biyomoleküllerin nanopartiküller üzerine bağlanmalarının optik özelliklerini etkilemediği belirtilmektedir [13]. Altın nanopartiküllerin Raman spektroskopisinde kullanımı, Raman boylarının metalik nanopartiküller üzerine adsorplanarak güçlendirilmiş saçılma gerçekleşmesi (YGRS) ve Raman boylarının dar spektral özellikleri sayesinde çoklu analizlere olanak sağlaması yönünden oldukça dikkat çekici bir hal almaktadır. Farklı Raman boylarının kullanılarak, son basamakta yine altın nanopartikül üzerine gümüş indirgenmesi uygulanarak Raman sinyallerinin artırıldığı ve yaklaşık 20 fM konsantrasyona kadar inilen çalışmada Raman spektroskopisi ile nanopartiküllerden yararlanılarak çoklu nükleik asit analizi gerçekleştirilmiştir [16].

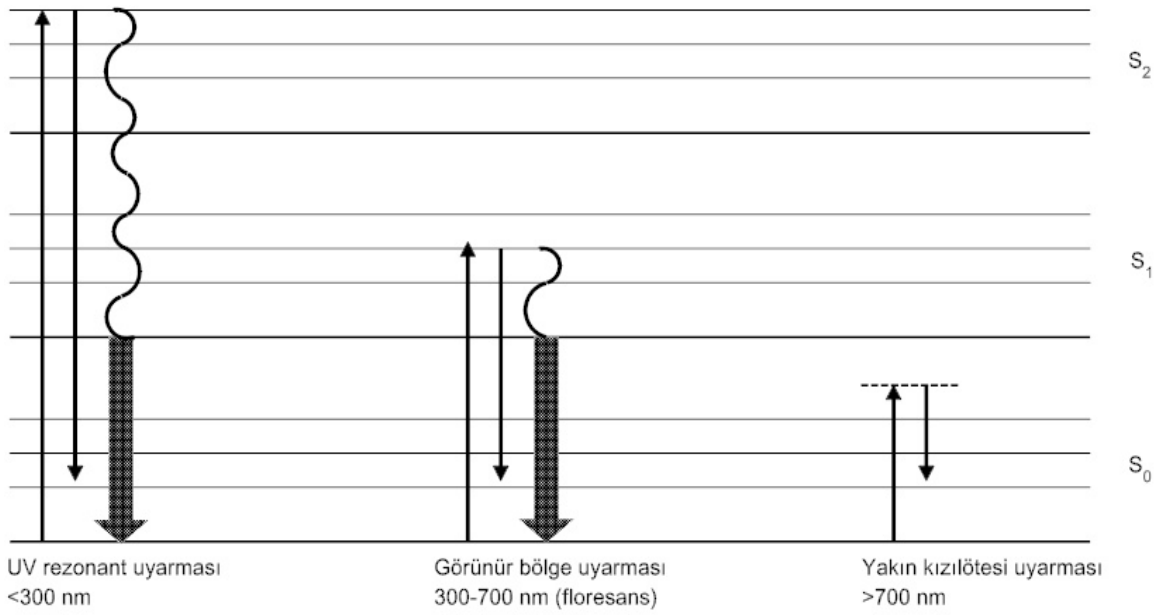
Genetik modifikasyon (GM), genetik materyalin değişime uğratılarak doğal olarak bulunamayacağı hale dönüştürülmesi olarak açıklanmaktadır. Genetik modifiye organizma (GMO) ise genetik modifikasyona uğratılarak yeni özellikler kazandırılmış organizmalara denilmektedir. GM, gıdaların kalitesinin artırılması, çevresel koşullara dayanıklılıkları artırılarak randımanın artırılması ve besin değerlerinde artışa sebep olabileceği belirtilirken; olası yan etkileri bakımından da bir takım iddialar mevcuttur [17]. GMO içeren tahıllar, gıdalar ve içerik maddelerinin belirlenmesi ile ilgili dünya çapında bir mevzuat üzerinde karar alınmasıyla birlikte, hassas ve güvenilir metotların geliştirilmesine ihtiyaç duyulduğu belirtilmektedir [18]. Temel olarak GMO'ların tayinine yönelik DNA ve proteine dayalı yöntemler kullanılmaktadır. Proteine dayalı yöntemlerde antikorlardan yararlanılan immünolojik analizlerin, hedef analitin bulunduğu durumlara uygun olduğu belirtilmektedir [19]. DNA'ya dayalı yöntemler ise birbirini tamamlayıcı DNA dizilimlerinin seçici olarak birbirleriyle hibridize olmasına dayanmaktadır [18]. Yukarıda da belirtildiği gibi GMO içeren gıdaların tespitine yönelik hızlı, hassas, güvenilir ve ucuz yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu nedenle spesifik DNA dizilimlerini saptanmasına yönelik cihazların ve yöntemlerin geliştirilmesi üzerine çaba gösterilmektedir [20]. Yapılan bu çalışmada GMO'nun genetik materyaline ait dizilimlerin Raman spektroskopisi, nanopartiküller ve YGRS tekniğine dayalı olarak tespiti üzerine çalışılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

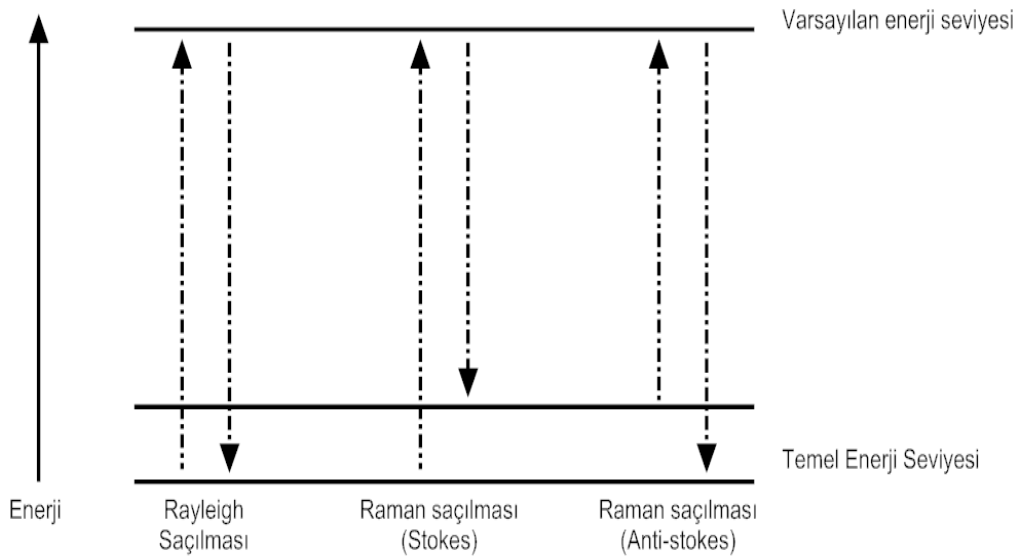
2.1. Raman Spektroskopisi

Nesne üzerine gönderilen foton nesneye çarptıktan sonra; etkileşmeden geçebilir, soğurulabilir, soğurulup yeniden yayınlanabilir ya da saçılabilir [21]. Madde ve ışık arasında gerçekleşen enerji aktarımı, Raman etkisini açıklayıcı temel işlemdir [22]. Moleküllerin şiddetli bir monokromatik ışın demeti ile etkileşmesi sonrasında saçılan fotonun dedektör tarafından takip edilmesi yöntemine ise Raman spektroskopisi adı verilmektedir [21]. Işığın saçılması olayında saçılan ışığın büyük bir kısmının frekansı, gelen ışığın frekansı ile aynı olmaktadır. Halbuki gelen ışığın küçük bir kısmı madde içerisindeki moleküllerin titreşimini neden olabilmektedir. Bu enerji gelen ışıktan sağlanmalıdır; çünkü ışığın enerjisi frekans ile orantılıdır ve saçılan ışıktaki frekans değişimi saçılma yapan moleküllerin titreşimsel frekansına eşit olmalıdır. Saçılma yapan moleküller ile gelen ışık arasındaki enerji alış veriş olayı Raman etkisi olarak bilinmektedir [22]. Diğer bir deyişle "Rayleigh saçılması" adı verilen ve saçılan ışığın enerjisinin büyük bir kısmının madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olduğu elastik saçılma olayının yanı sıra, saçılan ışığın küçük bir kısmının molekül ile etkileşime giren ışığın enerjisinden farklı olduğu elastik olmayan saçılma olayına "Raman saçılması" denilmektedir [21]. Enerji seviyeleri üzerinden bir inceleme yapıldığı zaman, Raman saçılması olayı gelen fotonun anlık absorplanması ve Raman saçılmasına uğramış fotonun emisyonu sonucu molekülün temel enerji seviyesinden uyarılmış enerji düzeyine geçmesiyle gösterilebilir. Raman saçılması gösteren ışık spektrometre yardımıyla toplanıp "spektrum" olarak gösterilirken; intensite değeri frekans değişiminin fonksiyonu olarak gösterilmektedir. Her bir molekül türünün kendine ait molekül titreşimlere sahip olması itibarıyla belirli türlerin Raman spektrumu, her biri bu moleküllerin karakteristik titreşimsel frekanslarının oluşturduğu "bantlar"dan oluşmaktadır.

a)



b)



Şekil 2.1. a) Raman etkisi: UV, görünür bölge ve yakın kızılötesi uyarma stratejileri. b) Stokes ve anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı ile açıklanması.

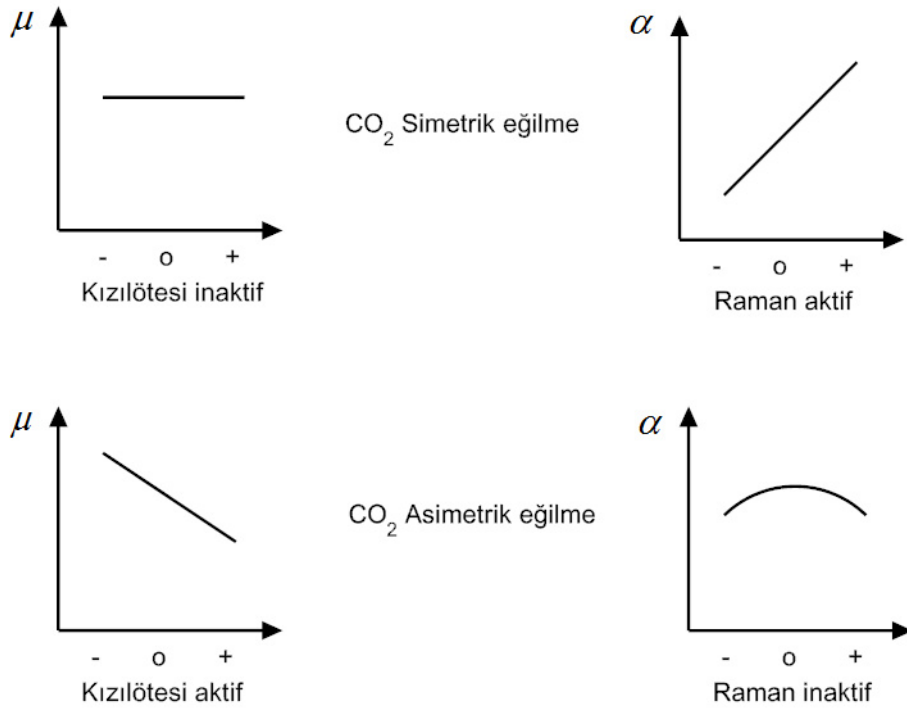
Şekil 2.1.a'daki yatay çizgiler titreşimsel enerji seviyelerini gösterirken, S_0 , temel elektriksel durumunu S_1 ve S_2 ise uyarılmış elektronik durumları ifade etmektedir. Şekilde gösterilen durum temel enerji seviyesinde bulunan molekülün bir üstteki enerji seviyesine Raman saçılması ile taşınması durumudur. Yukarı doğru çizilen oklar lazer uyarmış ışığının frekasını, aşağı yöndeki oklar ise Raman saçılması yapan

ışığın frekansını göstermektedir. Floresans ışığın frekansı ise gri renkli kalın oklar şeklinde gösterilmiştir. Yukarı ve aşağı yöndeki oklar arasındaki fark ise molekülün frekansıdır. Şekilde de görülebileceği gibi her üç şekilde yapılan uyarım sonucunda titreşimsel enerjideki değişim aynı olmasına karşın, uyarım için kullanılacak dalgaboyu aralığı, floresansın yapacağı girişimi engellemek üzere belirlenebilir. Ultraviyole (UV) bölgede floresans ışığın frekansı, Raman saçılması yapan ışığa göre oldukça düşük iken yakın kızılötesi (N-IR) bölgede ışık kaynağının frekansı floresansı uyarmaya yetmemektedir. Görünür bölgede ise floresans saçılma yapan ışık ile Raman saçılması yapan ışığın frekansları çok yakındır. Bu yüzden floresans kaynaklı girişimi engellemek için UV veya NIR uyarımları tercih edilebilir [22]. Şekil 2.1.b'de ise Rayleigh ve Raman saçılmaları gösterilmektedir. Enerjisi $h\nu_0$ olan ve molekül tarafından absorplanmayan bir foton molekül ile etkileştikten sonra foton ile molekül arasında iki taraflı da olabilen bir enerji alışverişi gerçekleşmektedir. Molekül ile foton arasında gerçekleşen bu enerji aktarımından sonra moleküller farklı bir enerji seviyesinde bulunurlar. Enerji aktarımı sonucunda başta temel titreşim enerji düzeyinde bulunan molekül etkileşim sonrası uyarılmış enerji düzeyine geçiyorsa molekülün titreşim seviyesinde artma, fotonun enerjisinde ise azalma olmaktadır. Bu etkileşim sonucu saçılan ışımalar ise Stokes hatları olarak adlandırılmaktadır. Diğer bir durumda ise molekül foton ile etkileşmeden önce uyarılmış titreşim düzeyinde iken, bu olay sonrası temel titreşim düzeyine dönmekte ve sonuç olarak molekülden fotona, molekülün başta bulunduğu uyarılmış enerji seviyesi ile temel enerji seviyesi arasındaki fark kadar bir enerji aktarımı gerçekleşmektedir. Bu durum sonucu gözlenen Raman kaymalar ise anti-Stokes hatları olarak adlandırılır [23]. Fakat, uyarılmış titreşim düzeylerinde bulunan moleküllerin sayısı, temel titreşim düzeyinde bulunan moleküllerin sayısına Boltzman kanunu çerçevesinde kıyaslandığı zaman, anti-Stokes saçılmalarının oluşma olasılığının Stokes saçılmalarına göre çok düşük olduğu görülmektedir [21].

Bir molekülün titreşimi sırasında etkileşime girdiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi (α), diğer bir deyişle geçici dipol momentinin (μ) olması Raman türü bir saçılma etkileşimi olabilmesi için gerekmektedir. Şekil 2.2.a'da CO₂ molekülünün simetrik ve asimetrik olarak gerilme ve eğilme titreşimleri sırasında molekülün polarlanabilmesinde ve dipol momentinde oluşan değişimler gösterilmektedir. Asimetrik gerilme titreşimi olduğu sırada meydana gelen değişim,

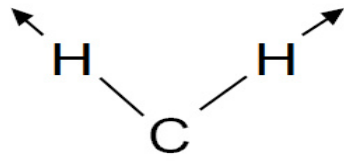
molekülün dipol momentindeki değişim ile aynı fazda oluşmaktadır. Bu durum da Raman aktif olmayan ve titreşim sırasında oluşan polarlanabilme değişim frekansı ile titreşim frekansının uyuşmadığı bir durumdur [1]. Spektrumlardan elde edilen titreşimsel Raman bantları, frekansın bir fonksiyonu olarak absorplanan enerjiden ibaret olan, molekülün titreşimsel hareketleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Raman spektrumunda oluşan farklı titreşim frekanslarındaki bantlar, üzerinde çalışılan örneğin moleküler geometrisi ve kimyasal kompozisyonuna bağlıdır. Şekil 2.2.b'de proteinlerin alifatik gruplarının gösterdiği titreşim türleri olan simetrik gerilim, asimetrik gerilim, makaslama eğilme, asimetrik eğilme ve bükülme titreşimleri şematize edilmiştir [24].

a)

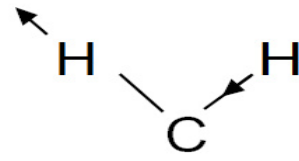


Şekil 2.2. a) CO₂ molekülüne ait dipol moment ve polarlanabilirlik değişimi b) proteinlerin alifatik gruplarının titreşim şekilleri.

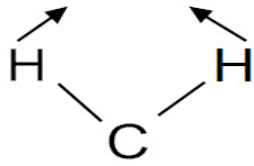
b)



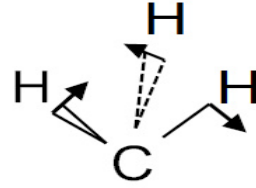
Simetrik gerilme titreşimi



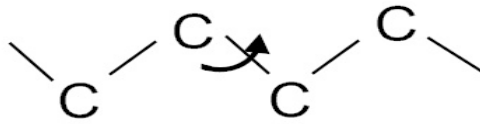
Asimetrik gerilme titreşimi



makaslama eğilme titreşimi



Asimetrik eğilme titreşimi (CH₃)



Döndürme titreşimi

Şekil 2.2.(devamı) a) CO₂ molekülüne ait dipol moment ve polarlanabilirlik değişimi b) proteinlerin alifatik gruplarının titreşim şekilleri.

Raman spektroskopisinde yapılacak olan analizler için farklı şekillerde örnek hazırlanabilir. Bu konuda birçok kolay yöntem kullanılmaktadır. Çalışan kişinin ihtiyacına göre çeşitli boyut ve geometrilerde ticari olarak bulunabilen veya tasarlanabilen örnek hazneleri bulunmakta ve bunlar arasında görünür bölgede camın Raman spektrumuna girişim yapmama özelliğiyle küçük miktarlarda örnek gerektiren kapiler ve nükleer manyetik rezonans (NMR) cam tüpler en çok kullanılanlardır. İhtiyaç olması durumunda; akış hücreleri (flow through cell), sıcaklık kontrollü hücreler ve döner örnek tutucu (rotating sample holder) gibi çeşitlerin yanı sıra son yıllarda fiber optik problemler de kullanılmaktadır [24].

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR) ve Raman spektroskopisi, heterojen gıdaların ve biyolojik materyallerin moleküler yapısını ve kimyasal içeriğini incelemeye yarayan ve birbirini tamamlayan titreşimsel spektroskopik tekniklerdir.

Her iki metotla çalışılırken az miktarda örnek yeterli olup, kuru ve ıslak örneklere uygulanabilir ve zarar vermemektedirler. IR ve Raman spektroskopisi, sırasıyla kimyasal bağların elektriksel dipol momentleri ve polarlanabilirlik özelliklerindeki değişimler üzerine kurulu sistemler olduğundan farklı titreşimsel spektroskopik bilgi sağlamaktadırlar [25]. Bu iki yöntem karşılaştırıldığında Raman spektroskopisinin biyolojik uygulamalar için daha uygun olduğu belirtilmektedir. Moleküllerin yapısında bulunan $-C=C-$, $-C\equiv C-$, $-N=N-$, $-S-S-$, $-C-O-C-$ türü titreşimler ile halkalı bileşiklerde gözlenen halka daralması-halka genişlemesi titreşimi nedeniyle Raman spektrumunda daha şiddetli bantların oluşumu ve biyolojik çalışmalarda ortamda su bulunması durumunda IR yönteminin kuvvetli absorplama özelliği göstermesine karşı Raman spektroskopisi ile sulu ortamda bulunan örneklerinin analizinin daha iyi analiz edilebilmesi bu duruma sebep olarak gösterilmektedir [21].

Rezonans Raman spektroskopisi (RRS), normal Raman spektroskopisinin (NRS) sulu ortamda düşük şiddet ve hassasiyetle çalışıyor olmasından dolayı zamanla yerini almıştır. RRS'de saçılma olayı, analitin elektronik absorpsiyon pikine oldukça yakın dalgaboyları ile uyarılması sonucu olup; Raman bantlarının 10^2 ile 10^6 kata kadar kuvvetlenmesini sağlamaktadır. Bu sayede de RRS 10^{-8} M'a kadar olan analit derişimlerinde kullanılabilir. Ayrıca rezonans kuvvetlendirmesi sonucu oluşan Raman spektrumları, kromofor grupları nedeniyle oluşan Raman bantlarından meydana geldiği için sadece birkaç çizgiden oluşmaktadır [21].

2.1.1 Raman spektroskopisinin bileşenleri

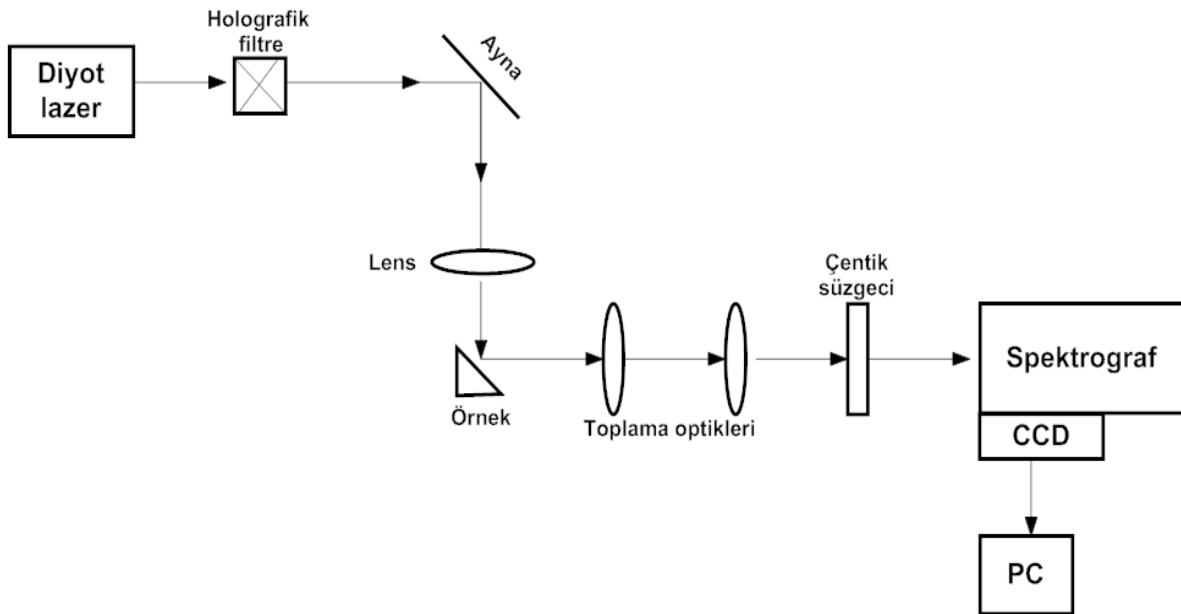
Raman spektroskopisi dört ana bileşenden oluşmaktadır. Bu bileşenler; lazer ışık kaynağı, örnek sistemi, dedektör sistemi ve ileri aşamalarda analizler için bilgi toplayıp muhafaza edecek bilgisayar veya mikroişlemci bulunmaktadır [24]. Şekil 2.3'te Raman spektroskopisinin şematize edilmiş hali görülmektedir. Floresans spektroskopisi ile karşılaştırıldığında kullanılan alet yönünden oldukça benzerlik gösteren Raman spektroskopisinde kullanılan ışık kaynağı iki sistem arasındaki en önemli farkı oluşturmaktadır. Raman spektroskopisinde ışık kaynağı olarak genellikle, zorlanmış emisyon ile ışık çoğaltmasından "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" yararlanılmaktadır. Bu ışık kaynağının adı lazer (laser) olarak anılmaktadır ve bu kısaltma açılımının baş harflerinden yararlanılarak türetilmiştir.

Lazer ışması yapacak olan sistemde gerçekleşen aşamalar şu şekilde özetlenebilir. Sistem uyarılmış duruma getirilmek için kuvvetli bir ışık kaynağı ile pompalanır. İki yana yerleştirilmiş olan biri tam yansıtıcı, öteki ise kısmen yansıtıcı iki aynadan yansıtılarak, uyarılmış atom veya moleküllerin kendiliğinden yaymış olduğu fotonlar sisteme geri gönderilir ve böylece sistem lazer ışmasına zorlanır.

Raman spektroskopisinde yararlanılan lazerlerden ruby lazeri, kristal hal veya iyonik kristal lazeridir ve 694.3 nm dalgaboyunda lazer ışması yapmaktadır. Diğer bir katı hal lazeri ise yitrium alüminyum garnet (YAG) kristalidir. Kristal içerisinde bulunan neodimiyum iyonları lazer ışması yapmakta ve Xe flaş pompası ile pompalanan bu lazer 1064 nm dalgaboyunda ışık yaymaktadır. Gaz lazerleri ise çok kullanılan diğer bir lazer türüdür. Gaz lazerlerinden biri olan He-Ne lazeri nötral atom lazeri olup sürekli ışma yapmaktadır. Bu lazer türünde birçok gaz lazerinde olduğu gibi tüp içerisine yerleştirilen elektrotlar yardımıyla elektriksel olarak bir optik pompalama gerçekleştirilmektedir. He gazının bu karışımdaki görevi optik pompalama verimini artırmak iken, He-Ne lazeri dört enerji düzeyli lazer sistemine örnektir. Ar ve Kr iyon lazerlerinde ise elektriksel pompalama işlemi ile hem atomlar iyonlaştırılır hem de oluşan iyonlar uyarılır ve de büyük akım yoğunlukları kullanılmaktadır. Bu sebepten ötürü, bu tip lazerlerde su ile soğutma ve dayanıklı tüp malzemesi kullanımı gibi gereksinimler oluşmaktadır. Enerjisi en büyük olan ve aynı zamanda pulslar halinde lazer ışması yapan tür ise N₂ lazeridir. Boyar madde lazerlerinin pompalanmasında da N₂ lazeri kullanılmaktadır. Birçok endüstriyel uygulamada kullanılan ve sürekli lazer ışması yapan en güçlü lazer ise aynı zamanda kızılötesi lazeri olan CO₂ lazeridir. Kızılötesi bölgede kullanılan diğer bir lazer türü ise yarıiletken maddelerden yapılan lazerlere ise InAs lazeri ve InSb lazerleri örnek olarak verilmektedir. Ultraviyole bölgede çok güçlü lazer ışması yapan ve ekzimer lazerleri olarak bilinen lazerler ise XeF, KrF ve ArF lazerleridir. Bu lazerler de boyar madde lazerlerinin pompalanmasında kullanılabilirler. Boyar madde lazerleri (Stilben 420, Kumarin 460, Kumarin 503 vb.) olarak tanımlanan lazerler incelendiği zaman ise, bu tip lazerlerdeki lazer ışmasını yapan maddelerin floresans özelliği olan bir organik boyar madde olduğu görülmektedir. Bu tip lazerlerin yaptığı ışma molekülün sahip olduğu özellikten ötürü keskin hatlar halinde değil de floresans spektrumundaki bir bant şeklinde olduğundan lazer ışması belli bir aralık içerisinde değiştirilebilmekte ve istenilen dalgaboyundaki fotonların lazer ışması şeklinde elde edilebilmesi için

sistemdeki lazer tüpünün bir tarafındaki geçirgen ayna yerine optik ağı yerleştirilmektedir.

Tüm bu lazer türleri arasında He-Ne ve Ar⁺ lazerlerin Raman spektroskopisinde en çok kullanılan lazerler iken, Rezonans Raman spektroskopisi ve CARS yöntemlerinde dalgaboyunun değiştirilebildiği boyar madde lazerleri tercih edilmektedir. Raman sistemlerinde çalışılan dalgaboyuna duyarlı dedektör seçimi, kullanılan dedektörlerin soğutulması, ışık kaynaklarından keskin monokromatik ışık elde edildiğinden ışık kaynağı ve örnek arasında filtre kullanımı ve ayrıca saçılmanın meydana geldiği dalgaboyunu ölçebilmek için örnekle dedektör arasında monokromatör kullanımı önemli noktalardır [1].



Şekil 2.3. Raman spektroskopisinin bileşenleri

2.2. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) substratları kullanılarak Raman sinyallerinin güçlendirilmesi tekniği YGRS olarak adlandırılmaktadır [21]. YGRS moleküler parmak izi spesifikliğini, potansiyel tek molekül hassasiyeti ile birleştirmekte; bu özelliğiyle de kimyasal ve biyokimyasal analizlerde iz miktardaki moleküllerin belirlenmesinde ilgi çekici bir araç olarak belirtilmektedir [26]. Diğer bir bakış açısıyla YGRS, kimyasal ve biyokimyasal problemlerin çözümünde titreşimsel spektroskopinin kullanılma olasılığını artıran analitik cihaz olup, materyallerin moleküler düzeyde incelenmelerine olanak sağlamaktadır. YGRS etkisinin bulunması

1970'li yıllara dayanmakta olup geçen süre zarfında biyokimya ve canlı bilimi konularındaki birçok analitik uygulamada uygulanmıştır.

YGRS güçlendirmesinde etkili olan iki ana mekanizmanın olduğu ve bu mekanizmaların ise uzun menzilli klasik elektromanyetik (EM) etki ve kısa menzilli kimyasal (CHEM) etki olduğu belirtilmektedir. Her iki mekanizmanın var olduğu durumda da analit, YGRS aktif substrat üzerine adsorbe edilmiş durumdayken, substrat genellikle lazer kaynağından yayılan monokromatik ışığa ile uyarılmakta ve son aşama olarak da saçılan ışığa, Raman spektrometresi ile analiz edilmektedir. EM güçlendirmesi, uyarıcı ışığın yüzey elektronları ile etkileşerek plazmon oluşturmaktan meydana gelmektedir. Pürüzsüz yüzey üzerindeki enerji yüzeye bağlıdır ve saçılım olayının gerçekleşebilmesi için yüzeyde plazmona dikey bileşen oluşturulmak amacıyla pürüzlülük yaratılmalıdır. Böylece uygun bir şekilde pürüzlülük yaratılmış bir yüzeyde plazmon oluşmaktadır. Plazmon enerjisi, Raman prosesinin analit molekül içerisinde gerçekleşmesini sağlamakta, daha sonra enerji plazmona geri aktarılmakta ve enerji transferi sırasında frekans değişimine uğramış saçılan ışığa ise spektrometre tarafından saptanmaktadır. CHEM güçlendirmesinde ise molekül metal yüzeye bağlanarak yük-transfer kompleksi oluşmaktadır. Yüzeye gönderilen uyarıcı ışığa ise metal ile etkileşerek elektron-delik çifti oluşmakta ve enerji, bu yeni metal üzerinden analit molekülün bağlarına aktarılmaktadır. Raman prosesi analit üzerinde gerçekleşmekte olup, saçılım olayı gerçekleşmek üzere enerji metal üzerine geri gönderilmektedir [26]. İntensite güçlendirmesine etkisi bakımından EM etkisi (10^4 - 10^7) seviyelerinde iken CHEM etkisinin (10^{-1} - 10^2) seviyelerinde olduğu belirtilmektedir [27]. Uygun koşullar sağlanması durumunda ise YGRS tekniğinin Raman spektroskopisine göre 10^{14} kat spektral güçlendirme sağladığı bildirilmektedir [2, 28].

YGRS, moleküler yapı hakkında bilgi elde edebilme bakımından kullanışlı olması ve aynı zamanda tek molekül hassasiyetine varan oldukça hassas bulma sınırları sağladığından patojen, bakteri ve virüsleri tayin etmek amacıyla kullanılmıştır. Biyosensör uygulamalarında kullanılan YGRS'nin iki farklı prensibinden bahsedilmektedir. Bu prensipler içsel ve dışsal olarak ikiye ayrılmaktadır. İçsel belirlemede analit, nanoyapılandırılmış yüzey üzerine direkt olarak uygulanıp Raman spektrumları biyomoleküllerin ölçümünden elde edilir ve analitin yakalanması ve spesifiklik özelliğini katmak üzere nano yapılandırılmış yüzeyler üzerine antikor,

aptamer vb. moleküller immobilize edilebilmektedir. Diğer taraftan, dışsal belirlemelerde ise ölçümler Raman işaretçi bir molekül üzerinden alınmaktadır [27].

2.2.1. YGRS substratları

Pratik uygulamalar için YGRS substratlarının, sinyallerde yüksek oranda güçlendirme sağlaması, farklı üretimlerde tekrarlanabilir özelliğe sahip olması, uzun süre stabilitesini koruması, çevresel faktörlerden etkilenmemesi, tüm yüzeyde ve partiler arası sinyalleri güçlendirme etkisinin benzer olması ve üretimi kolay olması gibi özelliklere sahip olmalarının önemine literatürde değinilmektedir [26, 27]. Diğer yandan, çalışılan substrat yüzeyleri üzerinde sinyalleri yüksek oranda güçlendiren bir alan bulmanın, alınan her bir ölçümde aynı başarıya ulaşmaktan daha kolay olduğu ve yüzeydeki tüm bölgelerde aynı oranda sinyal güçlendirmesi sağlayan bir yüzey üretebilmenin zorluğu konusunda görüş sunulmaktadır [6].

Metalik nanopartiküller YGRS aktif substrat olarak önemli bir yere sahiptirler. Bu alanda kullanılan partiküllerin kolay ve düşük maliyetli üretim aşamalarına sahip olmaları en çok kullanılan YGRS substratı olmaları konusunda önemli rol oynamaktadır [26]. Kullanılan birçok YGRS substratı altın veya gümüşten üretilmekte ve yüzey kimyası bakımından ufak değişiklikler göstermektedirler. Bu konu ele alındığı zaman altın yüzeyinin, ortamdaki gelen inorganik ve/veya organik iyonların fiziksel adsorpsiyonla tabaka şeklinde sarılmış Au^0 (indirgenmiş altın) atomlarından oluştuğu, gümüşün yüzey tabakasının ise oksit, klorür veya fiziksel olarak adsorbe olmuş iyonların yanında sitrat gibi organik kompleks oluşturucu reaktiflerden meydana gelebileceği, böylece yüzeydeki gümüş atomlarının Ag^+ formunda bulunduğu ifade edilmektedir [6].

YGRS substratlarını oluşturmak üzere çeşitli yöntemler izlenmektedir. Ortak yönleri, YGRS için uygun olan pürüzlü metal yüzeyler oluşturmak olan yöntemlere; yükseltgenme-indirgenme çevrimleri, metal kolloid hidrosolleri, kimyasal aşındırma, Tollen reaktifi ile hazırlanmış pürüzlü filmler, buharla biriktirilmiş gümüş metal filmler örnek olarak verilmektedir. Ancak bu yöntemlerle sinyallerdeki artışın daha fazla olması üzerinde durulduğundan belirtilen diğer beklentilere tam olarak cevap verememektedirler. Belirtilen tüm gereksinimlere cevap verme ihtimali daha yüksek olan elektron ışınli basım, nanokürecik yapısı geliştirme, şablon metodu, hibrit

metodu ve eğik açılı buhar birikimi gibi fabrikasyon yöntemlerinin varlığından söz edilmektedir [27].

2.2.2. Raman etiketleri ve çoklu analizler

Titreşimsel bir teknik olan YGRS, keskin parmakizi spektrumlarından yararlanılarak çoklu analitlerin tespitinde kullanılmaktadır. Deoksiribonükleik asit (DNA), proteinler ve enzimler gibi biyomoleküllerin kompleks biyolojik matrislerdeki tespiti ise biyolojik tanımlama konularına dahil olmaktadır. Mevcut yöntemlerle çoklu analizlerde bileşinlerin ortamdaki ayrılması ve izolasyonu gibi basamaklar gerekmektedir. Tespit basamağında ise başta floresans spektroskopisi olmak üzere spektroskopik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Floresans etiketin hedefteki biyomolekülle bağlanması veya biyomolekül ile etkileşimi sonucu floresanstaki değişim üzerinden ölçüm alınmaktadır. Ancak geniş bir floresans emisyonuna sahip olması, örtüşen emisyon spektrumları ve hedefteki analit hakkında sınırlayıcı bilgi sağlaması yöntemde karşılaşılan sorunlar olarak belirtilmektedir.

Yapılan çalışmalarda, aynı anda tespit edilebilecek biyomoleküllerin sayısının artması deneydeki basamak sayılarının azalmasını ve her bir deneyden elde edilen veri miktarının artmasını sağlamaktadır. Aynı deneylere gerek duyulmadan tek basamakta birçok veri elde edilmesi ise analiz maliyetlerinin düşmesine olanak sağlamaktadır. YGRS ile yapılan çoklu analizlerde yüzeylerin kompleks oluşturan kısımları kromofor veya raportör grupların güçlendirici metal yüzeylere adsorplanmalarına olanak sağlamaktadır [29].

Çoklu analizler üzerine yapılan çalışmaların birinde bu alanda kullanılması amacıyla boya sentezi ve bu analizler için uygunluğu üzerine yoğunlaşmıştır. Bu çalışmada farklı yüzey arama özelliklerine - benzotriazol, hidroksikinolil ve pridil halka sistemleriyle- sahip azo boya sentezlenmiş; daha sonra da ayrı ayrı ve karışım halinde analiz edilmişlerdir. YGRS raportör boya yüzey adsorpsiyon karakteristikleri, analitin lazerin uyarma dalga boyundaki maksimum absorpsiyonu ve her bir molekülün bağlı YGRS kesiti gibi faktörlerden önemli derecede etkilenmektedir. Diğer yandan çoklu analizler üzerine çalışılırken karışım ortamında her bir boyanın ayırt edilebilmesi gerektiğinden ve en iyi raportör molekülün YGRS cevabının, zayıf raportörlerden elde edilen cevapları iyi bir şekilde baskılaması gerektiğinden söz edilmektedir [30, 31]. Raman aktif raportör moleküllerin

kullanılarak, altın nanopartikül substratların yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturulup barkodlanmış plazmonik partiküllerin elde edilmesi yapılan başka bir çalışmanın konusunu oluşturmaktadır. Yine ayrı ayrı ve karışım halinde ölçümler alınmıştır. Kullanılan raportör moleküllerin yapılarındaki benzerliklerin, yüzey adsorpsiyon özelliklerinden kaynaklanabilecek sinyal şiddetlerindeki farklılıkları azalttığı belirtilmektedir. Etiketlerin, görünür bölgedeki uyarma dalga boyları ile rezonans halinde olmamasından ötürü etiketlerin varlıkları veya yokluklarının barkodlanmış partiküllerin kimliğini ifade ettiği belirtilmektedir. Ayrıca Raman etiketleri kullanılarak milyonlarca tanımlanabilir barkod partikül üretilebileceği belirtilmektedir [32].

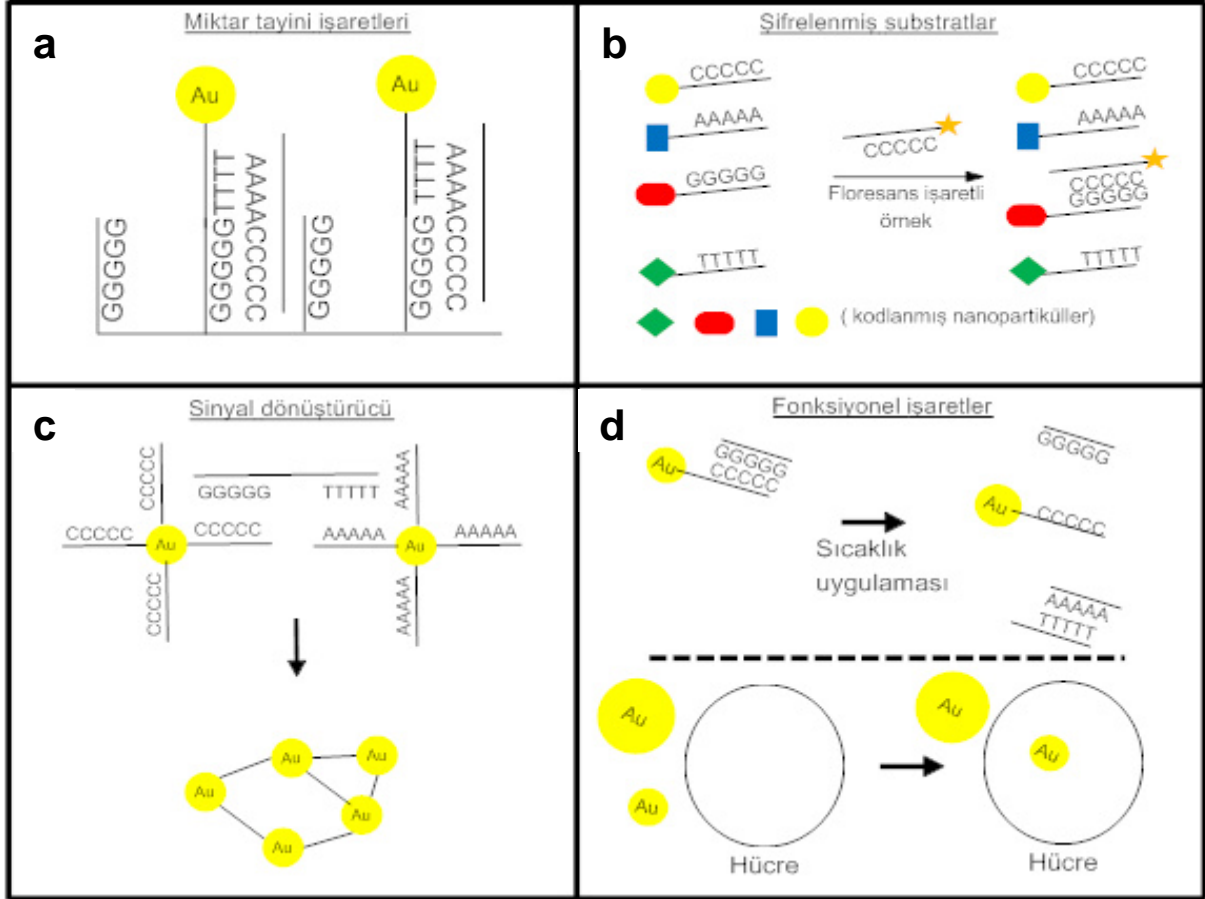
DNA dizilimlerinin hassas ve seçici şekilde analizlerinin biyoanalizlerdeki önemine değinilmekte ve çoklu DNA analizlerinin dizilim temelli floresans ve elektrokimyasal tekniklerle yapıldığı belirtilmektedir. Ancak moleküler flüoroforların örtüşen ve geniş spektrumları yanında foto ışıldama bozulması ve çoklu uyarma kaynağı ihtiyacı gibi özelliklerin floresans yöntemini sınırlayıcı etkenler olduğuna dikkat çekilmektedir. Bu sorunlara çare olarak geliştirilen kuantum noktalarının geliştirildiği ancak toksik özelliklerinden dolayı kullanımlarının yaygınlaşamadığından bahsedilmektedir. Raman etiketleri kullanılarak çoklu DNA analizi yapılan çalışmada, etiketlenmiş 5 tek zincirli DNA'nın 2 farklı uyarma dalgaboyu kullanılarak tespit edilmiştir. İki farklı dalga boyunda çalışılmasının amacı boyaların farklı dalga boylarında gösterdikleri maksimum absorpsiyon ve rezonans gibi özellikler olduğu söylenmektedir [33].

2.3. Nanopartiküller

Nanoteknolojinin biyolojik sistemlerde kullanılması nanobiyoteknoloji terimiyle ifade edilmektedir. Bu konu henüz gelişme aşamasında olmasına karşın farklı boyut, şekil ve bileşime sahip nanopartiküllerin biyoanalitik ölçümleri temelden etkilediği görülmektedir [34]. Son yıllarda moleküler tanımlama alanında gazların, metal iyonların ve birçok hastalıkla bağlantılı olarak DNA ve protein işaretçilerin analizlerinde nanomateryallerin kullanılmasında ciddi bir artıştan bahsedilmektedir [35].

Nanopartiküller çeşitli biyoanalitik formatındaki uygulamalarda kullanılabilir. Bu uygulamalara örnek olarak; metalik nanopartiküllerin elektrokimyasal yolla belirlenmesi ve kuantum noktaların optik yolla belirlenmesi gibi uygulamalarda miktar

taini için etiket olması, çoklu analizlerde şifrelenmiş nanopartiküllerin substrat olması, sinyal transdüksiyonlarını artırıcı olması ve bir de nanopartiküllerin fiziksel veya kimyasal özelliklerinden dolayı biyolojik reaksiyonları katalizlemek gibi fonksiyonel görev üstlenmesi, verilmektedir. Bu uygulamaların şematik gösterimi Şekil 2.4'te görülebilmektedir [34].



Şekil 2.4. Biyoanaliz uygulamalarında nanopartiküllerin kullanım şekilleri: a) DNA sandviç yapı tayininde etiket olarak; b) çoklu analizde, hedef moleküle eşlenik yapıya sahip substrat olarak; c) DNA problemleri sayesinde nanopartiküllerin bir araya gelmeleri ve agregat oluşturmaları (sinyal transdüksiyonunu artırıcı); d) üstteki gösterimde au nanopartikül ile etiketlenmiş DNA diziliminin sıcaklık uygulamasıyla selektif olarak hibridize olmuş yapının ayrılması, alttakinde ise sadece belirli boyutlardaki altın nanopartiküllerin hücre içerisine girebileceği gösterilmektedir.

DNA analizlerinde polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile amplifikasyon ve moleküler flüoroforların etiket olarak kullanılması önemli bir yer kaplamaktadır. Bu çalışmalarda elde edilen tespit limiti ise pikomolar düzeyindedir. Ancak flüoroforların geniş

absorpsiyon ve emisyon bantlarına sahip olmaları, floroforların değişik hızlarda gerçekleşen fotokimyasal yıkımları, karmaşık işleyiş ve yüksek maliyet bu uygulamalarla ilgili varolan sıkıntıları işaret etmektedir [13]. Diğer taraftan moleküler düzeyde yapılan kapsamlı araştırmalarda, geleneksel yöntemlerdeki sorunları işaret eden pratik olma, dayanıklı, yüksek hassasiyete ve seçiciliğe sahip tespit ajanlarına ihtiyaç olduğuna değinilmektedir [35].

Nanopartiküller nükleik asit ve protein ile ilgili birçok biyoafinite çalışmasında kullanılmıştır. Partiküllerin nanometre düzeyinde büyüklüğe sahip olmaları dolayısıyla yüksek reaktivite özelliğine sahip olmaları yanı sıra elektriksel, elektrokimyasal, optik ve manyetik gibi fiziksel özelliklerinin kimyasal yolla kontrol edilebilir olması sahip olduğu avantajlardır [13]. Bazı durumlarda nanomateryallere dayalı analizler, belirtilen özellikler bakımından geleneksel yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır. Ancak tüm nanomateryallerin avantaj sağlamadığı gibi tüm moleküler floroforların da biyolojik tanılarda avantaj sağlamadığına dikkat çekilmektedir [35].

2.3.1. Nanopartiküllerin genel özellikleri

Belirli nanomateryaller, 1-100 nm arasında değişen küçük boyutları ve buna bağlı olarak yüksek yüzey/ hacim oranları, boyut, bileşim ve şekilleri ile doğrudan ilişkili olan fiziksel özelliklerinin kimyasal yolla değiştirilebilmesi, sıradışı hedef bağlama özellikleri ve yapısal açıdan sağlamlıkları dolayısıyla araştırmalar için uygun aday olarak belirtilmektedir. Nanomateryaller için geliştirilen sentez, üretim ve karakterizasyon metotları sayesinde büyüklükleri, şekilleri ve bileşim modülasyonları ayarlanabilmekte böylece ve bu özelliklerin incelikte kontrolü sağlanmaktadır [35]. Nanopartiküllerin karakterizasyonu, sentez ve daha sonraki basamakları kontrol etme ve doğrulama amacıyla önemli bir basamaktır. Bu amaçla geliştirilen teknikler; geçişli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dinamik ışık saçıcısı (DLS), X-ışını fotoemisyon spektroskopisi (XPS), X- ışını difraksiyon spektroskopisi (XRD), Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR), ultraviyole spektroskopisi (UV)'dir [36]. Fiziksel özelliklerinin ayarlanabilmesinin biyolojik tanı uygulamalarındaki kullanımları açısından önemi de vurgulanmaktadır. Çoklu analit tespitlerinde spesifik yayıcı, emici ve ışık saçılımı özelliklerinin metal nanopartiküllerin boyut, şekil ve bileşimleri değiştirilerek elde edilmeleri, bu materyallerin kullanılabilirliği bakımından önem arz etmektedir [35].

2.3.2. Nanobiyosensörler

Biyosensör, fizikokimyasal dönüştürücüyle bağlantısı olan bir moleküler tanımlama elemanından oluşan biyoanalitik cihazlara denilmektedir [37]. Protein biyo-işaretleri, genler, hücreler ve patojenler gibi biyolojik örnekler içerisinde yer alan moleküler elemanların hızlı ve kesin bir şekilde ölçümlerinin medikal biyosensörlerde ilgilenilen önemli bir konu olduğu belirtilmektedir [38].

Transdüksiyon için nanopartiküllerin kullanıldığı, biyomoleküllerin ve hücrelerin yüksek hassasiyette tespit edilip ölçüldüğü nanobiyosensörler geliştirilmiştir [39]. Nanobiyosensörler homojen veya heterojen olabilirler. Homojen nanobiyosensörler çözelti içerisinde faz ayrımı olmadan gerçekleşirken; heterojen biyosensörlerde analitin tespit edilmesi amacıyla katı bir platformdan yararlanılmaktadır. Bu platformlar, analitin spesifik olarak tanınıp yakalanmasını sağlayan spesifik reseptörlerle kaplanmaktadır. Protein çalışmaları ele alındığı zaman kullanılan reseptör analite göre değişirken (antikor veya antijen); reseptör tarafından yakalanan analitlerin varlığının tespit edilmesi amacıyla nanomateryallerin çok düşük konsantrasyonlarda dahi tespit edilebilme özelliklerinden yola çıkılarak, ortama nanomateryal ile etiketlenmiş ikinci bir reseptör veya ikinci reseptörü tanıyan nanomateryal ile etiketlenmiş başka bir reseptör kullanılmaktadır. Düşük konsantrasyondaki analitlerin analizine olanak sağlayan nanobiyosensörler hastalıkların erken zamanda tespitleri konusunda ümit verici sistemlerdir [39].

Materyal bilimi ve sentetik kimya alanındaki gelişmeler, nanopartiküller (nanotüpler, nanoçubuklar, nanoküreler ve nanoteller), nanodizilimler ve kompozit formunda olan yüksek kaliteli nanomateryallerin üretimini mümkün kılmaktadır. Nanomateryallerin mikroölçekli sistemlere karşın sahip oldukları ayarlanabilir boyut özellikleri, yüksek yüzey-hacim oranı, şekle bağımlı özellikleri, düşük enerji tüketimi, minyatürleştirilmiş biyosensörler ve düşük maliyet gibi özellikleri sayesinde biyosensörlerde kullanılmaktadırlar [39].

Nanoteknoloji alanında uygulanan 'aşağıdan yukarıya' yaklaşımı, biyolojik algılama sistemlerindeki gereksinime spesifik olarak farklı nanomateryaller sağlamaktadır. Boyut ve şekle dayalı fiziksel, kimyasal ve elektrokimyasal özellikleri sayesinde uygulamalarda oldukça kullanışlı hale gelen materyaller üzerine çalışmaların önem kazandığı belirtilmektedir [35].

2.3.3. Biyosensör uygulamalarında kullanılan nanopartiküller üzerine biyomoleküllerin immobilizasyon stratejileri

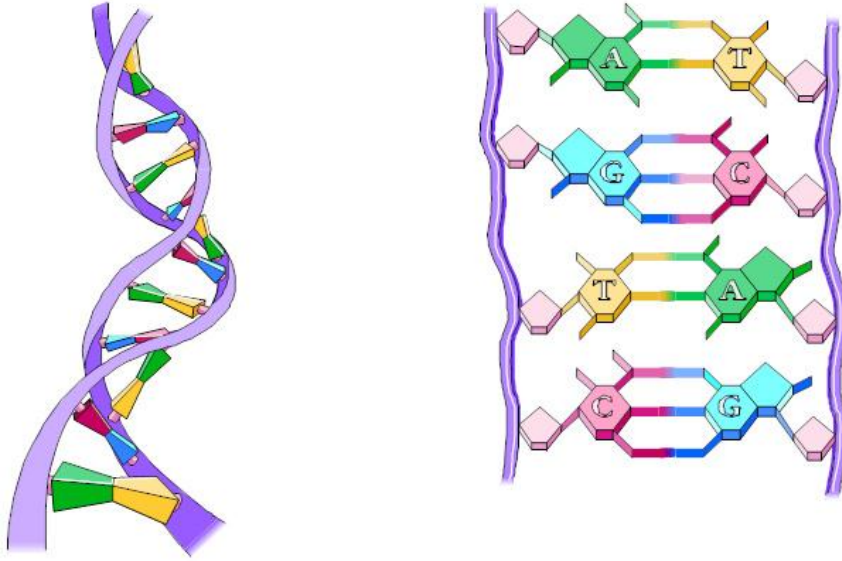
Nanomateriyallerin kullanıldığı sistemlerde problemlerin immobilizasyonu basamağı sistemin bütünlüğü açısından önem arz etmektedir. Biyomoleküllerin oryantasyon ve konformasyonlarının kontrolü ve bunlara bağlı olarak biyoaktivitenin sağlanması uygun immobilizasyon tekniğinin uygulanmasına bağlıdır. Biyomoleküllerin aktif konformasyonlarının korunması ise biyosensörlerin stabilitelerinin ve tekrarlanabilir sinyallerin elde edilebilmesini doğrudan etkilemektedir. Proteinler, DNA ve hücrelerin çeşitli yüzeylere direkt olarak adsorpsiyonunun biyomoleküllerin aktivitelerine etkisi söz konusu olduğundan immobilizasyon aşamasında olumsuz etkileri azaltan bağlayıcı ajan kullanma veya kovalent bağlanma gibi seçeneklerden yararlanılmaktadır [39]. Adsorpsiyon tekniği kullanılarak boya ile etiketlenmiş DNA'ların altın nanopartiküller üzerine adsorpsiyonu üzerine çalışma yapılmış ve tiol grupları üzerinden gerçekleşen bağlanmaya göre daha basit ve hızlı bir şekilde gerçekleştiğine karar verilmiştir. Ancak adsorpsiyon sonucunda homojen olmayan ve hassasiyeti düşük bir sistem olduğu gözlenmiştir [40]. Öte yandan nanomateriyal yüzeylerine bağlanmış olan mesafeci veya bağlayıcı moleküller üzerinden kovalent olarak biyomoleküllerin bağlanmasının stabilizeyi ve aktivasyonu sağladığı belirtilmektedir [39].

2.4. Deoksiribonükleik Asit'in Genel Özellikleri

Deoksiribonükleik asit'in (DNA) genetik materyal olarak önemi ve anlamı, çift sarmal yapısının kavranmasından sonra değer bulmaya başlamıştır. Dört nükleotidin doğrusal olarak sıralanmış halde olması, DNA'nın sahip olduğu kritik özellik olarak belirtilmektedir. Bu dört baz sayesinde sperm ve yumurtadan, gelişmiş bir organizma haline kadar olan gelişimi sağlayacak olan gerekli tüm bilgileri içermektedir.

DNA aromatik bazlar (pürin ve pirimidin halkaları), riboz şeker ve fosfat gruplarından oluşmaktadır. DNA yapısı deoksiriboz şeker grubunu içerirken; ribonükleik asit (RNA) yapısında ise riboz şeker bulunmaktadır. Deoksiriboz şeker, riboz şekerin bir türevidir ve aralarındaki fark 2' konumundaki hidroksil (-OH) grubunun, hidrojen (-H) ile değiştirilmiş olmasından kaynaklanmaktadır. İçerdiği bazlar bakımından ise pürin halkası (karbon ve azottan oluşan) içeren 2 farklı heterosiklik aromatik baz olan adenin ve guanin yanında; pirimidin bazları olarak da timin, sitozin ve RNA yapısında yer alan urasil yapıda bulunmaktadır. DNA ve RNA'da nükleotidler birbirlerine 3'-5'

fosfodiester bağı üzerinden bağlanmaktadır. Bu bağı, DNA'nın biyokimyasal sentezi sırasında DNA polimeraz enzimi tarafından oluşturulmaktadır. Polinükleotit yapısında vurgulanması gereken nokta, 5' ve 3' diye adlandırılan iki belirgin uç noktasına sahip olmasıdır. Genellikle 3' ucunda hidroksil grubu (3' OH) ve 5' ucunda fosfat grubu (5' PO₄) bulunması, DNA sarmalına polarite özelliği katmaktadır. Ayrıca fosfat iskeleti üzerinde yer alan baz dizileri ise genel olarak 5' ucundan 3' ucuna doğru yazılarak ifade edilmektedir.



Şekil 2.5. DNA çift sarmal yapısı ve bazlar arası bağı yapısı

DNA yapısı, bazların çevreden kaynaklanabilecek kimyasal modifikasyonlardan fiziksel olarak korumaktadır. Her bir bazın hidrojen bağı oluşturan yüzeyi çift sarmal yapısının iç tarafında yer alırken; fosfat iskeleti ise sarmal yapının dış kısmında yer almaktadır. Bu şekildeki bir tasarım ise yapıya monoton ve tekdüze olması gibi özellikler kazandırmaktadır [41].

2.4.1. DNA yapısını etkileyen faktörler

DNA sarmal yapısını birarada tutan bazlar arası hidrojen bağlarını fiziksel veya kimyasal yollarla açılması durumu denatürasyon olarak adlandırılmaktadır. Denatürasyon, ortam ısısının değişimi, pH değişimi ve bazı proteinlerin ortama eklenmesi ile meydana gelebilmektedir. İki farklı DNA dizisi arasındaki farkların bulunması çalışmalarında denatürasyon özelliğinden yararlanılmaktadır [42]. Denatürasyonu etkileyen faktörler ise; DNA tipi ve DNA yapısının içerdiği G+C miktarıdır. Homojen DNA yapılarının kısa bir ısı aralığında erime spektrumuna

sahipken heterojen DNA'ların daha geniş bir spektruma sahip olması DNA tipi ile ilgili bir durumken; yapıda bulunan GC miktarının moleküle ekstra bir stabilite kazandırarak T_m derecesini etkilemesi ise yapıdaki G+C miktarıyla alakalıdır. Ayrıca renatürasyon basamağının da T_m 'nin 10 °C altında yapıldığı belirtilmektedir [21].

DNA sarmal yapısını bir arada tutan hidrojen bağlarının kırılması ve iplikçiklerin birbirinden ayrılması ısı, alkali veya asitle sağlanabilmektedir. Daha sonra ortamın sıcaklığındaki değişim yapının yapının tekrardan eski halini almasında önem arz etmektedir. DNA solüsyonunun hızlı bir şekilde soğutulması veya nötralizasyonu durumunda DNA yapıları rastgele katlanarak bir yapı oluşturup dizilimdeki bazı bazlar arasında hidrojen bağı oluşabilmektedir. Ortam sıcaklığının yavaşça soğutulması durumunda ise DNA yapısı tekrardan orijinal çift sarmal yapısı elde edilmekte ve tamamlayıcı bölgelerin bir araya gelmesine 'hibridizasyon' denilmektedir. Türler arasındaki genetik uzaklığın belirlenmesi amacıyla genom düzeyinde yapılan çalışmalarda DNA'ların hibridizasyon özelliğinden yararlanılmaktadır [41, 43].

2.4.2. DNA biyosensörleri

Literatürde yer alan DNA analizine yönelik çalışmalar incelendiği zaman DNA biyosensör ve mikrodizilimlerinin geliştirilmesi üzerine yapılan uygulamalarının önemli derecede ilgi çekici bir konu haline geldiği görülmektedir. DNA tespitine dayalı analizler birçok alanda kullanılmaktadır. DNA teşhisi, gen analizleri, biyolojik savaş ajanlarının hızlı bir şekilde tespiti ve adli uygulamalar yaygın kullanım alanlarına örnek olarak verilebilir. Moleküler düzeyde yapılan çalışmalarda mutasyona uğramış genetik yapıların tespiti ise bir hastalık sendromunun ortaya çıkmadan erken tanı konulabilmesi bakımından oldukça önem arz etmektedir.

Bir çözelti içerisinde veya katı bir destek maddesi üzerinde DNA hedef molekülünün tamamlayıcı dizilimi ile hibridizasyonuna dayalı sistemler tanımlanmıştır ve DNA dizilimlerinin belirlenmesini sağlayan optik ve elektrokimyasal tespite dayalı homojen analizler geliştirilmiştir. Ancak bu sistemlerin dezavantajı sürekli izlemeyi ve minyatürleştirmeyi mümkün kılmamalarıdır. Öte yandan DNA biyosensörleri ve mikrodizilimleri, DNA hibridizasyonunun sürekli, hızlı, hassas ve seçici olarak tespitini sağlamanın yanında tekrar kullanılabilirliğiyle de diğer yöntemlere karşın önemli bir alternatif olarak karşımıza çıkmaktadır.

DNA biyosensörleri (genosensörler) ve DNA mikrodizilimleri (gen çipleri, DNA çipleri veya biyoçipler) uygulamalarında tamamlayıcı nükleik asit dizilimlerinin tercihli olarak birbirlerine bağlanmasından yararlanılmaktadır. DNA probunun yüzeye immobilize edilmesi ve bu prob tamamlayıcı dizilime sahip hedef molekülün hibridizasyon yoluyla yakalanması sistemin çalışma prensibini ifade etmektedir. DNA biyosensörlerinde, DNA mikrodizilimlerinden farklı olarak DNA probu doğrudan transdüktör üzerine immobilize edilirken; DNA mikrodizilimlerinde cam, plastik veya silikon destek materyallerinden yararlanılmaktadır. Yapılacak olan uygulamaya göre immobilizasyon tekniğinin seçimi önemli bir noktadır. Adsorpsiyon, kovalent immobilizasyon ve avidin-biotin etkileşimleri genel olarak kullanılan immobilizasyon yöntemleridir. DNA hibridizasyonunun transdüksiyonunun ölçülebilmesi amacıyla optik, elektrokimyasal veya kütle hassas cihazlardan yararlanılmaktadır [44].

2.5. Genetik Modifiye Organizmalar

Son yıllarda hızla artan dünya popülasyonunun ihtiyaçlarını karşılayacak şekilde gıdaların kalitesinde ve miktarında iyileştirme sağlayabilmek amacıyla yeni biyoteknolojik metotlar kullanılmaktadır. DNA rekombinant teknolojilerinin kullanımı ise hükümetlere ait düzenlemelerde güvenli olup olmadıklarını değerlendirme durumunda bırakmıştır. Genetik modifikasyon (GM) 1990'lı yılların ortalarından beri hızla büyüyen ve tarımsal verimliliği artırmada oldukça etkin olan bir metot olmasına karşın kullanılan teknoloji tüketiciler tarafından anlaşılammıştır. *Bacillus thuringiensis* bakterisinden alınıp mısırlara gen aktarımı yapılarak böcek zararlılarına karşı dayanıklı bir tür oluşturulması GM metodu için bir örnek oluştururken, GM gıdalar terimine alternatif terim olarak biyoteknolojik türetilmiş (BT) terimi önerilmiştir. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak yeni bitkilerin ıslah edilmesi birçok açıdan önem arz etmektedir. Hem ekonomik hem de besinsel açıdan önem taşıyan bu çalışmalarda gıdaların besinsel kalitesi, raf ömrü, randıman gibi özelliklerinin yanında zararlılara, hastalıklara ve çevresel faktörlere dayanıklılıklarını artırılması; ayrıca tarımsal alanda ağaç yetiştiriciliğinde ağaçların büyüme evresini kısaltarak minimum sürede ürün elde edilebilmesi gibi özellikler kazandırılmaya çalışılmaktadır [17].

Tahıllarda, gıdalarda ve bileşenlerde genetik modifiye organizma (GMO) varlığının düzenlenmesi dünya çapında yasa haline getirilince GMO içeren gıdaların güvenilir

ve hassas bir şekilde analizini sağlayacak metotların geliştirilmesi gerekliliği doğmuştur. Bu alanda DNA ve proteine dayalı uygulamalar bulunmaktadır.

Avrupa birliği yasalarına göre GMO içeren ürünlerin etiketlenmesi ve yine bu yasaya göre gıdaların % 1'den fazla olmayacak şekilde GM gıda ürünleri içerebileceği belirtilmektedir. ABD'de ise GMO içeren gıdaların etiketlenmesi isteğe bağlı bir durum olmasına karşın, firmaların böyle bir ürünü piyasaya sürmeden en az 120 gün önce bu yönde bir niyetleri olduğunu Amerikan İlaç ve Gıda Dairesi'ne (FDA) bildirmeleri zorunlu kılınmıştır [18].

2.5.1. Genetik modifiye organizmaların protein temelli analiz yöntemleri

Antikorların kullanıldığı immünolojik test teknolojileri kompleks matrikslerdeki bilinen hedef analitlerin kalitatif ve kantitatif olarak tespiti için ideal sistemlerdir. Söz konusu olan hedef analitler birçok proteini temsil etmektedir [19]. Her bir uygulamada istenilen spesiflik, maliyet ve zaman gibi özelliklere bağlı olarak hem monoklonal hem de poliklonal antikorlar kullanılabilir. Katı bir faz üzerine bağlanmış olarak uygulanan immünolojik testler iki farklı formatta kullanılmaktadır. Bu formatların biri olan rekabetçi analizlerde analit ve dedektör, yakalama antikoruna ile bağlanmak üzere birbirleriyle yarışırken; diğer bir formatta ise analit, yakalama antikoruna ile dedektör antikor arasında sandviç yapı oluşturularak yakalanmaktadır [18, 45]. Protein temelli analiz yöntemlerinden bir olan Western blot yöntemi, örnek içerisindeki hedef proteinin önceden belirlenmiş sınır seviyesinin altında mı üstünde mi olduğunu gösteren kalitatif sonuçlar sunmanın yanında yüksek hassasiyet göstermektedir [46]. Enzim bağlantılı immünosorbent analizi (ELISA) ise mikrokuyucuklar ve kaplanmış tüp formatında kullanılabilir. Antikor kaplı mikrokuyucuklarda yapılan analizler kantitatif olup yüksek hassasiyet, ekonomik ve proteinlerin denatüre olmaması gibi özelliklere sahipken; örneklerde var olan konsantrasyon miktarları plaka okuyucusu yardımıyla elde edilmektedir. Antikor kaplı tüp formatı ise daha çok alan testlerinde yararlanılan, kalitatif sonuçlar üreten ve tüplerdeki sonuçların tüp okuyucuları veya gözle okunabilmektedir. Ancak kantitatif iç standart bulunmayan bu analizlerle gıdaların bileşenler düzeyinde GMO içeriği hakkında bilgi alınması mümkün olmamaktadır. Mikro kuyucuklar yerine şeritlerin kullanılmasıyla ise lateral akış şeritleri geliştirilmiştir. Bu şeritler üzerinde bir tanesi hedef protein sandviğine, diğeri ise renk maddesine bağlanmış antikorlara spesifik olan iki bölge bulunmakta ve hedef

protein varlığı bu bölgelerdeki renk değişimleri üzerinden takip edilmektedir [18]. ELISA ve lateral akış şeritlerinden farklı olarak katı destek materyali olarak manyetik partiküller de kullanılmakta ve yakalama antikoları ile kaplanmış olan partiküller reaktant ile etkileştirildikten sonra mıknatıs yardımıyla ortamdan alınmaktadır [19]. Bu yöntemler arasında ELISA yöntemi ham maddelerde, yarı işlenmiş ürünlerde ve işlenmiş bileşenlerde GMO analizi için tercih edilmektedir. ELISA yöntemi hedeflenen protein yapısına zarar vermeden tespitini sağlarken; polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yöntemlerine göre düşük tespit gücüne sahip olması ve fazla bileşen içeren ürünlerde hassasiyetin de yeterince iyi olmaması yöntemin dezavantajları olarak belirtilmektedir [47].

2.5.2. Genetik modifiye organizmaların DNA temelli analiz yöntemleri

GMO içeren gıdaların DNA temelli tespit yöntemleri birbirine spesifik tamamlayıcı DNA yapılarının hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu alanda kullanılan birçok teknik olmasına rağmen Southern blot ve PZR teknikleri yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikrodizilim analizleri üzerine çalışmalar da devam etmektedir. Southern blot yönteminde izole DNA yapısı membran üzerine sabitlendikten sonra GMO'ya spesifik etiketlenmiş nükleik asit proplar üzerinden radyograflar aracılığıyla, fluorimetrik olarak veya kemilüminesans yoluyla tespit edilmektedir. Bu alanda kullanılan farklı PZR yöntemleri bulunmaktadır. Bu yöntemler; kalitatif PZR, kantitatif son nokta PZR, kantitatif gerçek zamanlı PZR olarak belirtilmektedir. Gerçek zamanlı PZR yöntemi geleneksel yöntemde miktar tayini sonuçlarının kesinliği ile ilgili ortaya çıkabilecek sıkıntılara çare olarak geliştirilmiştir. Deney sonuç sonuçlarının kesinliği gerçek zamanlı PZR yönteminde DNA konsantrasyonunun üstel fazdaki PZR çevrimi ile orantılı olmasıyla sağlanırken, bu yöntemin daha düşük miktarlardaki DNA kopyasını tespit edebildiği de belirtilmektedir [48].

Bu çalışmada, GMO organizmaların tayinine olanak sağlayacak, DNA tespitine dayalı analiz yöntemi geliştirilmesi üzerine yoğunlaşmıştır. Bu amaçla biyosensör uygulamalarında hızlı ve hassas analiz yöntemlerinde kullanılan nanopartiküllerin ve Raman spektroskopisi sisteminin avantajlarından yararlanılmıştır. Manyetik partikül ve Raman etiketi şeklinde hazırlanan raportör partiküllerin kullanılarak sandviç yapı oluşturulması çalışmada temel alınan yöntem olarak belirlenirken; farklı özelliklere

sahip olan nanopartiküller kullanılarak ortamdan daha iyi ayırım sağlayan, yüksek hassasiyete sahip bir sistemin elde edilmesi amaçlanmıştır.

Öncelikle çalışmada kullanılacak olan nanopartiküllerin modifikasyonları için gerekli olan optimum koşullar ile ilgili yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) cihazı kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Daha sonra DNA hibridizasyonunu için gerekli koşullar da yine HPLC kullanılarak çalışılmıştır. İlerleyen aşamalarda temel alınan sistemdeki spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilebilmesi için partiküller üzerinde açıkta kalan aktif uçların blokasyonu üzerine farklı ajanlar kullanılarak bu sorun giderilmeye çalışılmıştır. Son olarak da sistemin çalışılabilirliği ve kullanılan partiküllerin uygulanan sistem üzerindeki etkileri araştırıldıktan sonra YGRS tekniği kullanılarak hedef dizilim tayini yapılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasal ve biyokimyasal materyaller

Çalışmada; hidrojen tetrakloroaurat (HAuCl_4), 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA), hekzaadesiltrimetil-amonyum bromit (CTAB), L-askorbik asit (AA), N-(3-dimetillaminoprobil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorid (EDC), saf etanol %99.5 (Merck), glutaraldehit %25 w/w (Aldrich), 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoik asit) (DTNB) Acros (New Jersey, A.B.D.), N-hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu (NHS) Pierce Biotechnology (Bonn, Almanya), sığır serumu albümini (BSA) (Sigma, ABD) % 98 etanolamin (Sigma Aldrich), alanin (Acros, ABD) şeklinde listelenmiş olan kimyasal ve biyokimyasal maddeler kullanılmıştır.

3.1.2. Oligonükleotit dizilimleri

Oligonükleotit dizilimleri Alpha DNA (Quebec, Kanada) firmasından sağlanmıştır. Kullanılan oligonükleotit dizilimleri Çizelge 3.1.'de gösterilmektedir.

Çizelge 3.1. Oligonükleotit dizilimleri

Prob 1	5'-NH ₂ -AAA AAT CGG CAG AGG CAT-3'
Prob 2	5'-CGA TGG CCT TTC CAA AAA-NH ₂ -3'
Hedef	5'-GGA AAG GCC ATC GTT GAA GAT GCC TCT GCC GA-3'

3.1.3. Tampon çözeltiler

Yapılan bu çalışmada kullanılan tampon fosfat tamponlu tuz (PBS) ve yıkama çözeltisi olarak kullanılan tween eklenmiş PBS (PBST) için Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 J.T.Baker (Deventer, Hollanda), Tween® 20 Merck (Darmstadt, Almanya), NaCl Sigma (St Louis, A.B.D.) firmasından sağlanmıştır. 2-(N-morpholino)ethansülfonik asit (MES) tamponu tamponunun hazırlanması amacıyla Sigma (St Louis, A.B.D.) firmasından temin edilen MES monohidrat kullanılmıştır. Deneysel çalışmaların seyri süresince kullanılan tüm tamponlar deiyonize su kullanılarak hazırlanmıştır.

3.1.4. Ölçüm sistemleri

Çalışma boyunca immobilizasyon ve hibridizasyon aşamalarında uygulanacak parametrelerin optimizasyonu çalışmaları Agilent 1100 serisindeki Zorbax 4,6 × 250 mm, 5 mm GF-250 jel filtrasyon kolon ve diyot array dedektör içeren HPLC yapılmıştır (Agilent Technologies, CA, A.B.D.). Akış hızı 0,5 mL/dk olarak ayarlanırken; PBS tamponu (0,2 M, pH 7,4) mobil faz olarak kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 25 °C'de 50 µL olarak ayarlanmış ve ölçümler 260 nm'de alınmıştır. Prob ve hedef dizilimleri içeren çözeltilerin kolondan ayrılma süreleri yaklaşık 6 dk'dır.

Çalışmada kullanılması amacıyla sentezlenen altın nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları fotodiyot analiz dedektörüne sahip Agilent 8453 UV-Visible spektrofotometre (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, A.B.D.) ile kaydedilmiştir.

Genetik materyalin tespiti için kurgulan sandviç yapının oluşturulması, Raman etiketleriyle modifiye edilmiş işaretçi nanopartiküllerin en düşük tespit edilebilen tanecik sayısı ve spesifik olmayan bağlanmalar üzerine yapılan çalışmalardaki ölçümler DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc., Laramie, WY, A.B.D.) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel (numune tutma) haznesi ve CCD dedektör ile yapılmıştır. Cihaz parametreleri ise 20x objektif ve yaklaşık 30 µm lazer spot alanı, 150 mW lazer gücü olarak ayarlanmıştır.

3.2. Metot

3.2.1. Tampon çözeltilerinin hazırlanması

Altın kaplı nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları sırasında kullanılan MES Monohidrat tampon çözeltisi hazırlanırken 0,05 M MES monohidrat çözeltisi deiyonize su içerisinde çözüldürüldükten sonra; derişik NaOH çözeltisi kullanılarak pH değeri 6,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Daha çok hibridizasyon aşamasında yararlanılan PBS tamponu çözeltisinin hazırlanmasında ise 0,2 M konsantrasyonundaki Na₂HPO₄ ve KH₂PO₄ çözeltileri karıştırıldıktan sonra istenilen tuz konsantrasyonunu elde edecek şekilde çözeltiye NaCl eklenir ve bu şekilde pH değeri 7,4 olan PBS tamponu hazırlanmaktadır.

Spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması amacıyla denenen yıkama prosedürlerinde kullanılan PBST çözeltisi için hazırlanmış olan 0,2 M PBS tamponu (pH 7,4) üzerine % 1 (v/v) oranında Tween 20 ilave edilmiştir.

3.2.2. Nanopartiküllerin sentezi

Bu çalışmada silika kaplı 3-aminopropiltrietoksisilan (APTS) modifiyeli manyetik nanoküre, altın kaplı manyetik nanoküre ve işaretçi partikül olarak da altın nanoçubuk partiküller kullanılmıştır.

3.2.2.1. Demir nanopartiküllerin sentezlenmesi

Manyetik nanopartiküllerin sentezlenmesi amacıyla öncelikli olarak Fe_3O_4 nanopartikülleri sentezlenmektedir. Literatürde yer alan çalışmalarda Fe(III):Fe(II) (2:1 molar oranı) karışımı bazik ortamda demir tuzlarını oluşturmakta ve bu tuzların kontrollü bir şekilde yükseltgenmesiyle demir oksit nanopartikülleri elde edilmektedir. Bu reaksiyon genel olarak aşağıdaki eşitlikte gösterilebilir.



Yukarıda özetlenen durum ayrıntılı incelenecek olursa öncelikle Fe_3O_4 nanopartiküller Fe çökmesini (II), Fe (III) ile hazırlanmıştır. Fe (II) / Fe (III) oranı, bir alkali çözeltisi içinde 0,5 olacak şekilde muhafaza edilmiştir. Kısaca, 1,28 M $FeCl_3$ ve 0,64 M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ deiyonize su içinde eritilmiştir. Demir tuzları çözündürülene kadar çözelti kuvvetlice karıştırılmıştır. Daha sonra, 1 M NaOH çözeltisi 40 dakika boyunca karışım içine damla damla ilave edilmiştir. Çöktürülmüş manyetit renginin siyah olduğu gözlenmiştir. Siyah çökelti kalıcı bir mıknaş üzerinde toplanmış ve deiyonize su ile yıkanmıştır. Okside olmuş Fe_3O_4 nanopartikülleri elde etmek için demir tuzları ilk olarak 3 saat süreyle 2 M $HClO_4$ içinde yıkanmıştır. Argon atmosferi altında partiküllerin kahverengi renk aldıkları gözlenmiştir. Parçacıklar daha sonra 10000 devir/dk'da 20 dakika santrifüj edilmiş süpernatant çözeltisi atılmış ve sonrasında deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır.

Kimyasal sentez sonucu elde edilen kahverengi renkli demir nanopartikülleri kendiliğinden manyetik özellik göstermekte ve sulu çözeltide bu manyetik etkiden dolayı agregasyon gözlenmektedir. SEM görüntüsü alınarak demir nanopartiküllerinin homojen bir boyut dağılımı kontrol edilmiştir. SEM görüntüsü alüminyum tabaka üzerinde partiküller kurutulmuş ve alınmıştır. Yüksek manyetik özellikten dolayı demir nanopartiküller kurutulmuş durumda agregasyona uğramış halde gözükmektedir.

3.2.2.2. Altın kaplı Fe₃O₄ nanopartiküllerin sentezlenmesi

Au kabuk kaplama işlemi altın kaplı demir nanopartiküllerin saklanması için CTAB varlığında gerçekleştirilmiştir. Kısaca, 10 mg Fe₃O₄ nanopartiküller 5 mL su içerisinde süspansiyon edilmiş ve 1 M NaOH içinde hazırlanan 0,27 M EDTA ilave edilmiştir. Meydana gelen çözelti 5 dk için bir sonikatör içinde karıştırılmıştır. Parçacıklar daha sonra 10000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra, süpernatant atılmış ve nanopartiküllerin deiyonize su ile yıkanmıştır. Yıkama işlemi üç kez tekrarlanmıştır. Ortaya çıkan çökelti 7 ml 0,1 M CTAB, 3 mL, 0,01 M ve 300 µL HAuCl₄ 1 M NaOH ile karıştırılmıştır. Çözelti daha sonra kuvvetlice karıştırılmış, 150 mg hidrosilamin karışımı içine ilave edilmiş ve 3 dakika boyunca kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Sonuç nanopartiküller koyu kırmızı renkte elde edilmiş ve partiküller kullanmadan önce 24 saat beklemiştir.

3.2.2.3. Altın nanoçubukların sentezi

Altın nanoçubuklar, çekirdek ile büyütme tekniğinde küçük modifikasyonlar yapılarak çekirdek partiküllerinin (3-4 nm) kontrollü büyütülmesi ile sentezlenmiştir. Altın nanoçubukların sentezi için öncelikle boyutu 3-4 nm olan çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisi için bir vialle sırasıyla 7,5 mL 0,1M CTAB ve 250 µL 0,01 M HAuCl₄ çözeltisi konulup karıştırılmıştır. Bu çözeltinin üzerine daha önceden buz banyosunda soğutulan deiyonize su ile hazırlanmış 0,01 M NaBH₄ çözeltisinden 600 µL hızlı bir şekilde eklenmiştir. Oluşan çözeltinin rengi yeşil çay renginde olmakta ve çekirdek partiküllerinin kullanılması için oda koşullarında 15 dakika bekletilmesi gerekmektedir. Büyütme çözeltisi için bir vial içerisinde sırasıyla 4,75 mL 0,1 M CTAB, 50 µL 0,01M HAuCl₄, 15 µL 4x10⁻³ M AgNO₃ konulmuştur. Daha sonra üzerine 250 µL 0,01 M askorbik asit ilave edilmiştir. Bu aşamada koyu turuncu olan karışımın rengi askorbik asitin ilave edilmesi ile şeffaflaşmıştır. Bu aşamadan sonra, daha önce hazırlanıp 15 dakika bekletilmiş çekirdek çözeltisinden 2,5 µL alınarak büyütme çözeltisine eklenmiştir. Nanoçubuk sentezinin tamamlanması için üç saat boyunca oda sıcaklığında bekletilmesi gerekmektedir. Bu süre boyunca partikül çözeltisinin rengi şeffaftan koyu mavi tonlarına doğru yavaş yavaş değişmektedir [21].

3.2.2.4. Silika kaplanmış APTS modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllerin sentezi

Öncelikle sodyum sitrat modifiyeli manyetik nanopartiküller birlikte çöktürme yöntemiyle hazırlanmış ve su içerisinde dağıtılmıştır. 80 mL 0,5 M Fe^{+3} ve 40 mL Fe^{+2} sulu çözeltileri nitrojen gazı akışı bulunan deney tüpüne konmuştur. Ardından 10 mL % 25'lik $NH_3.H_2O$ hızlıca karıştırma sağlanan ortama eklendikten sonra siyah çökelti oluşmakta ve karıştırma işlemi 30 dk devam etmektedir. Oluşan ürün toplanıp tekrardan 300 mL hacimdeki 0,3 M sodyum sitrat içeren distile su içerisinde dağıtılarak, 1 saat boyunca 90°C'da karıştırma işlemi uygulanmaktadır. Son ürün süspansiyon içerisinde santrifüj yoluyla toplanarak distile su pH:7 olana kadar yıkanmakta ve bu şekilde Fe_3O_4 nanopartiküller elde edilmektedir.

Sentezlenen nanopartiküllerin silika kaplanması amacıyla ise etanol içerisinde hazırlanmış tetraetoksi silan çözeltisinden 5 mL alınarak 6 mL $NH_3.H_2O$ (25 w%), 50 mL H_2O , 250 mL etanol ve 3 mL önceki aşamada sentezlenmiş olan nanopartiküllerden oluşan karışım içerisine eklenerek 20 saat boyunca karıştırılmakta ve 9000 devir/dk'da santrifüj uygulanarak nanopartiküller ortamdan izole edilmektedir. Daha sonra etanol ile 4 kez yıkama yapılarak saflaştırma sağlanmakta ve 24 saat süreyle oda sıcaklığında vakum altında kurutma sağlanmaktadır.

Nanopartiküllerin APTS ile modifikasyonunu sağlamak için öncelikle 100 mg manyetik nanopartikül 50 mL tolüen içerisinde dağıtılmaktadır. Daha sonra 150 μ L APTS ortama eklenerek oda sıcaklığında 24 saat süreyle karıştırılmaktadır. APTS ile işlevselleştirilmiş manyetik silika nanopartiküller mıknatis yardımıyla toplandıktan sonra sırasıyla; tolüen, tolüen/metanol ve metanol ile yıkanıp vakum altında bir gece boyunca kurutulduktan sonra hazır hale gelmektedir [49].

3.2.3. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

Sentezlenen demir nanopartiküllerinin karakterizasyonunu için SEM, TEM, EDAX, XRD ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Sentezlenen manyetik nanopartiküllerinin ve altın nanoçubukların karakterizasyonu için ise UV-Vis spektrofotometre ve TEM ölçümleri kullanılmıştır.

3.2.4. DNA tayinine yönelik analiz yönteminin geliştirilmesi

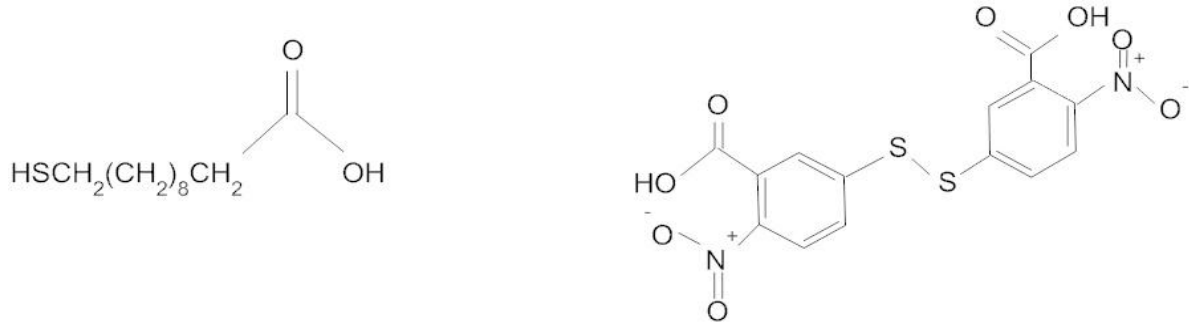
3.2.4.1. Optimizasyon çalışmaları

Çalışmanın sonucunu etkileyebileceği düşünülen tüm parametrelerin optimizasyonları üzerine çalışmalar yapılmıştır. İlk basamak olarak kullanılacak olan nanopartiküllerin her biriyle ilgili (silika kaplı APTS modifiyeli nanopartikül, altın kaplı manyetik nanoküre, altın çubuk ve altın küre) belirli optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu çalışmalar kapsamında APTS modifiye edilmiş silika kaplı manyetik partiküllerin yüzey aktivasyonunun gerçekleştirileceği tampon, yüzey aktivasyonun farklı bir protein ile kontrolü ve ardından yüzeye bağlanacak optimum prob dizilim miktarları üzerine çalışılmıştır. Altın kaplı manyetik küre ile ilgili olarak ise öncelikle yüzeyde kendiliğinden düzenlenen tabaka (SAM) oluşturulurken çözücünün etkisi araştırılmış, ardından ise yüzeye bağlanacak optimum prob dizilimi miktarı 0,5–5 μM aralığında çalışılarak belirlenmiştir. Manyetik partiküllerin yüzeylerine bağlanacak optimum prob dizilim miktarının belirlenmesi amacıyla yüzey aktivasyonu yapılan partiküller belirli konsantrasyonlardaki prob dizilimleri ile etkileştirildikten sonra partiküller manyetik olarak ortamdan ayrılmış ve bağlanmayan prob dizilim miktarına HPLC’de bakılmıştır. Bu veriler kullanılarak da bağlanan miktarlar hesaplanmıştır. Çalışmada önemli bir yere sahip olan ve işaretçi olarak kullanılan altın nanoçubuklarla ilgili olarak da farklı konsantrasyonlarda DTNB ile SAM oluşturulmasının, kullanılan partikül miktarının ve birkaç kez SAM uygulamasının elde edilen Raman bant şiddetleri üzerine etkisi araştırılmıştır. Daha sonra ise manyetik partiküllerde olduğu gibi yüzeye bağlanan optimum dizilim miktarının bulunması amacıyla 1-5 μM aralığındaki konsantrasyonlarda prob dizilimleri ile etkileştirilip yine bağlanmayan prob dizilim miktarlarına HPLC’de bakılarak bağlanan miktarlar hesaplanmıştır. Manyetik partiküllerden farklı olarak altın nanoçubukların ortamdan ayrılması amacıyla manyetik özellikleri olmamasından ötürü santrifüj uygulanmıştır. Partiküllerle ilgili belirtilen çalışmalar yapıldıktan sonraki adım olarak DNA hibridizasyonu üzerine etkisi olduğu belirtilen tamponun içerdiği tuz konsantrasyonu (150 mM-1050 mM), ortam sıcaklığı (25-75 °C) ve hibridizasyon süresi (0-90 dk) gibi parametrelerle ilgili çalışılmalar yapılmıştır. Sandviç yapı oluşturulurken spesifik olmayan bağlanmanın önüne geçilebilmesi amacıyla modifiye edilen nanopartiküller üzerinde açıkta kalabilecek bölgeleri kapatmak üzere BSA, alanin ve etanolamin gibi blokasyon ajanları kullanılırken; hibridizasyon basamağı sonrasında farklı yıkama prosedürleri

de uygulanmıştır. Yıkama prosedürlerinde saf etanol, PBS, PBST ile farklı varyasyonların etkisine bakılmıştır. Son olarak da nanopartiküller üzeri belirlenen koşullarda modifiye edilen manyetik partiküllerden hangisiyle çalışılacağı, hangi sıcaklık değerlerinde daha yüksek sinyaller elde edildiği ve modifiye edilmiş nanopartiküllerden manyetik ve işaretçi partiküllerin sırayla mı, aynı anda mı ortama katılmasının bant şiddetleri üzerine etkisi araştırılmıştır.

3.2.4.2. Nanopartiküllerin yüzeyine kendiliğinden düzenlenen tabakanın oluşturulması

Çalışmalarda kullanılan nanopartiküllerin yüzeyinde öncelikle kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturulmuş ve tüm yüzey modifikasyonları yüzeyde tabaka oluşturması sağlanan kimyasalların karboksil grupları üzerinden yapılmıştır. Yüzeyde SAM oluşumunun sağlanması amacıyla altın kaplı manyetik kürelerin üzerine saf etanolde çözüldürülmüş 150 mM 11-MUA (Şekil 3.1.) konularak 18 saat boyunca bekletilmiştir. İşaretçi olarak kullanılan partiküllerin üzerine ise bir Raman etiketi olan DTNB (Şekil 3.1.) kullanılarak SAM oluşturulmuştur. Kullanılan DTNB konsantrasyonu 50 mM olup; saf etanol içerisinde çözüldürülmüş ve yine partiküller çözelti içerisinde 18 saat bekletilmiştir. Her durumda da 18 saatlik etkileşim süresi sonrasında saf etanol ile yıkama yapılarak ortamdaki yüzey ile etkileşmemiş olan fazla miktardaki moleküllerin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Yıkama basamaklarında manyetik partiküller mıknatıs ile toplanırken; manyetik olmayan işaretçi partiküller ise santrifüj (6000 devir/dk, 6 dk) yapılarak toplanmakta ve içerisinde partikül kalmayan berrak çözelti mikropipet kullanılarak ortamdan uzaklaştırılmaktadır. Devamında istenilen tampon yeniden partiküllerin üzerine eklenip karıştırıldıktan sonra partiküller belirtildiği şekilde ortamdan ayrılarak yıkama basamakları artırılabilir.



Şekil 3.1. 11-merkpto undekanoik asit ve 5-5 ditiobismerkpto nitrobenzoik asit'in kimyasal yapısı.

Silika kaplı ve yüzeyi 3-aminopropiltrietoksisilan (APTS) modifiyeli manyetik partiküllerdeki modifikasyon basamakları APTS molekülü üzerinden sağlandığından bu partiküllerin yüzeyinde ayrıca SAM oluşturulmamıştır.

3.2.4.3. Yüzeyde oluşturulan grupların aktivasyonu

Altın kaplı nanopartiküllerin yüzey aktivasyonun sağlanması amacıyla 0,05 M NHS ve 0,2 M EDC içeren pH 6,5 olan 0,05 M'lık MES tamponu içerisinde EDC-NHS çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan çözelti yüzeyine SAM oluşturulmuş olan nanopartiküllerin üzerine eklenip, 40 dk muamele edilerek yüzeyde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Yüzey aktivasyonu için gerekli bekleme süresinden sonra MES tamponu ile yıkama yapılmıştır.

Silika kaplı APTS modifiyeli manyetik partiküllerin yüzey gruplarının aktivasyonu ise glutaraldehit kullanılarak yapılmaktadır. Bu amaçla PBS (150 mM NaCl, pH:7,40) tamponu içerisinde 1 mg/mL konsantrasyonunda hazırlanan manyetik nanopartiküllerin üzerine son hacimde ağırlıkça % 6 olacak şekilde glutaraldehit çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 1 saat süreyle muamele edilmekte ve bu şekilde yüzeyde aktif aldehit grupları oluşturulmaktadır. Aktivasyon basamağından sonra yine ortamda etkileşmemiş halde bulunan fazla moleküllerin aktivasyonun gerçekleştirildiği tamponla yıkanarak ortamdaki uzaklaştırılması sağlanmıştır.

3.2.4.4. Probların nanopartiküller üzerine immobilizasyonu

Yüzey aktivasyonu sağlanan nanopartiküllerin üzerine, optimizasyon çalışmalarında belirlenen konsantrasyonlarda prob konularak immobilizasyon gerçekleştirilmiştir. Altın kaplı nanopartiküllerin immobilizasyonu MES tamponunda gerçekleştirilirken,

silika kaplı manyetik nanopartikülün immobilizasyon tamponu olarak ise PBS kullanılmıştır. Prob çözeltilerinin, nanopartiküllerin üzerine eklenmesinden itibaren 40 dk süreyle etkileştirildikten sonra yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

3.2.4.5. Nanopartiküllerin üzerinde açıkta kalan aktif grupların blokasyonu

Yapılan çalışmada spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek amacıyla nanopartiküllerin yüzeyine prob immobilizasyonu gerçekleştirildikten sonra açıkta kalan aktif grupların blokasyonu amacıyla çeşitli ajanlar denenmiş ve sonuç olarak BSA molekülünün kullanılmasına karar verilmiştir. Bu amaçla prob immobilizasyonu yapılan nanopartiküllere yıkama işlemi yapıldıktan sonra yine immobilizasyon tamponları içerisinde 3 mg/mL civarında konsantrasyona sahip olacak şekilde BSA çözeltileri hazırlanıp nanopartiküller üzerine eklenerek 40 dk süreyle muamele edilmiş ve her basamakta olduğu gibi ortamda fazla miktarda kalan kimyasalları uzaklaştırmak amacıyla yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir.

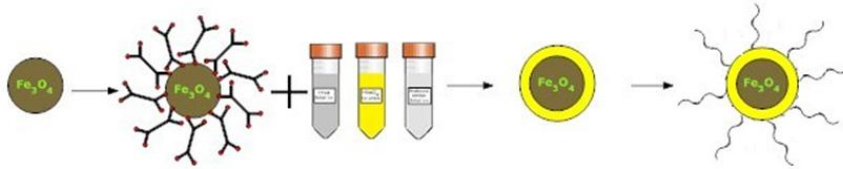
3.2.4.6. Ortamdaki hedef molekülün nanopartiküllerle yakalanması ve sandviç yapının oluşturulması

Çalışmanın bu aşamasında yukarıda belirtildiği gibi prob ve blokasyon ajanı ile modifiye edilmiş nanopartiküller kullanılmıştır. Hibridizasyon için optimize edilen ve daha önceki çalışmalardan refere edilen koşullara göre hibridizasyon sıcaklığı 60 °C, toplam süre 30 dk ve kullanılacak tampon olarak da PBS (750 mM NaCl, pH:7,40) belirlenmiştir. Bu aşamadaki amaç ortamdaki hedef dizilimin, partiküller üzerindeki hedef dizilimi tamamlayıcı problemler sayesinde ortamdan seçici olarak alınmasıdır. Yapılan optimizasyon çalışmalarında manyetik ve işaretçi partiküllerin aynı anda analiz ortamına katılmalarının daha yüksek bant şiddetleri elde edilmesine olanak sağladığı sonucuna varıldığından bu yönde planlama yapılmıştır. Kurgulanan deney düzeneği doğrultusunda modifiye edilmiş manyetik ve işaretçi nanopartiküller, hibridizasyon ortamına hazırlanmaları amacıyla önce birer kez hibridizasyon tamponuyla yıkanmış ve ardından yine hibridizasyon tamponu içerisinde hazırlanmış olan belirli konsantrasyonlardaki hedef dizilimler altın nanoçubuklar ile birlikte manyetik partiküller üzerine eklenmiş ve hibridizasyon koşullarında etkileştirilmiştir. Belirlenen süre sonunda manyetik partiküllerin yüzeyine gerçekleşen spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi amacıyla, oluşturulan sandviç yapıya 5-6 kez PBS ile yıkama işlemi gerçekleştirilmiştir. Belirtilen yıkama basamakları hedef dizilimi yakalayan partiküllerin, yapıdaki manyetik partiküllerden yararlanılarak ortamdan

manyetik yolla ayrılması ve her defasında ortama yeniden PBS eklenip karıştırıcıdan geçirilerek yeniden ayrımları sağlanması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Yıkama basamaklarının ardından da YGRS ölçümlerine geçilmiştir.

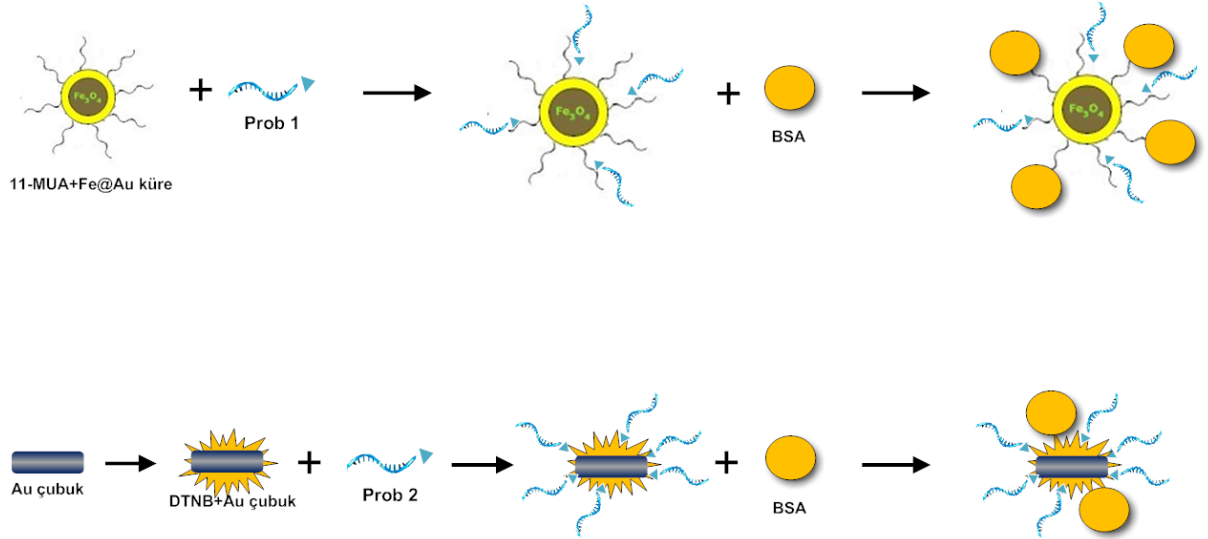
3.2.4.7. Sandviç yapı oluşturularak yakalanan hedef dizilimlerin YGRS ölçümleri

İşaretçi molekül olarak kullanılan altın nanoçubukların yüzeyinde SAM oluşturulurken kullanılan Raman etiketi olan DTNB molekülünün, Raman bantları hedef dizilimin belirlenmesinde kilit rol oynamaktadır. Belirli miktarlardaki hedef dizilimler ile etkileştirilen ve yıkamaları yapılmış olan nanopartiküller ölçümler için hazır hale getirilmiştir. Ölçümler hacme göre daha yüksek sinyal değerlerine ulaşılabilirdiğinden yüzeyde gerçekleştirilmiştir. Çözeltiden 1 µL çekilip, ince tabaka kromatografisi (TLC) üzerine damlatılarak Raman spektroskopisinde okumalar yapılmıştır. Kullanılan lazer seviyesi orta seviye olacak şekilde ayarlanırken etkileştirme süresi ise 12 sn olarak uygulanmıştır. Ortamdaki hedef molekül varlığı DTNB molekülüne ait olan 1331 cm⁻¹ dalga sayısında maksimum değerine ulaşan simetrik NO₂ bandı takip edilerek belirlenmiştir. Nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından YGRS ölçümlerine kadar uygulanan sistem aşağıda bulunan şekil 3.2’de şematize edilmiştir.

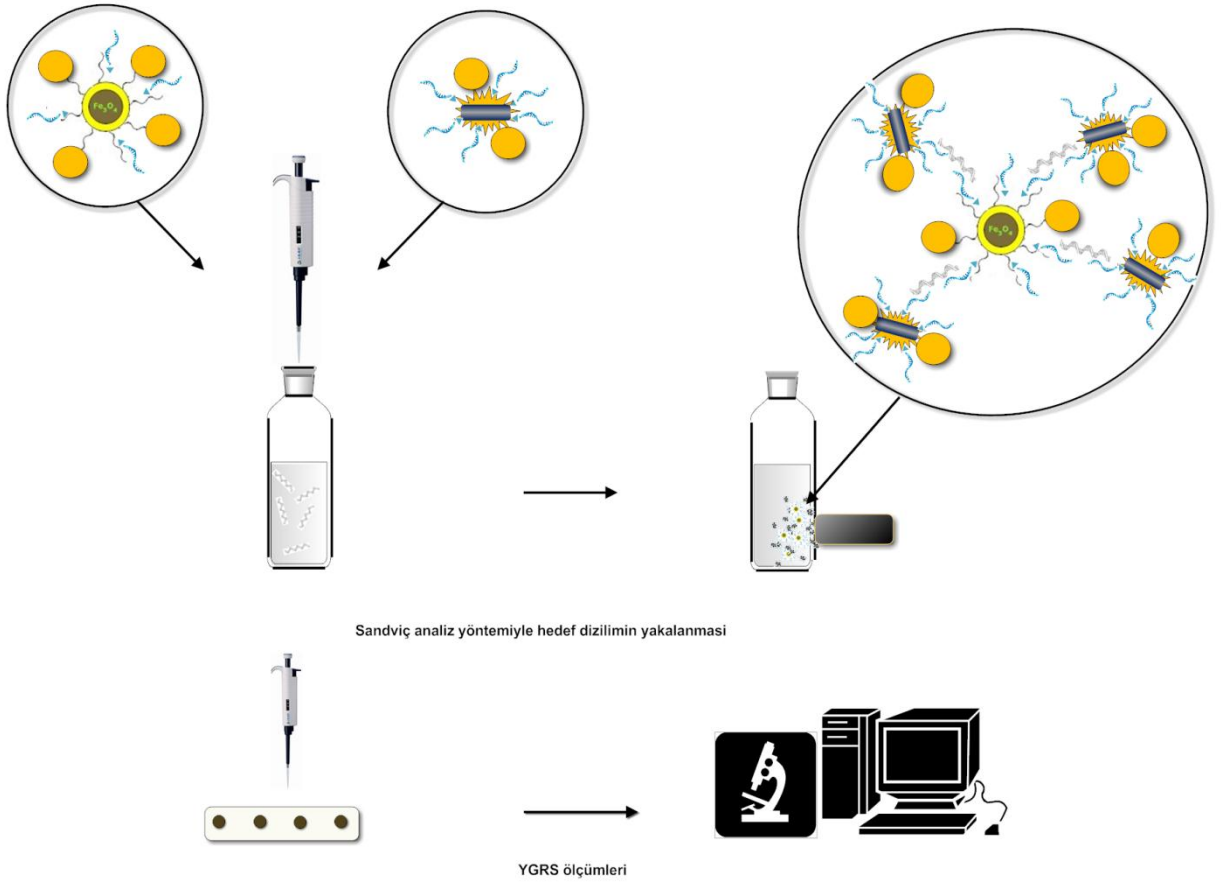


Manyetik nanopartikül sentezi

Şekil 3.2. Hedef dizilimin tayini amacıyla nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından YGRS ölçümlerine kadar izlenen yöntemin akış şeması.



Au kaplı nanopartiküllerin yüzey modifikasyonları



Şekil 3.2.(devamı) Hedef dizilimin tayini amacıyla nanopartiküllerin yüzey modifikasyonlarından YGRS ölçümlerine kadar izlenen yöntemin akış şeması.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

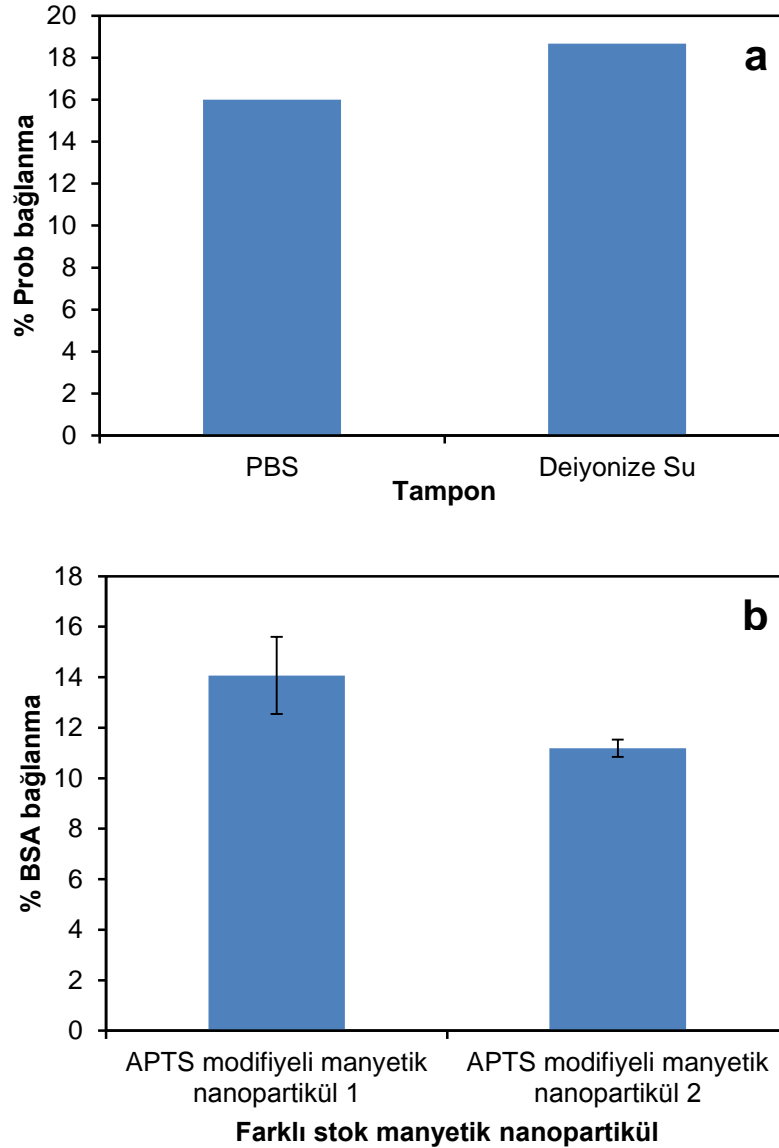
Yapılan çalışmada ilk adım olarak kurgulanan sistemde, standart nanopartiküllerin sentezlenmesi ve yüzey modifikasyonlarının yapılmasından başlanarak sandviç yapının oluşturulup hedef dizilimin tayin edilmesine kadar olan tüm aşamalarda uygulanacak parametrelerdeki optimum koşulların araştırılması ve elde edilen verilerin literatürdeki çalışmalarla da karşılaştırılarak optimum çalışma koşullarının elde edilmesi olarak belirlenmiştir. Bu hedef doğrultusunda standardize edilmiş yöntemlerle sentezlenen nanopartiküllerden altın kaplı nanopartiküllerin yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tabaka oluşturulmasında çözücünün etkisi araştırıldıktan sonra işaretçi partikül olarak kullanılan altın nanoçubuklardan elde edilen bant şiddetlerinin kullanılan DTNB konsantrasyonu ve birim hacimdeki partikül miktarı ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Diğer taraftan silika kaplanmış APTS modifiye edilmiş manyetik partiküllerin yüzey aktivasyonu için uygun tampon ve aktivasyonun farklı bir molekül ile kontrol edilmesi gibi bir dizi çalışma yapılmıştır. Ardından, çalışmada kullanılan tüm nanopartiküllerin yüzeyine immobilize edilecek prob miktarları üzerine çalışılmıştır. Partiküllerin modifikasyonu ile ilgili yapılan çalışmalardan sonra hedef dizilimin tamamlayıcı problemler ile hibridizasyonunu etkilediği bilinen ortam sıcaklığı, ortamdaki tuz konsantrasyonu ve hibridizasyon süresi gibi parametreler üzerine çalışılmıştır. Hedef dizilim tayini amacıyla sandviç yapı oluşturulurken partiküller arasında gerçekleşmesi olası olan spesifik olmayan bağlanmaların minimize edilmesi için ise açıkta kalan aktif uçların blokasyonu ve yıkama prosedürlerinin uygulanması gibi işlemler uygulanarak etkileri gözlenmiştir. Optimize edilen parametrelerle sistemin uygulanabilirliği ve çalışmada kullanılması amacıyla sentezlenen manyetik partiküllerden hangisiyle daha iyi sinyaller elde edilebileceği araştırılmıştır. Daha iyi sinyaller elde edilebileceği düşünülen partiküllere karar verildikten sonra ise sandviç yapı oluşturulurken ortam sıcaklığındaki değişimin ve manyetik partikül ile sinyal alınmasını sağlayan işaretçi partiküllerin analiz ortamına katılma şekillerinin sinyaller üzerine etkisi araştırılıp; son olarak da farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlerin analizi yapılarak kalibrasyon eğrisi çıkartılmıştır.

4.1. APTS Modifiyeli Manyetik Nanopartiküller İle İlgili Yapılan Optimizasyonlar

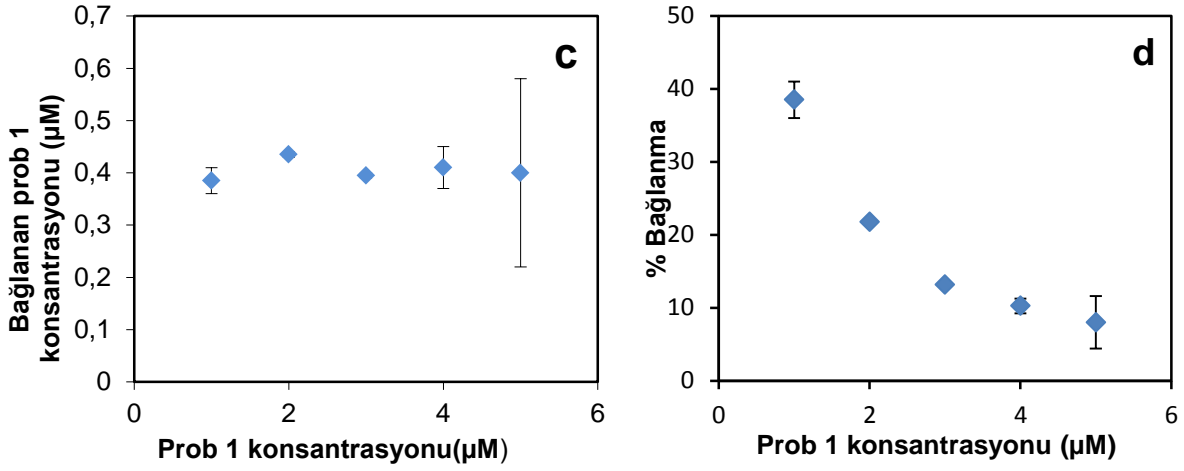
Çalışmada kullanılmak üzere sentezlenen silika kaplanmış ve APTS modifiye edilmiş manyetik nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları sonucunda küresel bir

geometriye ve 90 nm çapa sahip oldukları belirlenmiştir. APTS modifiye edilmiş silika nanopartiküller üzerine modifikasyonlar yapılabilmesi amacıyla glutaraldehit aktivasyonu yapılmıştır. Literatürde yer alan APTS modifikasyonunun yapıldığı çalışmalarda % 2,5 glutaraldehit 4 saat süreyle oda sıcaklığında [50] ve % 8 glutaraldehit 1 saat süreyle oda sıcaklığında [51] şeklinde uygulamalar bulunmaktadır. Çalışmamızda ise yüzey aktivasyonu amacıyla % 6 lık glutaraldehit çözeltisi ve oda sıcaklığında 1 saat süre parametreleri uygulanmıştır. Aktivasyonun hangi tampon içerisinde yapılacağına karar vermek üzere deiyonize su ve PBS tamponu içerisinde gerçekleştirilen aktivasyon sonrası aynı miktardaki prob dizilimlerinin APTS modifiyeli manyetik partikül üzerine immobilize olan prob dizilim miktarları HPLC'de yapılan ölçümler sonucunda belirlenmiştir. Şekil 4.1.a'da görülebilecek sonuçlara göre her iki tamponda da gerçekleştirilen aktivasyon ve immobilizasyon basamakları sonucu yakın bağlanma miktarları elde edilmiştir. Hibridizasyon basamağının da PBS tamponunda gerçekleştirileceği göz önünde bulundurularak aktivasyon ve immobilizasyon basamaklarının PBS tamponunda yapılmasına karar verilmiştir. Kullanılacak tampona karar verildikten sonra hem yüzey aktivasyonun düzgün bir şekilde gerçekleşip gerçekleşmediğinin hem de farklı zamanlarda sentezlenen partiküller arasındaki olabilecek farklılıkların araştırılması amacıyla aktive edilmiş APTS modifiyeli partiküller BSA ile etkileştirilip bağlanmayan miktarlar HPLC ile tayin edilerek bağlanan BSA miktarları hesaplanmıştır. Şekil 4.1.b'de yer alan sonuçlarda stoklar arasında büyük farklılıkların bulunmadığını ve partiküller üzerine BSA immobilizasyonunun gerçekleştiği görülmektedir. Nanopartikül yüzeyine yapılacak modifikasyonlar için uygun şartlar araştırıldıktan sonraki aşama olarak prob immobilizasyonu basamağı için gerekli olan optimum miktarın belirlenmesi üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla prob dizilim konsantrasyonu olarak 1-5 μM aralığında çalışılmış ve yüzey aktivasyonu yapılmış partiküller ile etkileştirilen prob dizilimlerin bağlanmayan miktarları HPLC ile analiz edilmiştir. Çalışılan konsantrasyon aralığında elde edilen sonuçlara göre partikül üzerine bağlanan miktarların belli bir aralıkta seyrettiği (Şekil 4.1.c) ve partikül yüzeyinin doygunluğu ulaşması dolayısıyla artan prob konsantrasyonuna karşın yüzeye bağlanma yüzdesinde düşüş gerçekleştiği gözlenmiştir (Şekil 4.1.d). Farklı nanopartiküllerin kullanıldığı çalışmaların birinde yüzey modifikasyonu amacıyla 4 μM prob kullanılmıştır [52]. Çalışmamızda ise yüzeye bağlanan miktarların birbirine yakın olması, buna karşın artan konsantrasyonlarda bağlanan miktarlardaki sapma

değerlerinde artış gözlenmesi sebebiyle 3 μ M prob konsantrasyonunun çalışmamız için uygun olduğuna karar verilmiştir. Nanopartiküllerin daha düşük prob konsantrasyonları ile etkileştirildiği durumlarda yüzeye immobilize olan prob miktarı, partiküllerin 3 μ M prob konsantrasyonu ile etkileştirildiği zaman yüzeye immobilize olan miktarına yakın olsa da, partiküllerin yüzeyine mümkün olan en fazla miktarda prob immobilize edilmesi amaçlandığından, daha düşük bir prob konsantrasyonu tercih edilmemiştir.



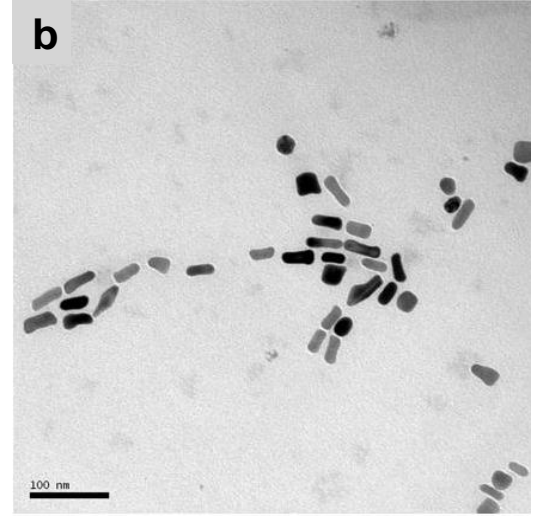
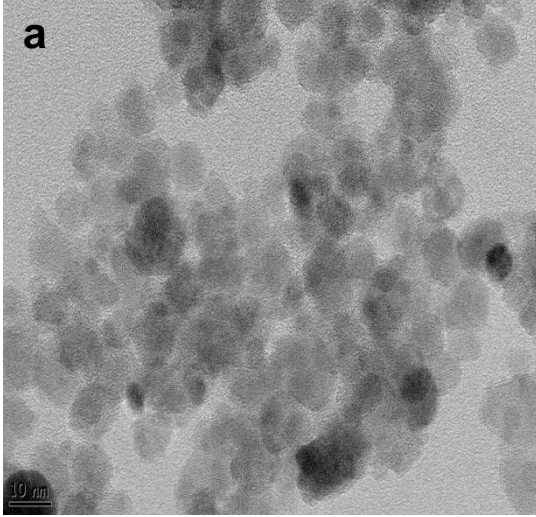
Şekil 4.1. a) Glutaraldehit aktivasyonuna tampon etkisi, b) BSA molekülü ile yüzey aktivasyonunun kontrolü, c) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül üzerine bağlanan prob miktarı, d) prob dizilimlerin % bağlanma oranları.



Şekil 4.1.(devamı) a) Glutaraldehit aktivasyonuna tampon etkisi, b) BSA molekülü ile yüzey aktivasyonunun kontrolü, c) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül üzerine bağlanan prob miktarı, d) prob dizilimlerin % bağlanma oranları.

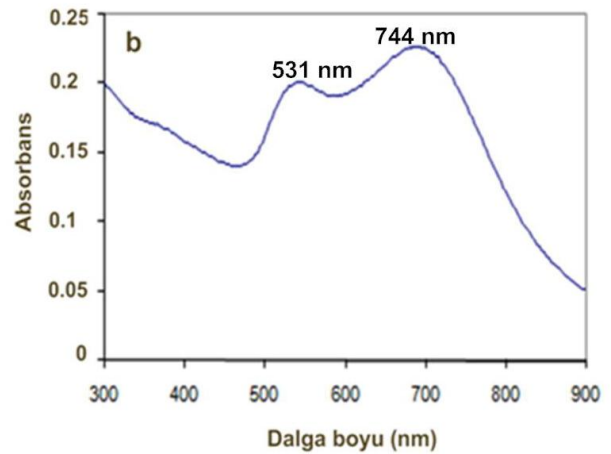
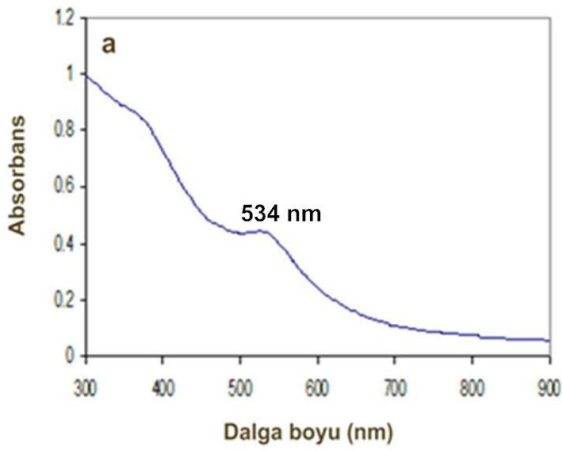
4.2. Altın Kaplı Manyetik Nanopartikül ve Altın Nanoçubuk Partiküllerin Karakterizasyonu

Çalışmada kullanılan altın kaplı manyetik nanopartikül ve altın nanoçubukların karakterizasyonu için partiküllerin anizotropilerinden ve optik özelliklerinden yararlanılmıştır. UV-görünür bölge spektroskopisi ve transmisyon elektron mikroskobu ise nanopartiküllerin karakterizasyonunda kullanılmış olan cihazlardır. Nanopartiküllerin şekil ve boyutları TEM ile elde edilen görüntülerden yararlanılarak belirlenmektedir. Çalışmamızda kullanılan partiküllerin TEM görüntüleri şekil 4.2'de verilmektedir. Şekil 4.2.a'da altın kaplı manyetik partiküllerin TEM görüntüsü yer alırken; şekil 4.2.b'de ise altın nanoçubukların TEM görüntüsü yer almaktadır. İleriki aşamalarda birim hacimdeki miktar hesabı yapılmış olan altın nanopartiküllerin boyutlarının yaklaşık olarak 45 nm boyuna ve 15 nm enine olduğu belirlenmiştir. Nanoçubukların boyutları hakkında bilgi verilirken genellikle boy/en oranı kullanılmakta ve kullandığımız nanopartiküllere ait bu değer yaklaşık olarak 3 olduğu bulunmuştur.



Şekil 4.2. a) Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsü, b) Altın nanoçubukların TEM görüntüsü.

UV görünür bölge spektroskopisinde alınan absorbands ölçümleri ise nanopartiküllerin optik özellikleri ve şekilleri hakkında bilgi sağlamaktadır. Şekil 4.3.a'da altın kaplı manyetik nanopartiküllere ait spektrum yer alırken; TEM görüntülerinde de görüldüğü gibi şekil itibariyle küreye yakın olan nanopartiküllerin 534 nm'de bir plazmon bandına sahip olduğu görülmektedir. Şekil 4.3.b'de ise enine plazmon bandı (531 nm) ve boyuna plazmon bandı (744 nm) olmak üzere altın nanoçubuğa ait plazmon bantları görülmektedir.



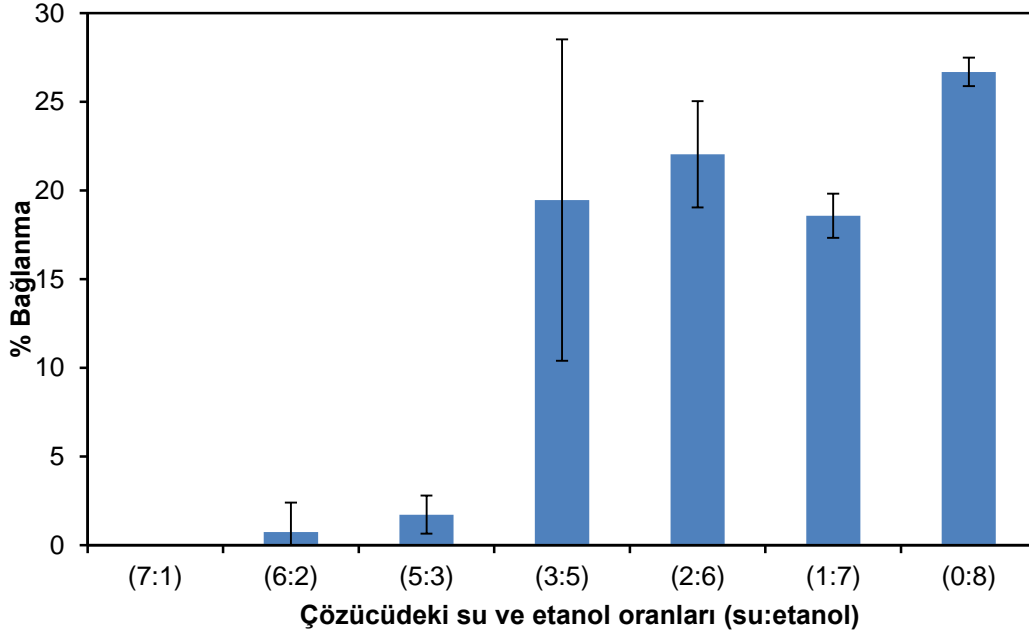
Şekil 4.3. a) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve b) altın nanoçubukların UV görünür bölge spektrumları.

Altın nanopartiküllerin şekil 4.3'te de görüldüğü gibi dar var şiddetli absorpsiyonlar göstermeleri plazmon rezonansından kaynaklanmaktadır. İletkenlik elektronlarının

uygun dalga boyunda gönderilen ışın ile elektromanyetik alan varlığındaki osilasyon hareketi sırasında rezonansa girmeleriyle bu durum gerçekleşmektedir. Altın nanopartiküllerin plazmon rezonansları partikül boyutu, şekli, yapısı ve bulunduğu ortamın refraktif indeksi gibi parametrelere bağlı olarak değişim göstermektedir. Bu sebeplerden ötürü de altın kaplı manyetik küre ve altın nanoçubuğun plazmon rezonanslarında farklılık gözlenmiştir. Nanoçubukların kısa ve uzun yüzeylerindeki elektron salınımları dolayısıyla da partiküllerin iki farklı plazmon rezonansı göstermelerine sebep olmaktadır [53]. Nanoçubukların boy/en oranlarının büyük olması düşük enerjili görünür bölge ve NIR'da yapılan çalışmalarda kullanılmasına olanak sağlamaktadır. Farklı boy/en oranlarına sahip nanoçubukların üretilerek boyutları ve optik özelliklerinde farklılık yaratılabilmesi, biyolojik uygulamalardaki kullanımları açısından büyük önem arz etmektedir. Nanoçubukların boy/en oranının artması Raman verimliliğinde artış sağlamaktadır. Nanokürelere göre saçılma verimliliği daha yüksek olan nanoçubukların Raman'da kullanılmaları ise önemli bir avantaj sağlamaktadır [21].

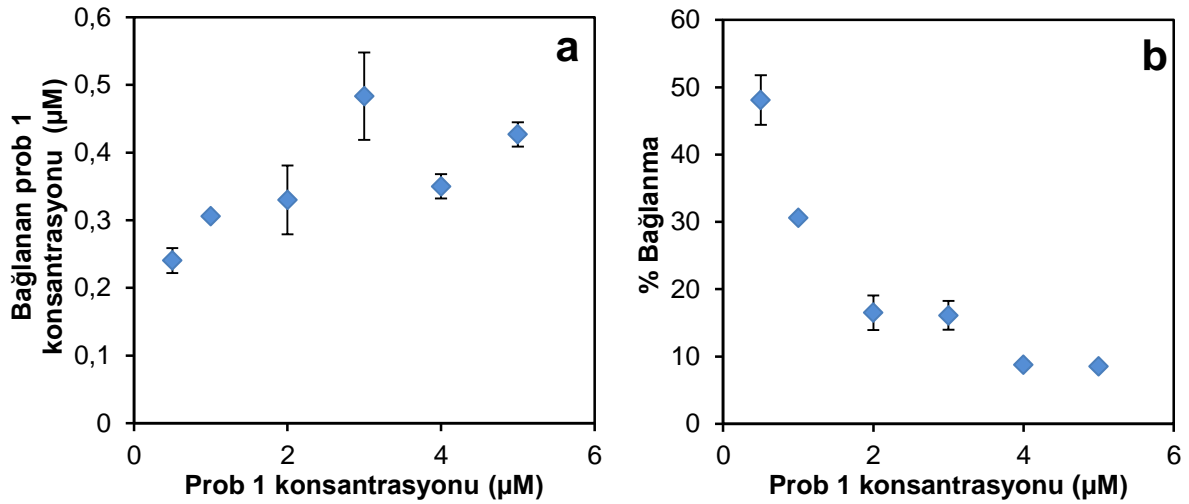
4.3. Altın Kaplı Manyetik Küre ile İlgili Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

Çalışmada kullanılacak olan manyetik nanopartiküllerden altın kaplı manyetik küre yüzeyine SAM oluşturulması tüm modifikasyonların bu gruplar üzerinden gerçekleştirileceğinden önemli bir basamaktır. Bu yüzden SAM oluşturulması basamağında çözücünün etkisini araştırmak üzere bir takım denemeler yapılmıştır. Eşit miktardaki 11-MUA, farklı oranlardaki su ve etanol karışımlarında çözüldürülerek partiküller üzerine eklenmiş ve SAM oluşması için 18 saat bekletilmiştir. Partiküllerin yüzeyindeki SAM oluşumu, yüzeyde oluşturulan grupların aktive edilip belirli miktardaki avidin ile etkileştirildikten sonra bağlanmayan avidin miktarı üzerinden gidilerek takip edilmiştir. Bağlanmayan avidin miktarı ise UV spektroskopisinde yapılan ölçümlerle tespit edilmiştir. Şekil 4.4'te de görülebileceği gibi farklı oranlardaki su ve etanol karışımlarında SAM oluşturulmuş nanopartiküllerle etkileştirilen 0,25 mg/mL'lik avidin çözeltilerinden, partikül yüzeyine bağlanan avidin miktarının % olarak bağlanma miktarları görülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar SAM oluşumunda ortamda su bulunmasının avidinin bağlanma oranında düşüşe, diğer bir deyişle düzgün bir yüzey oluşamamasına sebep olduğunu işaret etmektedir.



Şekil 4.4. Farklı su-etanol karışımlarının SAM oluşumuna ve avidin bağlanmasına etkileri.

Altın kaplı manyetik kürenin yüzeyinde SAM oluşturulması aşamasında tamponun etkisi araştırıldıktan sonra yüzeye immobilize edilecek optimum prob "1" dizilim miktarının belirlenmesi amacıyla 0,5 μM ile 5 μM arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmıştır. Partikül ile etkileştirilen prob dizilimlerden bağlanmayan miktarları yine HPLC ile tayin edilmiştir. Daha sonra bu değerler kullanılarak yüzeye bağlanan prob konsantrasyonu (Şekil 4.5.a) ve % bağlanma (Şekil 4.5.b) verileri elde edilmiştir. Bu verilerden yola çıkılarak da immobilizasyon basamağında kullanılacak olan uygun konsantrasyona karar verilmiştir. Belirtilen iki grafikteki sonuçlar incelendiği zaman bağlanan prob miktarı olarak 3 μM 'da en yüksek değer gözlenirken, % bağlanma değerlerinde ise nanopartiküllerin yüzeyi APTS modifiyeli nanopartiküllerde olduğu gibi doygunluğa ulaştığından artan prob konsantrasyonlarına karşılık düşüş gözlenmektedir. Literatürde yer alan benzer çalışmalarda altın nanopartiküllerin yüzeyine prob dizilimler immobilize etmek amacıyla prob dizilim konsantrasyonu 4 μM olarak kullanılmıştır [52, 54]. Ancak çalışmalarda farklı özellikteki manyetik nanopartiküller kullanılması da göz önünde tutularak; 3 μM prob konsantrasyonu çalışmamız için optimum değer olarak uygun görülmüştür.

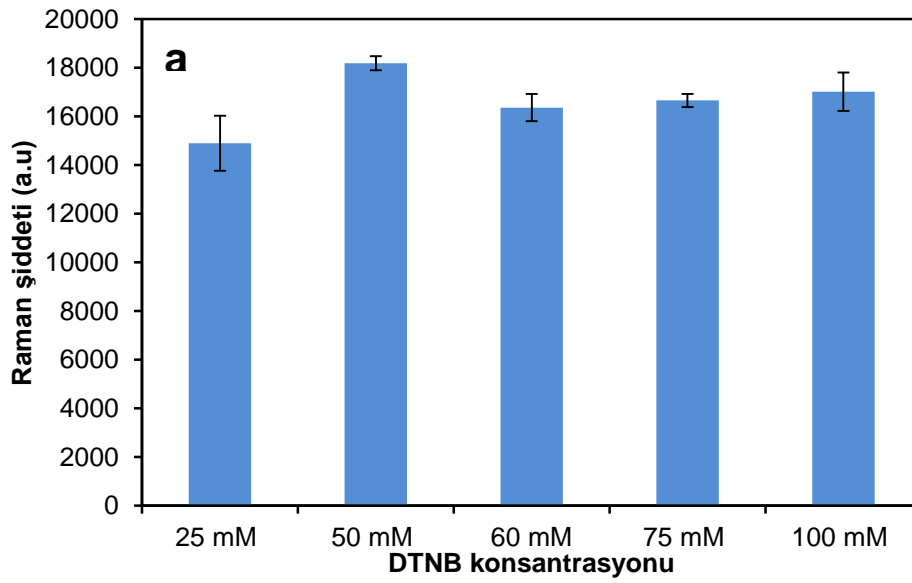


Şekil 4.5. a) Altın kaplı manyetik küre üzerine bağlanan prob 1 miktarları, b) % bağlanma oranları.

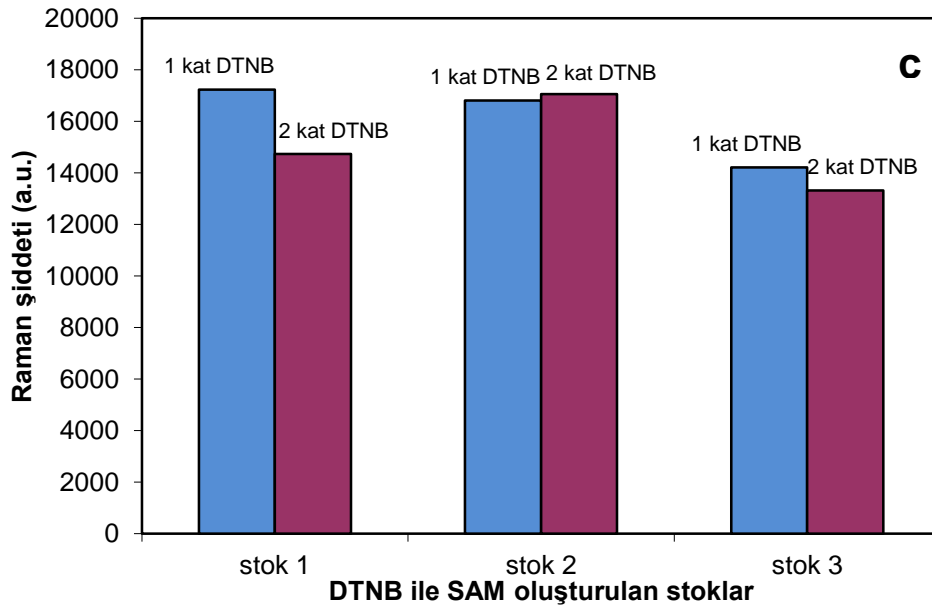
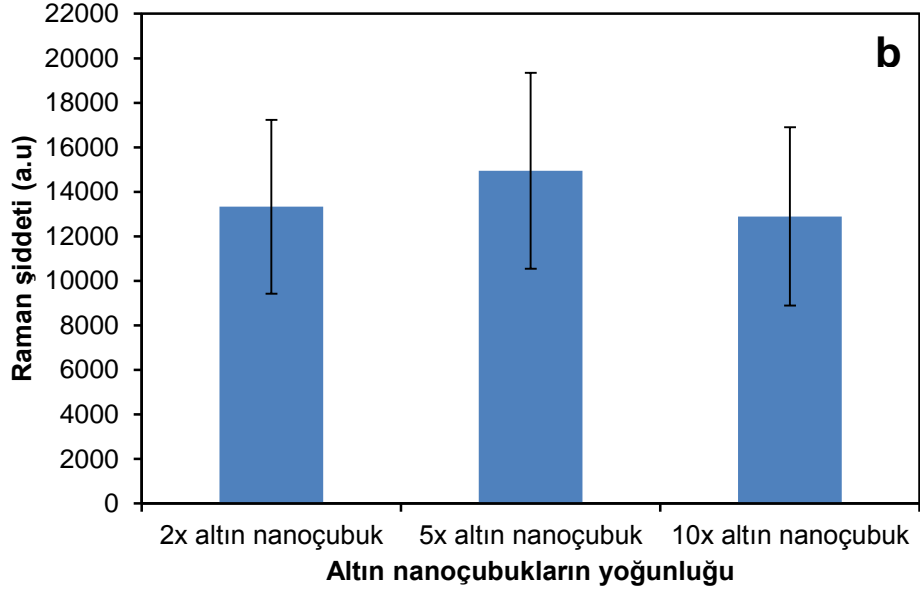
4.4. Altın Nanoçubuklar ile İlgili Yapılan Optimizasyon Çalışmaları

İşaretçi olarak kullanılan altın nanoçubuklarla ilgili ise Raman spektroskopisindeki ölçümlerde daha yüksek bantların elde edilebilmesi üzerine bir takım çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla DTNB konsantrasyonu ve partikül yoğunluğu gibi parametrelerin bant şiddetleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır. DTNB konsantrasyonunun etkisi araştırılırken 25 - 100 mM arasındaki konsantrasyonlarda çalışılırken; partikül yoğunluğunun etkisi ise 2-10 kat aralığında konsantre edilmiş nanopartiküllerle çalışılmıştır. Şekil 4.6.a'da da görülebileceği gibi; elde edilen sonuçlar DTNB konsantrasyonu 50 mM olarak kullanıldığı zaman elde edilen Raman bant şiddetlerinin maksimum seviyeye ulaştığı görülmekte ve literatürde yer alan çalışmalarda da Raman etiketi olarak kullanılan DTNB molekülüyle nanopartiküller yüzeyinde SAM oluşturulurken aynı konsantrasyonda kullanıldığı görülmektedir [8, 54]. Diğer taraftan kullanılan nanopartiküllerin yoğunluklarındaki ya da birim hacimdeki partikül miktarındaki artışın bant şiddetine olan etkisi, sentez haldeki stok partikül çözeltisinin 2, 5 ve 10 kat konsantre hale getirilip yüzeylerinde DTNB ile SAM oluşturulması ve ardından ortamda serbest haldeki DTNB moleküllerinin yıkamalarla uzaklaştırılıp Raman ölçümleri alınmasıyla test edilmiştir. Şekil 4.6.b'deki sonuçlardan da takip edilebileceği gibi; kullanılan partikül çözeltisinin daha yoğun olmasının daha yüksek bant şiddetleri elde edilmesi yönünden avantaj sağlamadığı sonucuna varılmıştır. Optimum DTNB konsantrasyonu ve partikül miktarının etkisi araştırıldıktan sonra bir Raman etiketi olan DTNB molekülü ile SAM oluşturulmuş

yüzey üzerine yine DTNB molekülü ile SAM oluşturulması durumunda band şiddetlerinde artış gözlenip gözlenmediği araştırılmıştır. Farklı stoklardan hazırlanan altın nanoçubuk çözeltileri üzerin optimum konsantrasyon değeri olarak belirlenen 50 mM DTNB ile SAM oluşturulup yıkamalar yapıldıktan sonra 2. kez aynı uygulama gerçekleştirilmiş ve normal SAM uygulaması ile ikinci kez SAM uygulaması yapılan paralelller karşılaştırılmıştır. Bu şekilde muamele edilen altın nanoçubuklardan elde edilen Raman bandlarının şiddetlerinde beklendiği gibi artışlar gözlenememiştir (Şekil 4.6.c). Bu yüzden de 2. kez yapılacak SAM uygulamasının gereksiz olduğuna karar verilmiştir.



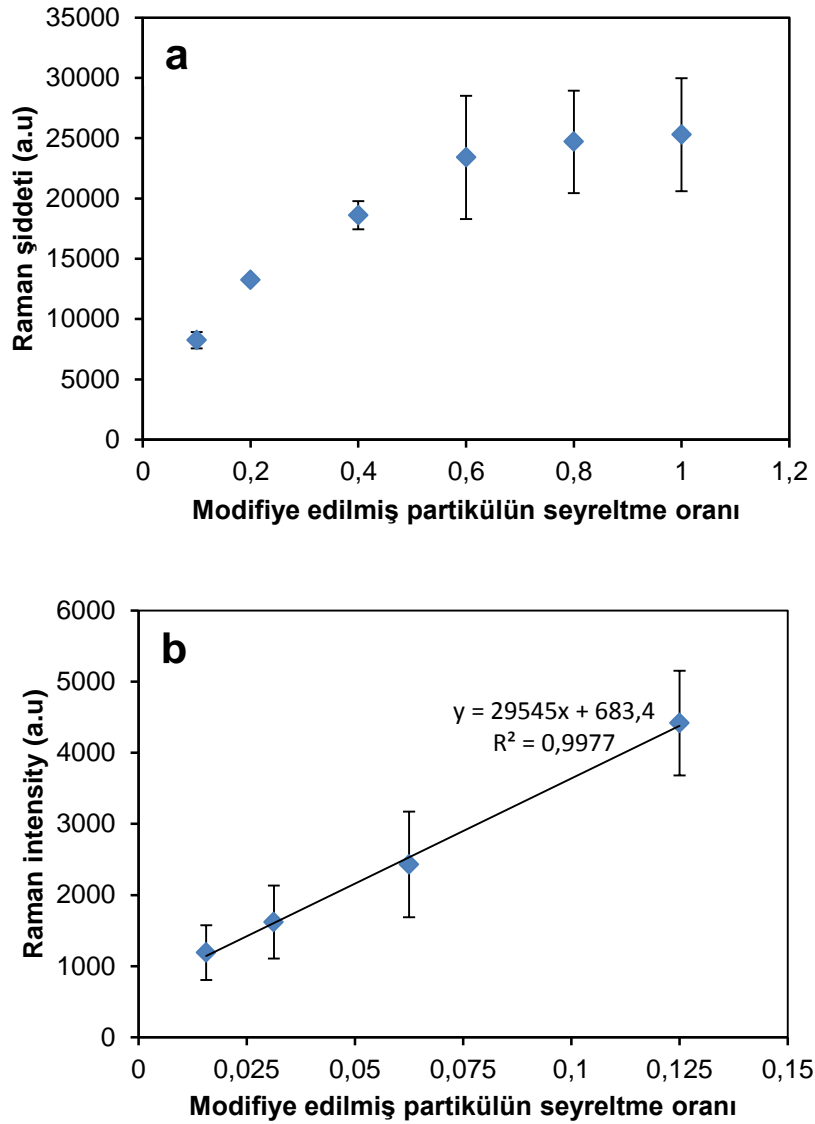
Şekil 4.6. a) DTNB konsantrasyonunun bant şiddetine etkisi, b) farklı konsantrasyonlardaki altın nanoçubukların bant şiddetine etkisi, c) yüzeyde birden çok SAM oluşturulmasının bant şiddetine etkisi.



Şekil 4.6.(devamı) a) DTNB konsantrasyonunun bant şiddetine etkisi, b) farklı konsantrasyonlardaki altın nanoçubukların bant şiddetine etkisi, c) yüzeyde birden çok SAM oluşturulmasının bant şiddetine etkisi.

İşaretçi olarak kullanılan altın nanoçubuklar ile ilgili yapılan diğer bir çalışma ise; kullanılan partiküllerin birim hacimdeki miktarının hesaplanarak; bu değerden tanecik sayısının hesaplanması ve son olarak da belirlenebilen en düşük tanecik sayısına ulaşılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Partikülün geometrik şekli silindirik olarak kabul edilip uzunluğu 45 nm çapı ise 15 nm olarak TEM görüntülerinden

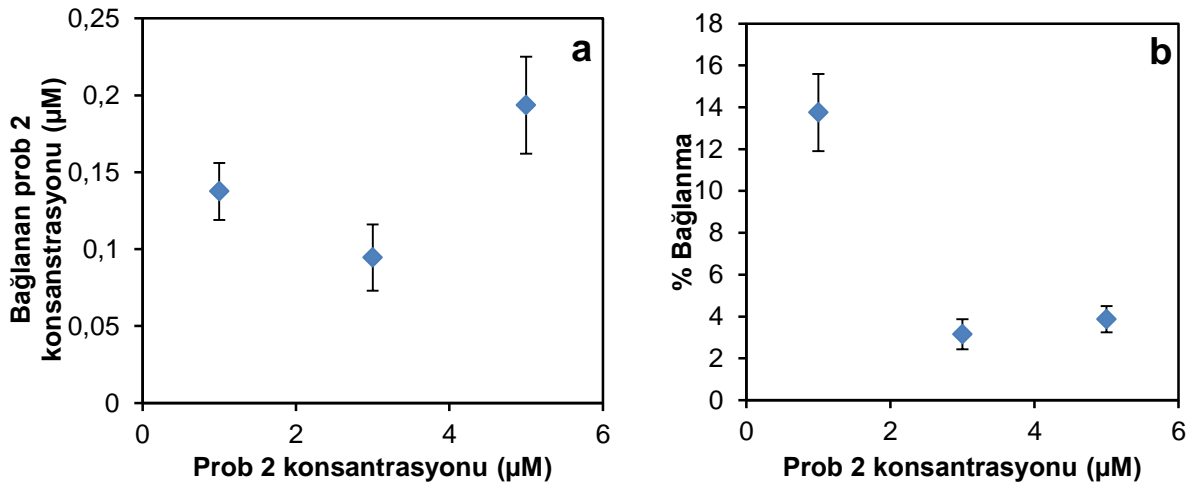
belirlenmiştir. Bu değerler kullanılarak öncelikle bir adet nanopartikülün hacmi hesaplanıp, daha sonra da birim hacimdeki miktardan gidilerek kullanılan stokta yaklaşık olarak 10^{12} tanecik bulunduğu hesaplanmıştır. Modifiye edilmiş altın nanoçubukların tamponda seyreltilerek Raman ölçümleri alınmasıyla da gözlenebilecek en düşük seyreltme oranına ulaşılmıştır. Raman ölçümlerinden hacmen yaklaşık olarak 1/100 – 1/1000 oranında seyreltme yapıldığı zaman gözlenebilen en düşük miktar olduğu belirlenmiş (Şekil 4.7.) ve buradan da gözlenebilecek en düşük tanecik sayısının 10^9 - 10^{10} civarında olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 4.7. Modifiye edilmiş altın nanoçubukların seyreltme yapılarak elde edilen Raman bant şiddetleri (a ve b).

Altın nanoçubukların işaretçi olarak kullanılacak olması dolayısıyla partikül yüzeyine yapılacak modifikasyonların ve partikül miktarının elde edilebilecek bant şiddetleri üzerine etkileri araştırıldıktan sonra; diğer bir önemli nokta olan yüzeye immobilize edilecek optimum prob "2" dizilimi miktarı, 1-5 μM arasındaki konsantrasyonlarla çalışılarak belirlenmiştir. Şekil 4.8.a'da yer alan bağlanan prob 2 miktarını gösteren grafiğe bakıldığı zaman tüm konsantrasyonlardaki bağlanma miktarlarının yakın olduğu ancak 3 μM 'da az da olsa düşüş olduğu gözlenmiştir. Prob 2'nin 2 μM konsantrasyonda kullanılmasının partikülün yüzeyine yeterince prob bağlanmasını sağlayacağına karar verilmiştir. % bağlanma verilerini gösteren Şekil 4.8.b ise diğer partiküllerde olduğu gibi nanopartiküllerin yüzeyindeki doygunluğa ulaşma durumunu destekler niteliktedir.

Prob dizilimlerin partiküller üzerine immobilizasyonu sırasında karboksil ve amino grupları arasındaki kovalent bağ oluşumundan yararlanılmıştır. Immobilizasyon süresi olarak literatürde yer alan benzer çalışmalara bakıldığı zaman Guven vd. [54] tarafından yapılan çalışmada 20 dk, kovalent bağlanmadan yararlanılan bir başka çalışmada ise bu süre 1 saat olarak uygulanmıştır [55]. Bu çalışmalar dikkate alınarak prob immobilizasyonu basamağında etkileşim süresi olarak ortalama bir değer olarak 40 dk uygulanmasına karar verilmiştir.



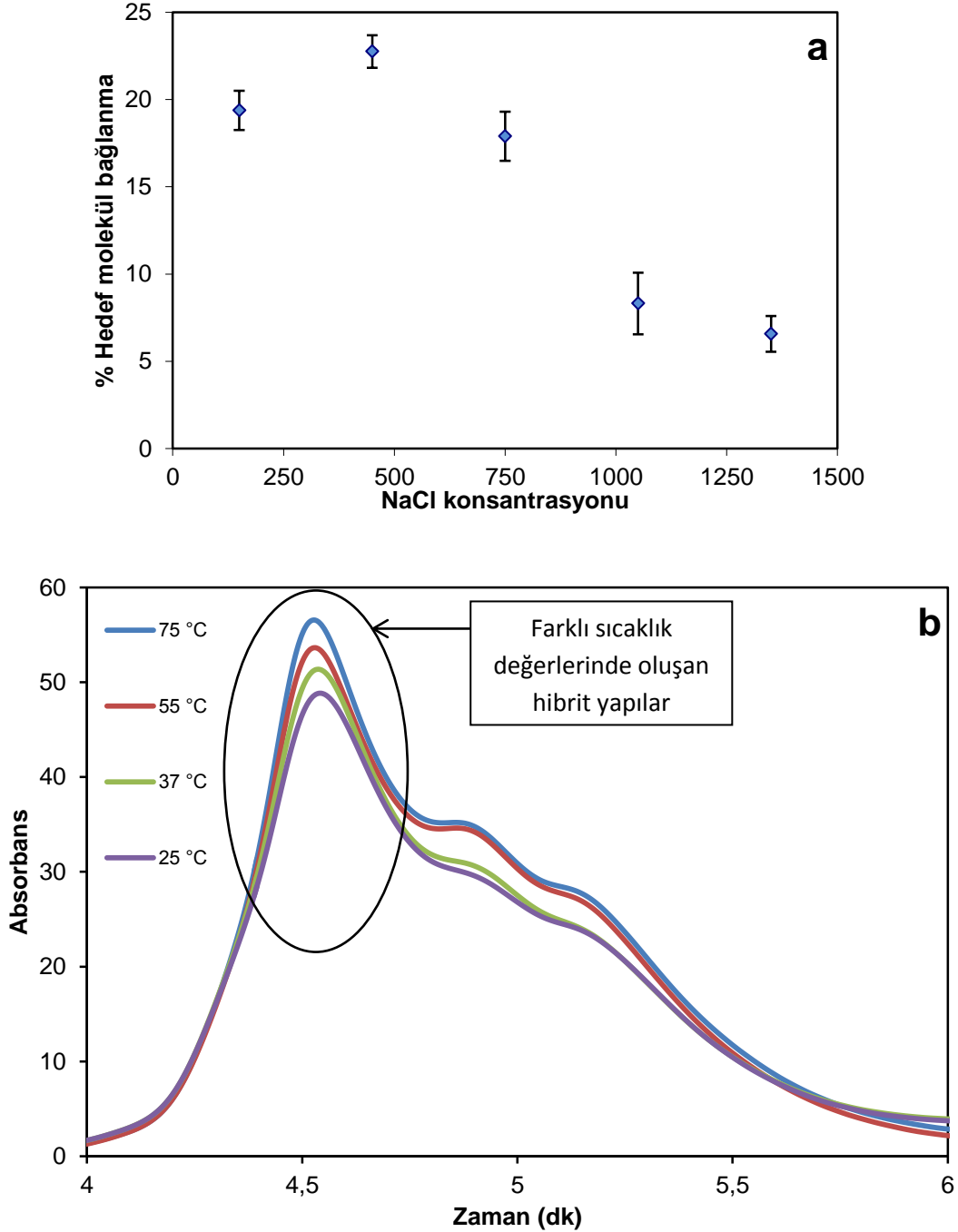
Şekil 4.8. a) Altın nanoçubukların üzerine immobilize olan prob 2 miktarı, b) Prob "2" dizilimlerinin % bağlanma verileri.

4.5. Farklı Yapılara Sahip Nanopartiküller Kullanılarak Hedef Dizilim Tayini

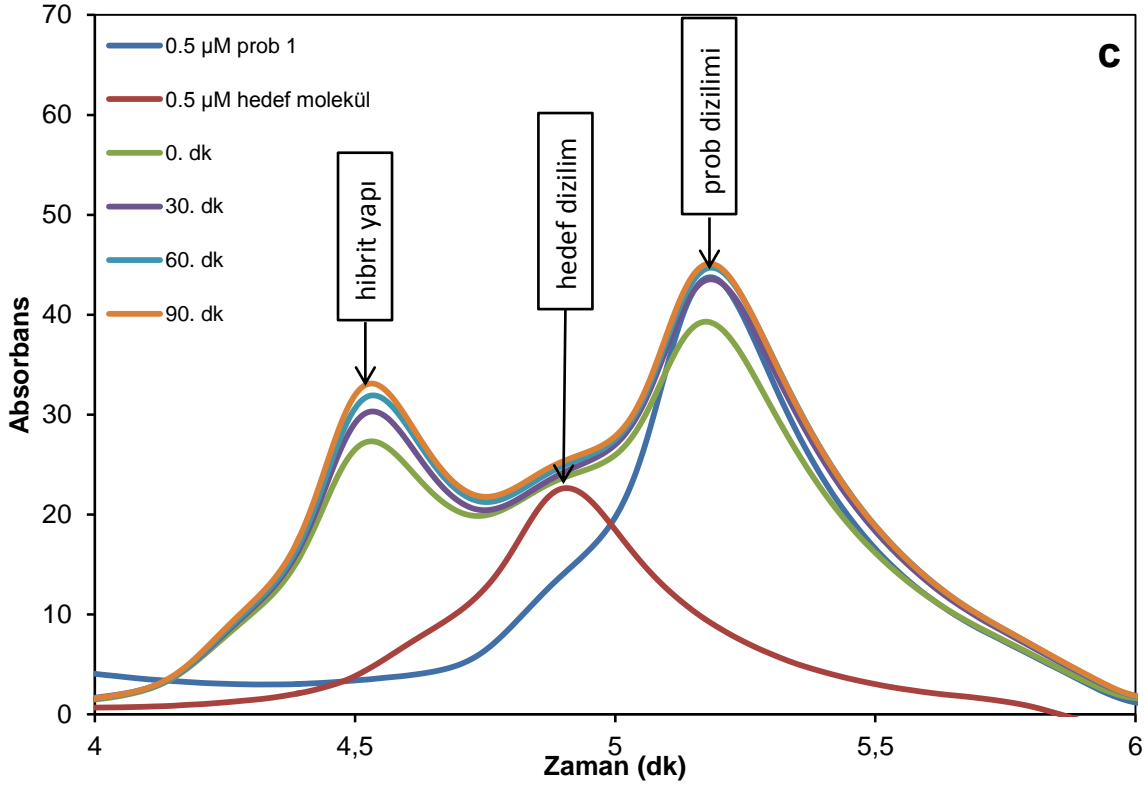
4.5.1. Optimizasyon çalışmaları

Çalışmada kullanılacak her bir nanopartikülle ilgili yüzey özelliği ve kullanım amaçlarına göre optimizasyon çalışmaları yapıldıktan sonra; hedef molekül ile hedef molekülü tamamlayıcı problemlerin hibridizasyonu için gerekli uygun koşullar üzerine çalışılmıştır. Ortamda bulunan tuz konsantrasyonu, süre ve sıcaklık parametrelerinin hibridizasyon üzerine etkisi HPLC ölçümleri yapılarak belirlenmiştir. MingXing He et al. tarafından yapılan çalışmada tuz konsantrasyonunun hibridizasyon üzerine etkisinin incelenmesi amacıyla 0 - 3 M NaCl arasındaki konsantrasyonlarda çalışılmış ve 1,5 M NaCl konsantrasyonuna kadar hibridizasyonda artış gerçekleştiği, daha ileri basamaklarda ise sinyal/gürültü oranı oldukça düştüğünden NaCl konsantrasyonundaki artışın sistemi olumsuz etkilediği gösterilmektedir [56]. Burcu Guven vd. tarafından yapılan çalışmada ise 750 mM NaCl konsantrasyonunun hibridizasyon tamponunda bulunması gereken optimum değer olduğu belirtilmektedir [54]. Yaptığımız çalışmada ise farklı tuz konsantrasyonlarına sahip tamponlardaki hibridizasyon oranlarına bakılmış ve 450 mM NaCl içeren tampondaki hibridizasyon oranı en yüksek seviyede çıkmıştır (Şekil 4.9.a). Bunun yanında literatürdeki çalışmalarda uygulanan parametreler de değerlendirilerek tamponda kullanılan NaCl konsantrasyonu 750 mM olarak belirlenmiştir. Yapılan çalışmalarda belirlenen optimum sıcaklık derecesine bakıldığında ise kimi çalışmalarda 55 °C'in hibridizasyon için uygun sıcaklık olduğu belirtilirken [54, 56]; 35-37 °C'de gerçekleştirilen çalışmalar da literatürde yer almaktadır [57]. Çalışmamızda ise hedef molekül ve prob dizilimi 25-75 °C arasındaki farklı sıcaklıklarda etkileştirip elde edilen HPLC kromatogramlarındaki hibridizasyon piki takip edilmiştir (Şekil 4.9.b) ve sıcaklığın da etkisiyle yaklaşık 4,2.'nci dakikadaki çıkan, hibrit yapıya ait olduğu belirlenen pik takip edilerek hibridizasyon miktarında bir artış meydana geldiği görülmektedir. Şekil 4.9.b'de elde edilen veriler yanında literatürde yer alan nanopartikül temelli çalışma da karşılaştırılarak hibridizasyon sıcaklığının 55-60 °C olmasının sistemimiz için uygun olduğuna karar verilmiştir. Diğer bir parametre olan hibridizasyon süresi ile ilgili olarak da 2 saat [57], 30 dk [54], 20 dk [56] gibi süreler belirtilmektedir. Nanopartikül üzerine immobilize edilmemiş prob, diğer bir ifadeyle serbest haldeki prob ile hedef molekülün hibridizasyonu 0 – 90 dk aralığında çalışılmış ve ilk andan itibaren hibrit yapıya ait olan pik elde edilmiştir (Şekil 4.9.c);

ancak kurguladığımız sistemimizdeki probun nanopartikül yüzeyinde immobilize halde olduğu göz önünde bulundurularak hibridizasyon süresinin 30 dk ile sınırlandırılmasının yeterli olacağına karar verilmiştir. Süreyi daha fazla uzatmanın, spesifik olmayan bağlanmalarda artışa ve analiz süresini uzatma gibi dezavantajlara sebep olabileceği de göz önünde bulundurulmuştur.



Şekil 4.9. a) NaCl konsantrasyonunun hibridizasyona etkisi, b) sıcaklığın hibridizasyona etkisi, c) sürenin hibridizasyona etkisi.

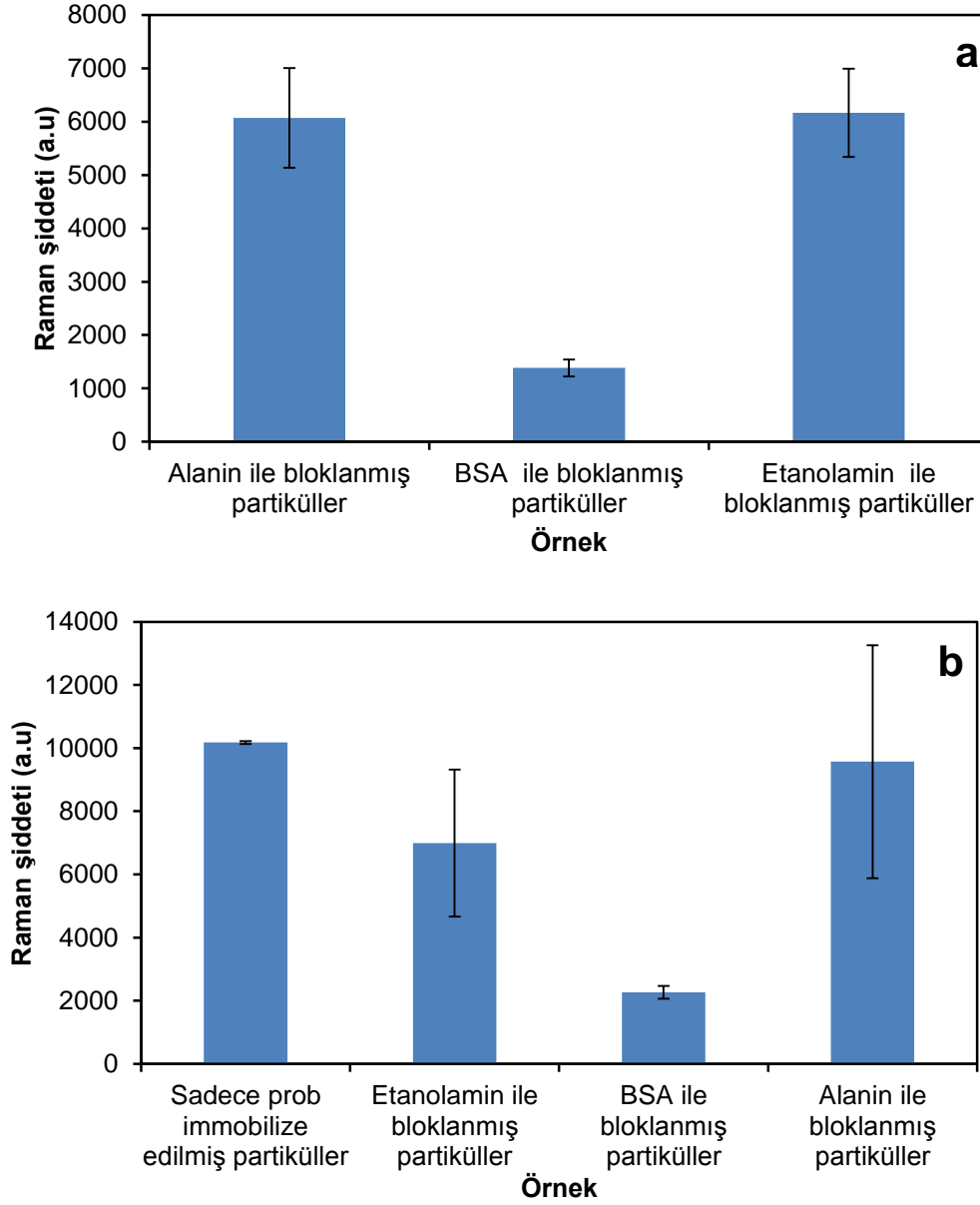


Şekil 4.9.(devamı) a) NaCl konsantrasyonunun hibridizasyona etkisi, b) sıcaklığın hibridizasyona etkisi, c) sürenin hibridizasyona etkisi.

4.5.2 Blokasyon ajanları kullanılarak ve yıkama prosedürü uygulanarak spesifik olmayan bağlanmaların minimize edilmesi

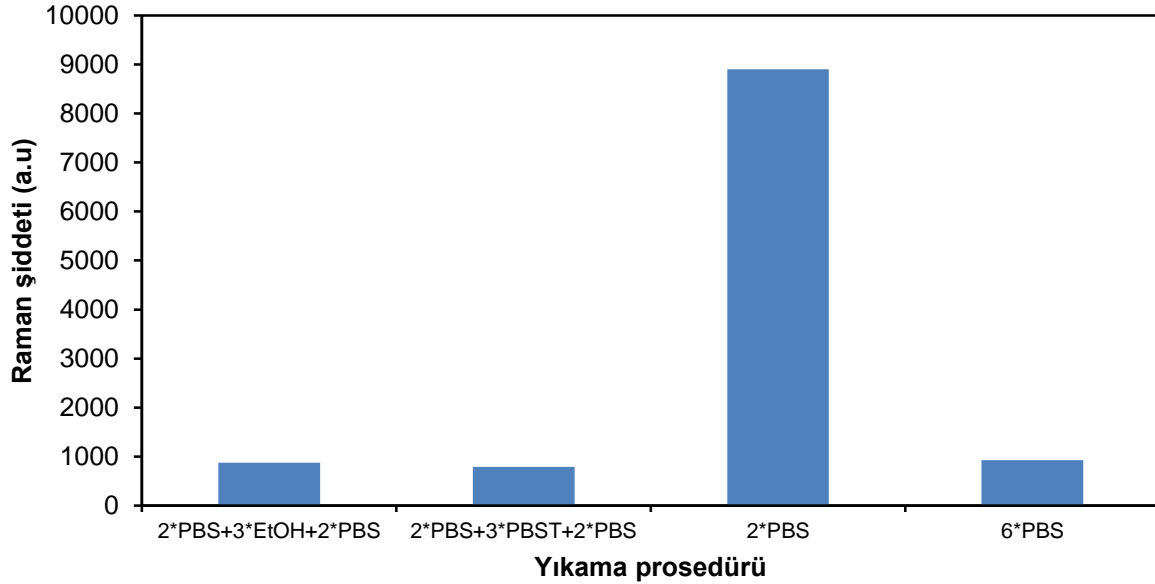
Hibridizasyon sırasında modifiye edilerek kullanılmış olan nanopartiküllerin spesifik olmayan şekilde etkileşmesi, sistemin hassasiyetini ve doğruluğunu olumsuz yönde etkileyecek bir durumdur. Söz konusu etkileşimlerin önüne geçebilmek amacıyla partikül yüzeylerinde açıkta kalabilecek aktif uçları bloklayıcı ajanların kullanılması ve uygun yıkama prosedürünün uygulanması gibi alternatifler üzerinde çalışılmıştır. Öncelikle yüzeyde açıkta kalmış olabilecek aktif uçları bloke etmek amacıyla etanolamin, alanin ve BSA gibi kimyasal ve biyokimyasal maddelerden yararlanılmıştır. Yüzeylerine prob immobilize edildikten sonra hedef molekül ortamda yok iken hibridizasyon ortamında etkileştirilen partiküllere manyetik ayırım yapılarak yıkama prosedürü uygulanmış ve Raman spektroskopisinde ölçümleri alınmıştır. Böylece DTNB molekülünün sahip olduğu Raman bandı üzerinden gidilerek manyetik partikül üzerine spesifik olmayacak şekilde bağlanmalar takip edilmiştir. Elimizde bulunan 2 farklı manyetik partikül için de yapılan denemelerin sonuçlarına bakıldığı zaman hem altın kaplı manyetik partikül (Şekil 4.10.b) hem de APTS modifiye edilmiş

silika kaplı manyetik partikül (Şekil 4.10.a) kullanıldığı durumda, BSA molekülünün blokasyon ajanı olarak kullanılmasının alanin ve etanolamin moleküllerine nazaran spesifik olmayan bağlanmayı daha iyi önlediği, bunun yanında paraleller arası ölçümlerde daha düşük standart sapma da sağladığı görülmektedir. Benzer bir çalışmada aktif yüzeylerin blokasyonu amacıyla etanolamin kullanılmasına rağmen [54]; yapılan değerlendirmeler sonucunda BSA kullanılması için daha uygun olacağına karar verilmiştir.



Şekil 4.10. a) APTS modifiyeli manyetik partikül ve altın nanoçubuğun kullanıldığı durumda blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmaya etkisi, b) Altın kaplı manyetik partikül ve altın nanoçubuğun kullanıldığı durumda blokasyon ajanlarının spesifik olmayan bağlanmaya etkisi.

Spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla uygulanan diğer bir işlem olan yıkama prosedürünün uygulanmasında ise PBS, PBST tamponları ve saf etanol kullanılarak; sadece PBS ile yıkama sayısı artırılarak yıkama, PBS ve saf etanol ile yıkama ve PBS ve PBST ile yıkama gibi kombinasyonlar denenmiştir. Nanopartiküllerle yapılan biyosensör çalışmalarına bakıldığı zaman spesifik olmayan bağlanmaları gidermek amacıyla bir çok kez PBS tamponu ile yıkama [15] ya da PBST tamponu ile yıkama basamaklarının uygulandığı belirtilmektedir [54]. Çalışmamızda elde edilen Raman sonuçlarına göre (Şekil 4.11.) ise yıkama basamağının artırılmasının spesifik olmayan bağlanmaları giderme konusunda yeterli olabileceğine, PBS tamponuna ek olarak PBST veya saf etanol kullanımının elzem bir durum olmadığına karar verilmiştir.

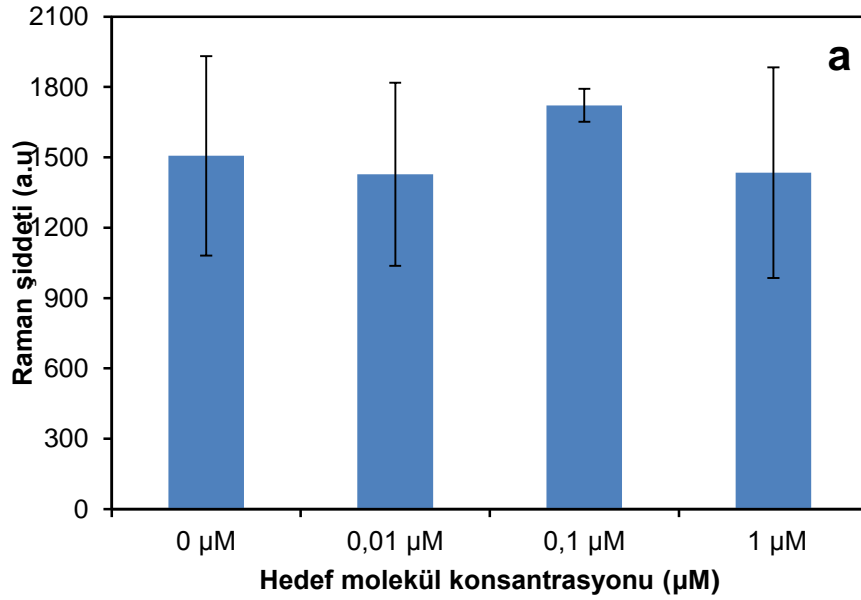


Şekil 4.11. Yıkama prosedürünün spesifik olmayan bağlanma üzerine etkisi.

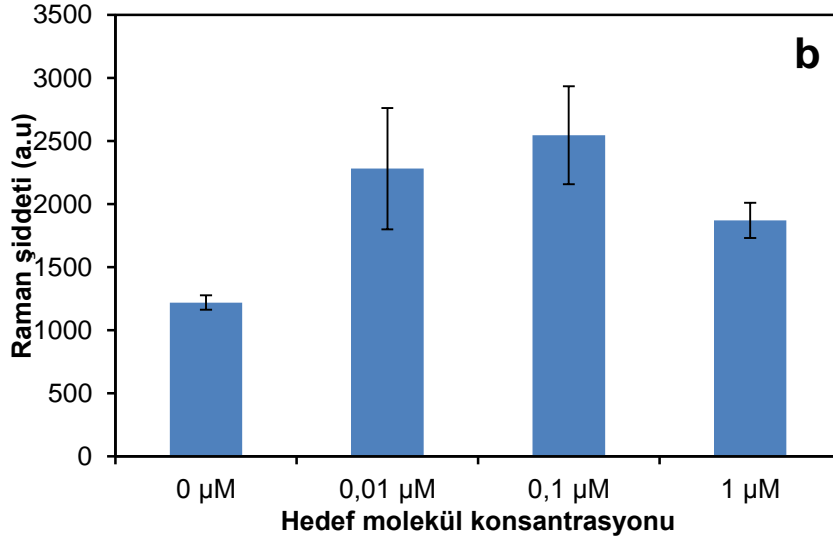
4.5.3. Optimize edilen verilerle sistemin uygulanabilirliğinin kontrolü

Çalışmamızda kurgulanan sistem, manyetik nanopartikül ve manyetik olmayan işaretçi nanopartikül kullanılarak sandviç yapı oluşturulup; YGRS sinyallerinden hedef molekülün varlığının saptanmasına dayanmaktadır. Bu noktaya kadar optimize edilen veriler kullanılarak elimizdeki partiküllerle sistemin uygulanabilirliği kontrol edilmiştir. Bu noktada işaretçi nanopartikül olarak daha önceki basamaklarda da belirtildiği gibi altın nanoçubuklar kullanılmıştır. Manyetik partikül olarak ise altın kaplı manyetik nanopartiküller ve APTS modifiyeli silika kaplı nanopartiküller kullanılarak hedef

dizilim olmadığı durumda ve ortamda hedef dizilimin varlığında sistemden elde edilen bantlar takip edilmiştir. Şekil 4.12.a'da bulunan Raman sonuçlarına göre manyetik partikül olarak APTS modifiyeli nanopartiküllerin kullanıldığı durumda hedef molekül varlığını gösterecek şekilde bant şiddetleri elde edilemezken; altın kaplı manyetik partiküllerle oluşturulan sandviç yapıdan alınan ölçümlerde (Şekil 4.12.b) ortamda hedef molekül bulunduğu zaman bant şiddetlerinde beklenen artış gözlenmiştir. Bu sonuçlara göre ise hedef dizilim tayininde, özellikle YGRS çalışmalarında belirtilen altının yüksek güçlendirme özelliğine sahip olduğu yönündeki bilgi de göz önünde bulundurularak, altın kaplı manyetik partiküllerin kullanılmasının sistemin işleyişi için daha uygun olacağına karar verilmiştir.



Şekil 4.12. a) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı, b) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı.

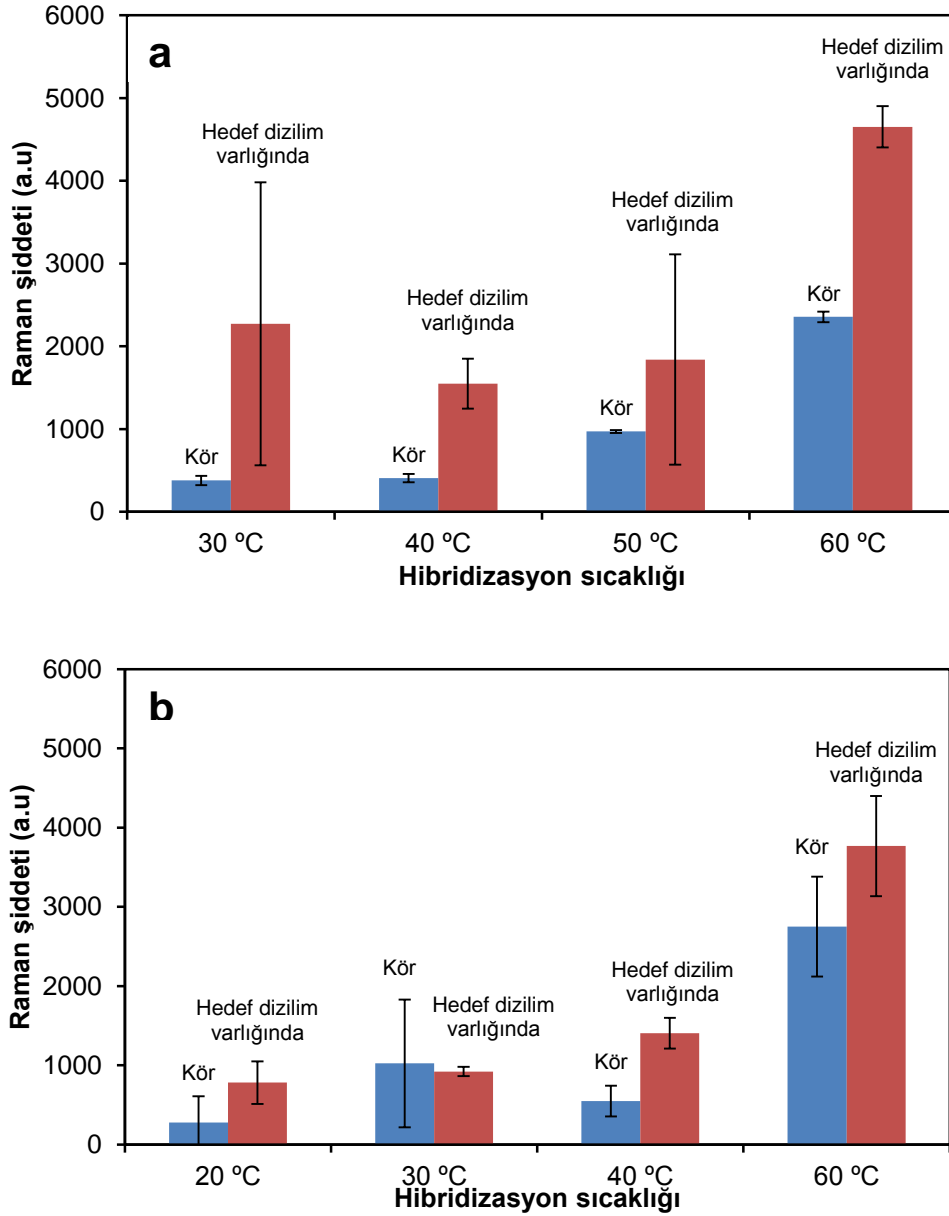


Şekil 4.12.(devamı) a) APTS modifiyeli manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı, b) Altın kaplı manyetik nanopartikül ve altın nanoçubuklarla sandviç yapı.

4.5.4. Sandviç yapı oluşturulurken sıcaklığın ve sandviç yapı oluşturma basamağının sistem üzerine etkisi

Her ne kadar literatürde yer alan çalışmaların yanında, serbest haldeki DNA dizilimlerine sıcaklığın etkisi araştırılmışsa da DNA dizilimlerinin nanopartikül yüzeyine immobilize edilmiş halde bulunduğu farklı sıcaklıktaki ortamlarda sistemden alınan cevaplar üzerine çalışılmıştır. Bu amaçla 30-60 °C arasındaki sıcaklıklarda ve aynı miktarda hedef dizilimin bulunduğu ortamlarda oluşturulan sandviç yapıların Raman ölçümleri alınarak DTNB molekülüne ait bantlar üzerinden gidilerek sonuçlar takip edilmiştir. Elde edilen sonuçlar, artan sıcaklıkla beraber bantların Raman şiddetlerinde bir artış olduğunu göstermektedir (Şekil 4.13.). Sıcaklığın sistem üzerine etkisi araştırılırken, diğer bir ilgilenilen konu ise sandviç yapı oluşturma stratejilerinin bantların Raman şiddetlerini ne yönde etkilediğinin araştırılmasıdır. Bu amaçla uygulanan iki farklı yola göre; Şekil 4.13.a'da hedef dizilimi tamamlayıcı olan DNA dizilimleri ile modifiye edilmiş nanopartiküller aynı anda analiz ortamına katılırken; Şekil 4.13.b'de ise literatürde yer alan çalışmalarda da uygulandığı gibi, öncelikle manyetik nanopartikül ortama konarak hedef dizilim ortamdaki alınıp daha sonra üzerine işaretçi partiküller eklenerek sandviç yapı oluşturulmuştur. Alınan ölçümler sonucunda manyetik partikül ve işaretçi partikülün aynı anda ortama katılmasının daha yüksek sonuçlar elde edilmesini sağladığı gözlenmiş ve hedef

dizilim tayininde bu stratejinin uygulanmasının avantaj sağlayacağına karar verilmiştir.

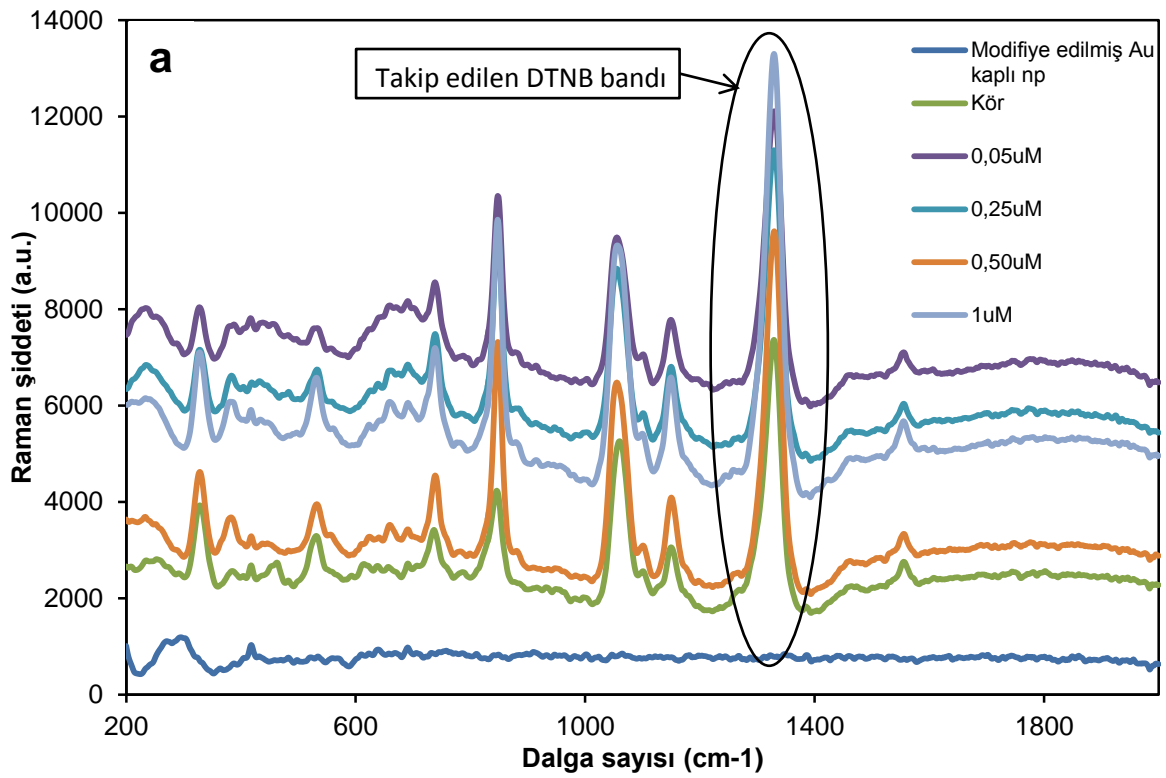


Şekil 4.13. a) Manyetik ve işaretçi nanopartiküllerin aynı anda ortama katılarak farklı sıcaklıklarda sandviç yapının oluşturulması, b) Hedef dizilimin önce manyetik partikül ile ortamdan alınıp işaretçi partikül ile işaretlenerek farklı sıcaklıklarda sandviç yapının oluşturulması.

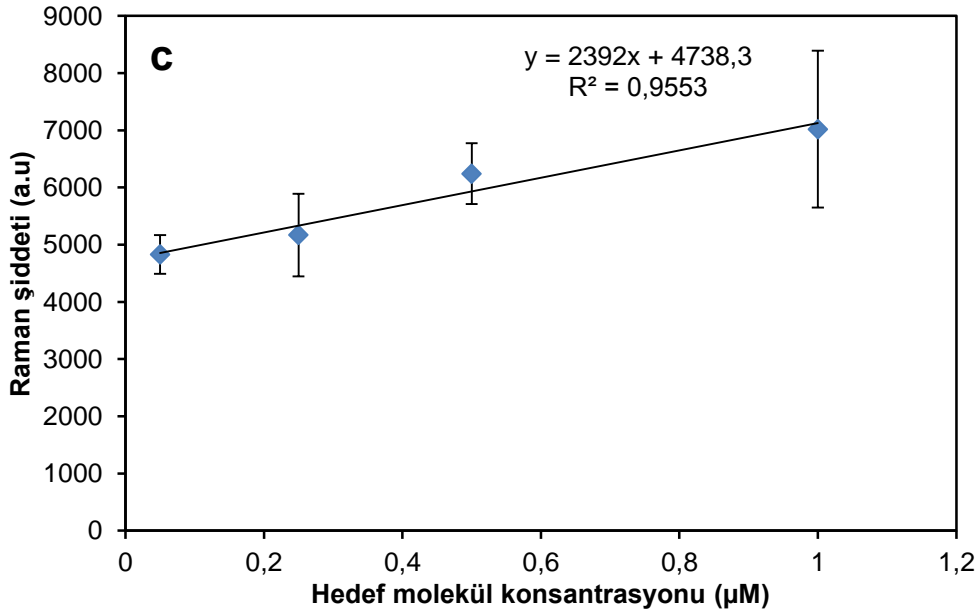
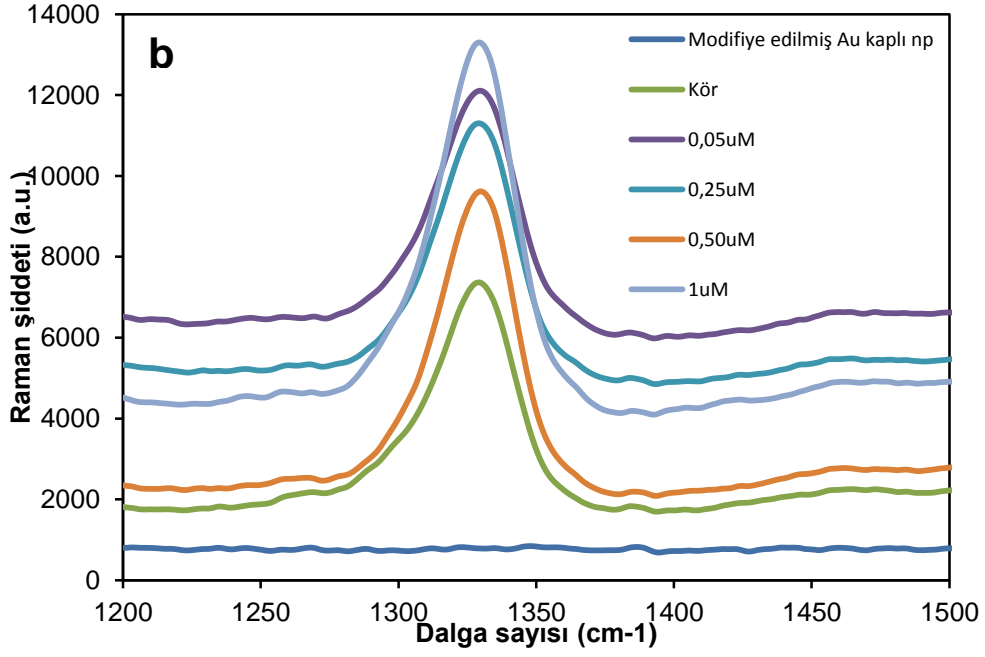
4.5.5. YGRS kullanılarak hedef dizilim tayini

Raman etiketi olan DTNB molekülü ile modifiye olan altın nanoçubuk partiküller kullanılarak hedef dizilimler tayin edilmiştir. DTNB molekülüne ait olan 1331 cm^{-1} dalga sayısındaki simetrik NO_2 bandı üzerinden gidilerek hedef molekül varlığı

saptanmıştır (Şekil 4.14.a). Çalışılan en yüksek hedef dizilim konsantrasyonu 1 μM iken düşülen en düşük değer ise 50 nM'dır. YGRS ölçümleri TLC üzerinde gerçekleştirilirken, elde edilen spektrumlar (Şekil 4.14.a ve Şekil 4.14.b) ve bu spektrumlardan yararlanılarak hesaplanan Raman bant şiddetleriyle çizilen kalibrasyon eğrisi ise Şekil 4.14.c'de verilmektedir. Literatürde yer alan ve DNA analizine yönelik gerçekleştirilen çalışmalara bakıldığında zaman farklı tekniklerden yararlanıldığı görülmektedir. Söz konusu çalışmalarda elde edilen sonuçlara değinmek gerekirse elektrokimyasal yöntemlerle gerçekleştirilen çalışmalarda ulaşılan en düşük konsantrasyon değerleri; 6×10^{-16} M [58], 10^{-9} M [59] ve 5×10^{-13} M [60] arasında değişirken; optik yöntemlerin kullanıldığı çalışmalarda ise tespit limiti değerlerinin 10^{-17} M [61], 10^{-12} M [62] ve 10^{-9} M [54, 63] dolaylarında olduğu görülmektedir. Yaptığımız çalışmada ise nM düzeyine kadar ulaşılabildiği Şekil 4.14.c'deki kalibrasyon eğrisinde gösterilmektedir.



Şekil 4.14. a) Yüzey ölçümlerine ait spektrumlar, b) Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlere ait bantlar, c) Yüzey ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.



Şekil 4.14.(devamı) a) Yüzey ölçümlerine ait spektrumlar, b) Farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlere ait bantlar, c) Yüzey ölçümlerinden elde edilen kalibrasyon eğrisi.

5. TARTIŞMA VE YORUM

Çalışmada, GMO içeren gıdaların hızlı, seçici ve hassas tayini için, biyolojik uygulamalarda önemli avantajlar sağlayan nanopartiküllerden yararlanılan, YGRS'ye dayalı bir sistem geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmaya başlanırken ilk olarak kullanılacak olan partiküllerin standart şekilde sentezlenmesini sağlayacak yöntemler geliştirildikten sonra elimizdeki partiküllerin yüzey modifikasyonu aşamalarında kullanılması veya uygulanması gereken optimum değerler üzerine denemeler yapılmıştır. Nanopartikül yüzeylerinin modifikasyonu yanında işaretçi olarak kullanılan altın nanoçubuklardan elde edilen sinyallerin ne düzeyde olduğu ve hangi düzenlemelerle bu sinyallerde artış sağlanabileceği araştırılmıştır. Nanopartiküllerin özellikle modifikasyonlarıyla ilgili basamaklar optimize edildikten sonra ise kurgulanan sistemden sonuç alınması adına önemli bir temel taşı niteliğinde olan hedef dizilim ve partiküllerin yüzeyine immobilize edilen tamamlayıcı dizilimlerin en iyi hangi şartlarda hibrit yapı oluşturdukları araştırılmış ve literatürde yer alan benzer çalışmalar da göz önünde bulundurularak çalışılacak olan hibridizasyon koşulları belirlenmiştir.

Bu noktaya kadar yapılan çalışmalarda analizin temel basamaklarında herhangi bir sorun yaşanmaması adına sistemi etkileyebilecek tüm parametreler kontrol edilmeye çalışılmıştır. Bu noktadan sonra analiz sırasında sonuçların bizi yanlış yönlendirmesine sebep olabilecek ve aynı zamanda sistemin hassasiyetini de önemli derecede etkileyebilecek partiküller arası spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçilmesiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla hem partiküllerin yüzeyi modifiye edilirken açıkta kalmış olabilecek aktif uçların birbirleriyle etkileşimlerini engellemek amacıyla blokasyon ajanlarının etkisine bakılmış ve çeşitli yıkama prosedürleri uygulanarak partiküller arası veya yüzeylerinde bulunan açıkta kalmış aktif gruplar arasındaki spesifik olmayan etkileşimlerin kırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmalardan blokasyon ajanı olarak BSA molekülünün kullanılması ve buna ek olarak PBS tamponu ile birçok kez yıkama yapılmasının spesifik olmayan bağlanmaları ciddi oranlarda azalttığı sonucuna varılmıştır.

Çalışmayı benzerlerinden ayıran özellik olan farklı özelliklerdeki manyetik nanopartiküllerin kullanımı bu noktada daha önemli hale gelmiştir. Buraya kadar spesifik olmayan bağlanmalar da dahil olmak üzere birçok parametre optimize

edilmiş olsa da, kullanılan manyetik nanopartiküller ve işaretçi olarak kullanılan altın nanoçubuklarla uygulanacak sandviç analiz sisteminden elde edilen Raman bantları çalışmanın seyri bakımından etkili olmuştur. Sandviç yapıların oluşturulmasında hem altın kaplı manyetik küre ve altın nanoçubuklar, hem de silika kaplı APTS modifiyeli manyetik nanopartiküller ve altın nanoçubuklar kullanılarak, hangi partiküllerin kullanılması durumunda daha iyi Raman bantları elde edilebildiğine bakılmıştır. Bu noktada hem manyetik hem de işaretçi partikül olarak altın kaplı nanopartiküllerin kullanıldığı sistemden alınan cevaplar, hedef dizilimin ortamdaki varlığını daha iyi gösterebileceği gözlenmiş ve çalışmanın ileri aşamalarında manyetik nanopartikül olarak altın kaplı manyetik küre kullanılmıştır.

Çalışmanın son basamağında, kullanılan prob DNA dizilimlerinin partikül yüzeyine immobilize edilmiş haldeyken, hibridizasyon ortamındaki sıcaklık değişiminin sistemi ne yönde etkileyeceği araştırılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda sıcaklıkta meydana gelen artışın elde edilen Raman bant şiddetlerinde artışa sebep olduğu, bu yüzden de hibridizasyonun en yüksek bant şiddetlerinin elde edildiği 60 °C'da gerçekleştirilmesinin daha uygun olacağına karar verilmiştir. Ayrıca manyetik ve işaretçi partikülün analiz ortamına sırayla veya aynı anda konmasının, diğer bir deyişle sandviç yapının tek veya çift basamaklı olarak oluşturulmasının, etkisi olabileceği düşünülmüştür. Bu amaçla yapılan denemeler sonucunda, manyetik ve işaretçi partiküllerin analiz ortamına aynı anda konmasının, yani sandviç yapının tek adımda oluşturulmasının, çift aşamalı hibridizasyona göre daha iyi sonuçlar sağladığı belirlenmiştir.

Son basamak olarak ise farklı konsantrasyonlardaki hedef dizilimlerin belirlenen koşullar altında analiz yapılarak YGRS ölçümleri alınmış ve belirli konsantrasyon aralığında kalibrasyon eğrisi çıkartılmıştır. Geliştirilen analiz sisteminin, 25-1000 nM aralığında doğrusal sinyal oluşturduğu görülmüştür. Geliştirilen analiz sistemlerinde, hassasiyet kadar seçiciliğin, analiz süresinin ve güvenilirliğin de önemli olduğu bilinmektedir. Geliştirdiğimiz sistemde toplam analiz süresinin 1 saat civarında olması bakımından uzun süre ve karmaşık prosedürler gerektiren çalışmalara karşın bir üstünlük sağladığını söylemek mümkündür. Ayrıca sistemimizde elde edilen hassasiyet değeri çeşitli Raman etiketleri ve nanopartiküller kullanılarak daha da geliştirilmeye uygun bir sistem konumundadır.

KAYNAKLAR

1. Yıldız, A., Genç, Ö., ve Bektaş, S., "*Enstrümental Analiz Yöntemleri*." 2. Baskı ed. . 1997.
2. Han, X.X., B. Zhao, and Y. Ozaki, *Surface-enhanced Raman scattering for protein detection*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(7): p. 1719-1727.
3. Kneipp, K., H. Kneipp, V.B. Kartha, R. Manoharan, G. Deinum, I. Itzkan, R.R. Dasari, and M.S. Feld, *Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*. Physical Review E, 1998. **57**(6): p. R6281-R6284.
4. Bertone, J.F., K.M. Spencer, and J.M. Sylvia, *Fingerprinting CBRNE materials using surface-enhanced Raman scattering*. 2008: p. 69540J-69540J.
5. Stokes, R.J., E. McBride, C.G. Wilson, J.M. Girkin, W.E. Smith, and D. Graham, *Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy as a Sensitive and Selective Technique for the Detection of Folic Acid in Water and Human Serum*. Appl. Spectrosc., 2008. **62**(4): p. 371-376.
6. McNay, G., D. Eustace, W.E. Smith, K. Faulds, and D. Graham, *Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) and Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS): A Review of Applications*. Applied Spectroscopy, 2011. **65**(8): p. 825-837.
7. Lin, M., L. He, J. Awika, L. Yang, D.R. Ledoux, H. Li, and A. Mustapha, *Detection of Melamine in Gluten, Chicken Feed, and Processed Foods Using Surface Enhanced Raman Spectroscopy and HPLC*. Journal of Food Science, 2008. **73**(8): p. T129-T134.
8. Yazgan, N.N., I.H. Boyaci, A. Topcu, and U. Tamer, *Detection of melamine in milk by surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with magnetic and Raman-labeled nanoparticles*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2012. **403**(7): p. 2009-2017.
9. Alexander, T.A. and D.M. Le, *Characterization of a commercialized SERS-active substrate and its application to the identification of intact Bacillus endospores*. Appl. Opt., 2007. **46**(18): p. 3878-3890.

10. Culha, M., D. Stokes, L.R. Allain, and T. Vo-Dinh, *Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Based on a Self-Assembled Monolayer for Use in Gene Diagnostics*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(22): p. 6196-6201.
11. Temur, E., İ. Boyacı, U. Tamer, H. Unsal, and N. Aydogan, *A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010. **397**(4): p. 1595-1604.
12. He, L., N.-J. Kim, H. Li, Z. Hu, and M. Lin, *Use of a Fractal-like Gold Nanostructure in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Detection of Selected Food Contaminants*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008. **56**(21): p. 9843-9847.
13. Tansil, N.C. and Z.Q. Gao, *Nanoparticles in biomolecular detection*. Nano Today, 2006. **1**(1): p. 28-37.
14. Mirkin, C.A., R.L. Letsinger, R.C. Mucic, and J.J. Storhoff, *A DNA-based method for rationally assembling nanoparticles into macroscopic materials*. Nature, 1996. **382**(6592): p. 607-609.
15. Nam, J.M., S.I. Stoeva, and C.A. Mirkin, *Bio-bar-code-based DNA detection with PCR-like sensitivity*. Journal of the American Chemical Society, 2004. **126**(19): p. 5932-5933.
16. Cao, Y.C., R. Jin, and C.A. Mirkin, *Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection*. Science, 2002. **297**(5586): p. 1536-1540.
17. Ekici, K. and Y.C. Sancak, *A perspective on genetically modified food crops*. African Journal of Agricultural Research, 2011. **6**(7): p. 1639-1642.
18. Ahmed, F.E., *Detection of genetically modified organisms in foods*. Trends in Biotechnology, 2002. **20**(5): p. 215-223.
19. Brett, G.M., S.J. Chambers, L. Huang, and M.R.A. Morgan, *Design and development of immunoassays for detection of proteins*. Food Control, 1999. **10**(6): p. 401-406.
20. Kulaç, Ğ., Ağırdil, Y., Akın, M., *Sofralarımızdaki Tatlı Dert, Genetiği Değiştirilmiş Organizmalar ve Halk Sağlığına Etkileri*. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem]. 2006(31): p. 151-155.

21. Guven, B., *Gıda Uygulamalarına Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, 2011, Hacettepe Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü. p. 82.
22. Hanlon, E.B., R. Manoharan, T.W. Koo, K.E. Shafer, J.T. Motz, M. Fitzmaurice, J.R. Kramer, I. Itzkan, R.R. Dasari, and M.S. Feld, *Prospects for in vivo Raman spectroscopy*. *Physics in Medicine and Biology*, 2000. **45**(2): p. R1-R59.
23. Kneipp, K., H. Kneipp, P. Corio, S.D.M. Brown, K. Shafer, J. Motz, L.T. Perelman, E.B. Hanlon, A. Marucci, G. Dresselhaus, and M.S. Dresselhaus, *Surface-enhanced and normal Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy of single-walled carbon nanotubes*. *Physical Review Letters*, 2000. **84**(15): p. 3470-3473.
24. Herrero, A.M., *Raman spectroscopy for monitoring protein structure in muscle food systems*. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2008. **48**(6): p. 512-23.
25. Sivam, A.S., D. Sun-Waterhouse, C.O. Perera, and G.I.N. Waterhouse, *Application of FT-IR and Raman spectroscopy for the study of biopolymers in breads fortified with fibre and polyphenols*. *Food Research International*, 2011.
26. Cialla, D., A. Marz, R. Bohme, F. Theil, K. Weber, M. Schmitt, and J. Popp, *Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): progress and trends*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2012. **403**(1): p. 27-54.
27. Tripp, R.A., R.A. Dluhy, and Y.P. Zhao, *Novel nanostructures for SERS biosensing*. *Nano Today*, 2008. **3**(3-4): p. 31-37.
28. Yazgan, N.N., I.H. Boyaci, E. Temur, U. Tamer, and A. Topcu, *A high sensitive assay platform based on surface-enhanced Raman scattering for quantification of protease activity*. *Talanta*, 2010. **82**(2): p. 631-639.
29. Dougan, J.A. and K. Faulds, *Surface enhanced Raman scattering for multiplexed detection*. *Analyst*, 2012. **137**(3): p. 545-554.
30. McAnally, G., C. McLaughlin, R. Brown, D.C. Robson, K. Faulds, D.R. Tackley, W.E. Smith, and D. Graham, *SERRS dyes. - Part I. Synthesis of benzotriazole monoazo dyes as model analytes for surface enhanced resonance Raman scattering*. *Analyst*, 2002. **127**(6): p. 838-841.
31. McHugh, C.J., F.T. Docherty, D. Graham, and W.E. Smith, *SERRS dyes - Part 2. Syntheses and evaluation of dyes for multiple labelling for SERRS*. *Analyst*, 2004. **129**(1): p. 69-72.

32. Gellner, M., K. Kompe, and S. Schlucker, *Multiplexing with SERS labels using mixed SAMs of Raman reporter molecules*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. **394**(7): p. 1839-1844.
33. Faulds, K., F. McKenzie, W.E. Smith, and D. Graham, *Quantitative simultaneous multianalyte detection of DNA by dual-wavelength surface-enhanced resonance Raman scattering*. Angewandte Chemie-International Edition, 2007. **46**(11): p. 1829-1831.
34. Penn, S.G., L. He, and M.J. Natan, *Nanoparticles for bioanalysis*. Current Opinion in Chemical Biology, 2003. **7**(5): p. 609-615.
35. Rosi, N.L. and C.A. Mirkin, *Nanostructures in biodiagnostics*. Chemical Reviews, 2005. **105**(4): p. 1547-1562.
36. Gültekin, A., "*Sentetik reseptörlere dayalı nano algılama sistemleri.*", in *Kimya Bölümü*2009, Trakya Üniversitesi, Edirne.
37. Tothill, I.E., *Biosensors for cancer markers diagnosis*. Seminars in Cell & Developmental Biology, 2009. **20**(1): p. 55-62.
38. Haun, J.B., T.J. Yoon, H. Lee, and R. Weissleder, *Magnetic nanoparticle biosensors*. Wiley Interdisciplinary Reviews-Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2010. **2**(3): p. 291-304.
39. Aguilar, Z., *Nanomaterials for medical applications*. 2012, Amsterdam: Elsevier. p.
40. Wang, W.J., C.L. Chen, M.X. Qian, and X.S. Zhao, *Aptamer biosensor for protein detection using gold nanoparticles*. Analytical Biochemistry, 2008. **373**(2): p. 213-219.
41. Sinden, R.R., *DNA structure and function*. 1994, San Diego: Academic Press. xxiii, 398 p.
42. Sibley, C.G. and J.E. Ahlquist, *The Phylogeny of the Hominoid Primates, as Indicated by DNA-DNA Hybridization*. Journal of Molecular Evolution, 1984. **20**(1): p. 2-15.
43. Po, T., G. Steger, V. Rosenbaum, J. Kaper, and D. Riesner, *Double-Stranded Cucumovirus Associated Rna-5 - Experimental-Analysis of Necrogenic and Nonnecrogenic Variants by Temperature-Gradient Gel-Electrophoresis*. Nucleic Acids Research, 1987. **15**(13): p. 5069-5083.
44. Sassolas, A., B.D. Leca-Bouvier, and L.J. Blum, *DNA biosensors and microarrays*. Chemical Reviews, 2008. **108**(1): p. 109-139.

45. Nielsen, U.B. and B.H. Geierstanger, *Multiplexed sandwich assays in microarray format*. Journal of Immunological Methods, 2004. **290**(1–2): p. 107-120.
46. C. R. Lipton , J.X.D., G. D. Grothaus , P. L. Hunst , K. M. Magin , C. A. Mihaliak , F. M. Rubio & J. W. Stave *Guidelines for the Validation and Use of Immunoassays for Determination of Introduced Proteins in Biotechnology Enhanced Crops and Derived Food Ingredients*. Vol. 12:2. 2000, Food and Agricultural Immunology.
47. Ahmed, F.E., *Applications of molecular biology to biomedicine and toxicology*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 1995. **13**(1): p. 1-51.
48. Ahmed, F.E., *Molecular markers for early cancer detection*. Journal of Environmental Science and Health, Part C, 2000. **18**(2): p. 75-125.
49. Li, Q., L.F. Zhang, L.J. Bai, Z.B. Zhang, J. Zhu, N.C. Zhou, Z.P. Cheng, and X.L. Zhu, *Multistimuli-responsive hybrid nanoparticles with magnetic core and thermoresponsive fluorescence-labeled shell via surface-initiated RAFT polymerization*. Soft Matter, 2011. **7**(15): p. 6958-6966.
50. Ekstrom, S., P. Onnerfjord, J. Nilsson, M. Bengtsson, T. Laurell, and G. Marko-Varga, *Integrated microanalytical technology enabling rapid and automated protein identification*. Analytical Chemistry, 2000. **72**(2): p. 286-293.
51. Marty, J.L., *Application of Response-Surface Methodology to Optimization of Glutaraldehyde Activation of a Support for Enzyme Immobilization*. Applied Microbiology and Biotechnology, 1985. **22**(2): p. 88-91.
52. Storhoff, J.J., S.S. Marla, P. Bao, S. Hagenow, H. Mehta, A. Lucas, V. Garimella, T. Patno, W. Buckingham, W. Cork, and U.R. Muller, *Gold nanoparticle-based detection of genomic DNA targets on microarrays using a novel optical detection system*. Biosensors & Bioelectronics, 2004. **19**(8): p. 875-883.
53. Jana, N.R., L. Gearheart, and C.J. Murphy, *Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template*. Advanced Materials, 2001. **13**(18): p. 1389-1393.
54. Guven, B., I.H. Boyaci, U. Tamer, and P. Calik, *A rapid method for detection of genetically modified organisms based on magnetic separation and surface-enhanced Raman scattering*. Analyst, 2012. **137**(1): p. 202-208.

55. Kim, D.K., E. Tamiya, and Y.S. Kwon, *Development of a novel DNA detection system for real-time detection of DNA hybridization*. *Current Applied Physics*, 2006. **6**(4): p. 669-674.
56. He, M.X., K. Li, J.H. Mao, and Y.X. Zhou, *Rapid bio-barcode assay for multiplex DNA detection based on capillary DNA Analyzer*. *Journal of Virological Methods*, 2008. **151**(1): p. 126-131.
57. Cansiz, S., C. Ozen, C. Bayrac, A.T. Bayrac, F. Gul, M. Kavruk, R. Yilmaz, F. Eyidogan, and H.A. Oktem, *A sandwich-type DNA array platform for detection of GM targets in multiplex assay*. *European Food Research and Technology*, 2012. **235**(3): p. 429-437.
58. Azek, F., C. Grossiord, M. Joannes, B. Limoges, and P. Brossier, *Hybridization Assay at a Disposable Electrochemical Biosensor for the Attomole Detection of Amplified Human Cytomegalovirus DNA*. *Analytical Biochemistry*, 2000. **284**(1): p. 107-113.
59. Cheng, Y.-T., C.-C. Pun, C.-Y. Tsai, and P.-H. Chen, *An array-based CMOS biochip for electrical detection of DNA with multilayer self-assembly gold nanoparticles*. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2005. **109**(2): p. 249-255.
60. Park, S.J., T.A. Taton, and C.A. Mirkin, *Array-based electrical detection of DNA with nanoparticle probes*. *Science*, 2002. **295**(5559): p. 1503-1506.
61. Bowden, M., L. Song, and D.R. Walt, *Development of a Microfluidic Platform with an Optical Imaging Microarray Capable of Attomolar Target DNA Detection*. *Analytical Chemistry*, 2005. **77**(17): p. 5583-5588.
62. Zhou, X. and J. Zhou, *Improving the Signal Sensitivity and Photostability of DNA Hybridizations on Microarrays by Using Dye-Doped Core-Shell Silica Nanoparticles*. *Analytical Chemistry*, 2004. **76**(18): p. 5302-5312.
63. Bell, S.E.J. and N.M.S. Sirimuthu, *Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Sub-Micromolar Detection of DNA/RNA Mononucleotides*. *Journal of the American Chemical Society*, 2006. **128**(49): p. 15580-15581.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Mehmet Şöforoğlu

Doğum Yeri: Yeşilyurt / KKTC

Doğum Yılı: 1989

Medeni Hali: Bekar

Eğitim ve Akademik Durumu:

Ortaokul ve Lise (2000-2006) Güzelyurt Türk Maarif Koleji/ KKTC

Lisans (2006-2010) Hacettepe Üniversitesi Gıda Mühendisliği Bölümü

Yabancı Dil: İngilizce (İleri) , Almanca (Başlangıç)

