

**POLİ (METİL METAKRİLAT) TABANLI MİKROÇİP  
KULLANARAK YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN  
SPEKTROSKOPİSİ ÖLÇÜMÜNE DAYALI LUTEİNİZAN  
HORMON TAYİNİ**

**LUTEINIZING HORMONE DETECTION WITH POLY  
(METHYL METHACRYLATE) MICROCHIP BASED ON  
SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY**

**BELMA GJERGJIZI**

**PROF. DR. NECDET SAĞLAM**

**Tez Danışmanı**

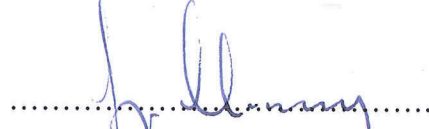
Hacettepe Üniversitesi  
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin  
Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü  
YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2017

**BELMA GJERGJIZI'nin hazırladığı 'Poli (Metil Metakrilat) Tabanlı Mikroçip Kullanarak Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi Ölçümüne Dayalı Luteinizan Hormon Tayini'** adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI'** nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. FEZA KORKUSUZ

Başkan



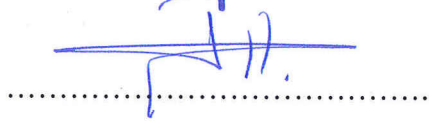
Prof. Dr. NECDET SAĞLAM

Danışman



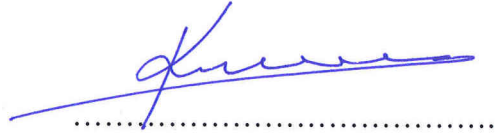
Prof. Dr. UĞUR TAMER

Üye



Prof. Dr. KADİR PEKMEZ

Üye



Yrd. Doç. Dr. MESUT ŞAM

Üye



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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

## YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.**

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etseniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 02/06/2020 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.**

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı ve ya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun ..... tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.**

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi**

02 / 06 / 2017

Belma GJERGJIZI

## ETİK

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

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

beyan ederim.

02/06/2017

BELMA GJERGJIZI

## ÖZET

# **POLİ (METİL METAKRİLAT) TABANLI MİKROÇİP KULLANARAK YÜZEYDE GÜÇLENDİRİLMİŞ RAMAN SPEKTROSKOPİSİ ÖLÇÜMÜNE DAYALI LUTEİNİZAN HORMON TAYİNİ**

**Belma GJERGJIZI**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Bölümü**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**Haziran 2017, 80 sayfa**

Proteinler moleküler düzeyde birçok fiziksel ve kimyasal olayı oluşturur. Proteinlerin ortamda düşük derişimlerde bulunmaları ve karmaşık etkileşimler meydana getirmeleri biyomoleküllerin analizi için alternatif tekniklerin geliştirilmesine yol açmaktadır. Dünya Anti-Doping Ajansı (World Anti-Doping Agency), erkek sporcular için yasaklanmış maddeler listesine protein sınıfında yer alan luteinizan hormonunu (LH) almıştır. Çok sayıdaki hormondan biri olan gonadotropin LH, ön hipofiz bezi tarafından üretilir ve testislerin Leydig hücrelerinde kolesterolün testosterona dönüşmesini sağlar, bu sayede kanın oksijen taşıma kapasitesini arttırdığından doping maddesi olarak kullanılır. Bu çalışma kapsamında hLH tayini için immünomanyetik ayırma ve Raman etiketleme esasına dayanan sandviç tipi bir biyosensör geliştirilmiştir. Poli (metil metakrilat) tabanlı (PMMA), birbirine kılcal valf ile bağlanmış dört odacıklı mikroçip içinde homojen sandviç yapısının oluşumuna, yıkama işlemine ve yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (YGRS) sinyal ölçümlerine imkan kılan yöntem geliştirilmiştir. Homojen sandviç yapının oluşumu için laboratuvar ortamında manyetik özelliğe sahip nanopartiküller ve altın nanopartiküller sentezlenmiştir ve gerekli modifikasyonlar

yapılmıştır. SERS sinyallerinin takibi için 4-Aminotiyofenol (4-ATP) Raman etiketi kullanılmıştır. hLH derişimlerine karşı 4-ATP'nin 1086 cm<sup>-1</sup>'deki C-S grubuna ait sinyal şiddetlerinin çizelgeye geçirilmesiyle kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Biorad orijinli kontrol serum örneklerinde hLH derişimleri (0-250 IU/L) ve SERS sinyalleri arasındaki korelasyon doğrusal olarak bulunmuştur (R<sup>2</sup>=0.9942). Bu çalışma yeni bir analiz yöntemi olarak; seçiciliği, hassasiyeti, yapay insan serumu örneklerinde uygulanabilirliği test edildikten sonra sunulmuştur.

**Anahtar Kelimeler:** Luteinizan Hormon, Raman Spektroskopisi, Manyetik Nanopartikül, Altın Nanopartikül, Mikroçip, 4-Aminotiyofenol

## **ABSTRACT**

# **LUTEINIZING HORMONE DETECTION WITH POLY (METHYL METHACRYLATE) MICROCHIP BASED ON SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY**

**Belma GJERGJIZI**

**Master of Science, Bioengineering Department**

**Advisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM**

**June 2017, 80 pages**

Proteins form many physical and chemical events at the molecular level. The presence of low concentrations of proteins in the environment and complex interactions lead to the development of alternative techniques for the analysis of biomolecules. The World Anti-Doping Agency (WADA) has received a protein class of luteinizing hormone (LH) in the list of prohibited substances for male athletes. Gonadotropin LH, one of the many hormones, is produced by the anterior pituitary gland and is used as doping material since it allows testis to convert cholesterol to testosterone in Leydig cells, thereby increasing blood oxygen carrying capacity. In this study, a sandwich type biosensor based on immunomagnetic separation and Raman labeling for hLH assay was developed. A method has been developed to make homogeneous sandwich formation, washing process and surface enhanced Raman spectroscopy (SERS) signal measurement in poly (methyl methacrylate) based (PMMA), four chambered microchips connected with capillary valves. For the formation of homogenous sandwich structure, nanoparticles and gold nanoparticles with magnetic properties were synthesized in laboratory and necessary modifications were made. 4-Aminothiophenol (4-ATP) Raman labeling was used to follow the

SERS signals. The signal intensity of the C-S group against hLH concentrations of 4-ATP at  $1086\text{ cm}^{-1}$  was plotted on a chart and calibration graph was created. The correlation between hLH concentrations (0-250 IU/L) and SERS signals were linear in the Biorad originated control serum samples ( $R^2 = 0.9942$ ). This study is presented as a new method of analysis after tested in artificial human serum samples for selectivity, sensitivity, and applicability.

**Key words:** Luteinizing hormone, Raman spectroscopy, Magnetic nanoparticle, Gold nanoparticle, Microchip, 4-Aminothiophenol



## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimi sürecinde, akademik tecrübesinden yanı sıra, hayat tecrübesinden de çok şey öğrendiğim, kendileriyle çalışma fırsatı sunduğu için saygıdeğer Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a;

Tezin planlanmasında ve çalışmaların yürütülmesinde çok büyük emeği olan, yoğun bilimsel programına rağmen sabrı ve ilgiyi hiç esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Uğur TAMER'e;

Çok değerli Biyomühendislik Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. İbrahim VARGEL'e;

Biyomühendislik alanına yönelmemi sağlayan, akademik kimliği ve değerli düşünceleri ile bir çok konuda örnek aldığım sayın Prof. Dr. Kadir PEKMEZ'e;

Deneysel uygulamaların gerçekleştirilmesinde teknik yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Zekiye SULUDERE, Yrd. Doç. Dr. Ender YILDIRIM ve Dr. Yeşim SOMAY SELBES'E;

Her türlü destek ve yardımlarından dolayı Arş. Gör. M. ERYILMAZ, Arş. Gör. H. İLHAN, Arş. Gör. Ü. DOĞAN, Arş. Gör. M. G. ÇAĞLAYAN ve Arş. Gör. H. TORUL'a;

Laboratuvara sağtıkları pozitif enerjileri ile kendimi hep iyi hissetmemi sağlayan, deneysel çalışmalarına karşılıksız yardım ve ilgi gösteren Uzm. Ecz. Esin Nagihan KASAP ve Kimyager Elçin Ezgi AHİ'ye;

Beni en iyi şekilde yetiştirdiklerine inandığım ve hayatım boyunca hep minnettar kalacağım annem Leonora GJERGJIZI ve babam Eroll GJERGJIZI'ye;

Tıp doktoru olma yolunda ilerleyerek beni gururlandıran, varlıkları ile hayatımı renklendiren kardeşlerim Nisa ve Varis'e;

Akademik hayatımın her adımında değerli fikir ve yönlendirmeleriyle büyük destek sağlayan, çok sevdiğim eşim Uzm. Dr. Ali NALLBANI'ye;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Belma GJERGJIZI

Ankara, 2017

# İÇİNDEKİLER

	<b><u>Sayfa</u></b>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iii
TEŞEKKÜR .....	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER .....	ix
ÇİZELGELER .....	xii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Glikoproteinler .....	3
2.1.1. Luteinizan Hormonun Moleküler Yapısı.....	3
2.1.2. Dolaşım Formu .....	4
2.1.3. Metabolizasyon.....	4
2.1.4. Reseptöre Bağlanma ve Aktivasyon.....	5
2.2. Nanopartiküller .....	6
2.2.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları.....	7
2.2.2. Manyetik Nanopartiküller .....	8
2.2.3. Manyetik Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri.....	9
2.2.4. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller .....	10
2.2.5. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller ile Yapılan Bazı Çalışmalar .....	10
2.2.6. Altın Nanopartiküller.....	11
2.3. Mikroçip Sistemleri .....	12
2.4. Raman Spektroskopisi .....	14
2.4.1. Saçılma Teorisi .....	15
2.4.2. Raman Spektroskopisi Sistemi .....	17
2.4.3. Yüzeyi Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi .....	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	20
3.1. Kimyasal Maddeler.....	20
3.2. Biyokimyasallar.....	20

3.3. Çözeltiler .....	21
3.4. Cihazlar ve Gereçler .....	22
3.5. Mikroçip Tasarımı ve Üretimi .....	23
3.6. Yöntem .....	25
4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR .....	29
4.1. Sentez Çalışmaları .....	29
4.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi .....	29
4.1.2. Altın Kaplı Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Nanopartiküllerin Sentezi .....	29
4.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin ve Altın Nanoçubukların Sentezi .....	30
4.3. Karakterizasyon Çalışmaları .....	31
4.3.1. Altın Kaplı Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Nanopartiküllerin Karakterizasyonu .....	31
4.3.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin ve Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu .....	33
4.4. Modifikasyon Çalışmaları .....	36
4.4.1. Yüzeyde Moleküllerin Tek Tabaka Halinde Düzenlenmesi .....	36
4.4.2. Raman Etiketinin Bağlanması .....	36
4.4.3. Karbonil Grupların Aktif Hale Getirilmesi .....	36
4.4.4. Nanopartikül Yüzeyine Antikoru İmmobilizasyonu .....	37
4.4.5. Spesifik Olmayan Bağlanmaların Bloklama Ajanları ile Engellenmesi .....	37
4.4.6. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au Nanopartiküllerin Protein ile Etkileştirilmesi .....	37
4.5. Optimizasyon Çalışmaları .....	37
4.5.1. Raman Mikroskopu Objektifinin Optimizasyonu .....	37
4.5.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu .....	39
4.5.2.1. Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au NP Miktarının Optimizasyonu .....	39
4.5.2.2. Altın Nanoçubuk ve Küresel Altın Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu .....	41
4.5.2.3. Altın Nanoçubuklar/Nanoküreler Kullanılarak Elde Edilen SERS Sinyalleri .....	42
4.5.2.4. NP ile Etkileşen Antikor ve Protein Miktarının Optimizasyonu .....	43
4.6. Tasarlanan İmmünoanaliz Sistemin Kontrolü .....	44
4.6.1. Antikor Kullanılmadan Yapılan Nonspesifik Deneme .....	44
4.6.2. Antikor Seçiciliğinin Test Edilmesi .....	45
4.7. Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması .....	46
4.8. Yöntemin Biorad Orijinli Kontrol Serum Örneklerine Uygulanması .....	48

4.9. Validasyon Deneyleri .....	49
5. SONUÇ VE TARTIŞMA.....	52
6. KAYNAKLAR.....	57
ÖZGEÇMİŞ.....	63

## ŞEKİLLER

### Sayfa

Şekil 2.1. Glikoprotein hormon reseptörünün yapısı; a) Hücre içi 7 geçişli transmembranın ve glikoprotein hormon reseptörlerinin karakteristik büyük hücre dışı alanları ilustrasyonu, b) Hücre dışı alanda lösin açısından zengin tekrarların üç boyutlu şematığı, c) Bir bireysel LRR'nin yapısı, burada "X" herhangi bir amino asidi temsil eder.....	5
Şekil 2.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması; a) Fullerenler, b) Moleküler nanopartiküller, c) İyonik nanopartiküller, d) Metal nanopartiküller, e) Pasifleştirilmiş nanopartiküller, f) Nano alaşımlar .....	7
Şekil 2.3. Manyetit kristal yapısı.....	9
Şekil 2.4. Kolloidal altın nanoçubukların farklı yüzey plazmon bantları; transvers: 520-530 nm, enine yüzey plazmon bantı; longitudinal: 700-1500 nm, boyuna yüzey plazmon bantı .....	12
Şekil 2.5. Kılcal elektroforez mikroçip ayırma sisteminin şematik görünümü; w-kanal hidrolik çapı, Ld-ayırma uzunluğu, $\sigma$ -karakteristik analit bant genişliği, $\Delta L$ -örnek tepeleri arasındaki en kısa ayırma mesafesi.....	13
Şekil 2.6. On katmanlı yığın mikroreaktörünün fotoğrafı .....	14
Şekil 2.7. Antijen-antibadi etkileşiminin şematik gösterimi; a) ELISA plakası, b) Mikroçip ..	14
Şekil 2.8. Rayleigh ve Raman saçılımının Jablonski enerji diyagramı .....	16
Şekil 2.9. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi .....	17
Şekil 3.1. a) Mikroçipin genel görünümü, b) Kılcal valfin detay görünümü, c) Kılcal arayüzün valf kanalı boyunca hareketi, d) Kılcal arayüzün 180 °'lik dönüşe ulaştığında durması.....	24
Şekil 3.2. Kılcal valflerin çalışması; a) Birinci haznenin doldurulması ile çalışma sıvısının valf kanalı boyunca ilerlemesi ve ikinci hazneye ulaşmadan durması, b) İkinci haznenin doldurulmasında birinci hazneye doğru geri akışın olması bir miktar karışmaya neden olmaktadır, ancak bu karışma miktarı çalışmayı etkilememektedir .....	24

Şekil 3.3. Nanopartiküllerin modifikasyon aşaması ve homojen sandviç yapısının oluşumu; a) $Fe_3O_4@Au$ NP modifikasyonu, b) Altın NP modifikasyonu, c) Mikroçipte ' $Fe_3O_4@Au$ -hLH-AuNP' sandviç yapısının oluşumu .....	27
Şekil 3.4. Yöntemin PMMA tabanlı mikroçipte uygulanması; a) $Fe_3O_4@Au$ NP – LH konjugatının mikroçipin birinci haznesine ve 4-ATP ile modifiye AuNP mikroçipin ikinci haznesine aktarılması, b) İkinci haznede NP'lerin ektileştirilmesi ve homojen sandviç yapının oluşumu, c) NP'lerin oluşturduğu sandviç yapının mıknatısla üçüncü hazneye sürüklenerek MES (pH 6.0) tamponu ile yıkanması, d) Yıkama işleminden sonra NP'lerin mıknatısla mikroçipin ölçüm haznesine aktarılması .....	28
Şekil 4.1. Laboratuvar ortamında sentezlenen manyetik nanopartiküller .....	29
Şekil 4.2. Laboratuvar ortamında sentezlenen altın kaplı $Fe_3O_4$ nanopartikülleri; a) Dış manyetik alan olmadığında koloidal $Fe_3O_4@Au$ NP b) Dış manyetik alan uygulandığında $Fe_3O_4@Au$ NP çözeltide toplanması .....	30
Şekil 4.3. Laboratuvar ortamında küresel altın NP ve altın nanoçubukların sentezi .....	31
Şekil 4.4. Altın kaplı $Fe_3O_4$ nanopartiküllerin TEM görüntüsü .....	32
Şekil 4.5. Altın kaplı $Fe_3O_4$ nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu .....	33
Şekil 4.6. Altın nanoçubukların TEM görüntüsü .....	34
Şekil 4.7. Küresel altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü .....	34
Şekil 4.8. Altın nanoçubukların UV-Vis absorpsiyon spektrumu .....	35
Şekil 4.9. Küresel altın nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu .....	35
Şekil 4.10. Raman spektroskopisi ile mikroçipten ölçüm alınması ve mikroçipin son odacığına odaklı Raman mikroskopunun 10X objektifi .....	38
Şekil 4.11. Farklı Raman mikroskobu objektiflerinden alınan SERS spektrumları.....	39
Şekil 4.12. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda modifiye edilen $Fe_3O_4@Au$ NP'lerden kaydedilen SERS sinyalleri.....	41
Şekil 4.13. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda modifiye edilen Au nanoçubuklardan kaydedilen SERS sinyalleri.....	42

Şekil 4.14. İmmünoanaliz yönteminde homojen sandviç yapısının küresel Au nanopartiküller ve Au nanoçubuklar kullanılarak oluşturulması sırasında kaydedilen SERS sinyalleri.....	43
Şekil 4.15. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda antikor ile etkileşen NP'lerden elde edilen SERS sinyalleri .....	43
Şekil 4.16. Modifikasyon aşamasında NP'lerin yüzeyine antikor bağlanması ve antikor kullanılmadan elde edilen SERS spektrumlarının incelenmesi .....	44
Şekil 4.17. İmmünoanaliz yöntemin luteinizan hormona seçici olduğunu gösteren SERS spektrumu .....	45
Şekil 4.18. Aynı derişime sahip farklı proteinler ve kör çözelti ile yapılan denemeler sonucu elde edilen SERS sinyallerinin incelenmesi .....	46
Şekil 4.19. Homojen sandviç sisteminde farklı hLH derişimlerinde elde edilen SERS spektrumları .....	47
Şekil 4.20. Homojen sandviç sisteminde farklı hLH derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9923$ , $y = 14326x + 20906$ ) .....	47
Şekil 4.21. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerde hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen SERS spektrumları .....	48
Şekil 4. 22. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerde hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9942$ , $y = 13487x + 13374$ ) .....	49
Şekil 4.23. Homojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumlarının analizi..	50

## ÇİZELGELER

	<b><u>Sayfa</u></b>
Çizelge 2.1. Luteinizan hormon özellikleri .....	3
Çizelge 2.2. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri.....	8
Çizelge 2.3. Raman spektroskopisi için kullanılan lazer türleri ve dalgaboyları .....	18
Çizelge 4.1. Homojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen regresyon eşitliğinden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri.....	51
Çizelge 4.2. Biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen geri kazanım değerleri ve geliştirilen immünoanaliz yöntemin doğruluğu.....	51
Çizelge 5.1. LH tayini için geliştirilen yöntemlerin LOD değerlerine göre karşılaştırılması ...	55



## SİMGELER VE KISALTMALAR

### Simgeler

IU	International Unit; Uluslararası Birim
kV	Kilovolt
mW	Miliwatt
nm	Nanometre
rpm	Revolutions per Minute; Dakikada Devir Sayısı
$\Omega$	Ohm
$\rho$	Yoğunluk

### Kısaltmalar

4-ATP	4-Aminotiyofenol
CTAB	Heksadesiltrimetil Amonyum Bromür
CCD	Charge Coupled Device; Kemilüminesans Kamera
EDC	N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-Etilkarbodimid Hidroklorür
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit Disodyum Tuzu
Eu	Europium
hLH	İnsan Luteinizan Hormonu
hCG	İnsan Korionik Gonadotropin
hGH	İnsan Büyüme Hormonu
IgG	İmmünoglobülin G
LOD	Limit of Detection; Tespit Limiti
LOQ	Limit of Quantification; Tayin Limiti
MES	2-(N-Morfolino)Etanesulfonik Asit Monohidrat
MUA	Merkaptoundekaonik Asit
NHS	N-Hidroksisülfosüksinimid Sodyum Tuzu
AuNP	Altın Nanopartikül
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> @Au	Altın Kaplı Demir Oksit
PBS	Phosphat Buffered Saline; Fosfat Tamponu

PMMA	Poli (Metil Metakrilat)
YGRS	Yüzeyi Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
TEM	Transmission Electron Microscopy; Geçirimli Elektron Mikroskopi
TLC	İnce Tabaka Kromatografisi
UV	Ultraviyole
WADA	World Anti-Doping Agency; Dünya Anti-Doping Ajansı

# 1. GİRİŞ

“Genomiks” ve “Proteomiks” alanındaki gelişmeler, dünyadaki tüm makro bozuklukların ve bu bozuklukların giderilmesi için uygulanması gereken tedavilerin ancak moleküler düzeyde gen ekspresyon ürünleri proteinlerin izlenmesi ile mümkün olacağını ortaya koymuştur. Hastalıklarda erken tanı iyileşme sağlanması adına çok büyük önem taşıyor. Bu nedenle erken tanı için olanak sağlayacak belirteçlerin bulunması ve bunlar için tayin yöntemlerinin geliştirilmesine yönelik çalışmalar oldukça hız kazanmıştır.

Günümüzde hastane ve laboratuvarlarda vücut sıvılarında bulunan biyolojik belirteçlerin tayini için kullanılan enzim bağlı immünosorbent (ELISA), homojen ve heterojen immünosorbent testi gibi klasik yöntemlerin nispetten uzun tahlil zamanı, yüksek miktarda numune gereksinimi, pahalı antikor reaktifleri ve rahatsız edici sıvı işleme prosedürleri gibi dezavantajları mevcuttur [1].

İdeal bir analiz platformun oluşturulması için son yıllarda biyosensörler üzerinde bir çok çalışma yapılmaktadır. Biyosensörler, bir karışım içerisinde hedef analiti seçici olarak tayin edebilen analitik cihazlardır. Genellikle moleküler tanıma ajanları olarak antikorlar veya antijenler kullanılır. Böylece antikor ile antijen arasında oluşan kompleks ile yüksek seçicilik ve hassasiyet sağlanır. İmmünosensörlerde monoklonal ya da poliklonal antikorlar kullanılır. Sandviç tipi biyosensörler tek tip poliklonal antikor ile hazırlanabilir [2].

Protein sınıfında yer alan luteinizan hormon (LH), gonadotropik hücreler tarafından anterior hipofiz bezinde sentezlenen ve salgılanan bir glikoprotein hormondur. Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) [3], erkek sporcular için yasaklanmış maddeler listesine LH koymuştur. Bu hormon, testislerin Leydig hücrelerinde kolesterolün testosterona dönüşmesini sağlar [4], bu sayede kan dolaşımındaki kırmızı kan hücrelerinin sayısı artar. Kan hücreleri akciğerlerden kaslara kadar oksijen taşıdığından, kandaki daha yüksek bir konsantrasyon, bir sporcunun aerobik kapasitesini ( $VO_2$  max) ve dayanıklılığını artırır, dolayısıyla atletik performansı da artar [5].

Tez çalışması kapsamında LH tayini için sandviç tipi bir biyosensör geliştirilmiştir. Sandviç yapısı, manyetik nanopatiküllerin kullanımı ile immünomanyetik ayırım sonucunda analitin izolasyonunu başarılı bir şekilde sağlayan bir yöntem olarak bir çok çalışmada kullanılmıştır [6].

LH analizinin SERS (yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi) optik ölçümü ile yapılması hedeflenmiştir. SERS yöntemi ile düzgün ve yüksek şiddette spektrumlar üretilmesi için yüzey pürüzlülüğü temel gerekliliktir [7]. Yüzey pürüzlülüğü, laboratuvarında koloidal altın nanopartiküllerin sentezlenmesi ile gerçekleştirilmiştir. Yüksek Raman saçılımı olan 4-Aminotiyofenol (4-ATP), Raman etiketi olarak kullanılmıştır. Çalışmada 4-ATP etiketi koloidal altın nanopartiküllerinin yüzeyine konjuge edilmiştir, bu sayede LH saptanmasında işaretleyici olarak kullanılmıştır.

Laboratuvar çalışmalarındaki numune hazırlama prosedürlerinin mikroçipe uyarlanması ile minyatürize bir sistem oluşturulmuştur. Bu sayede küçük alanda gerçekleştirilen, oldukça az miktarlarda numunenin ve solvanın tüketildiği, ticari potansiyele sahip, analiz aşamasını ve süresini minimize eden, duyarlı ve seçici bir analiz yöntemi geliştirilmiştir. Doping merkezlerinde kullanılan geleneksel, fazla örnek ve materyalin tüketildiği tekniklere alternatif bir tayin yöntemi olacağı düşünülmektedir. Nanopartikül ve mikroçip temelli bu yöntem her ne kadar hızlı, kolay ve ucuz bir teknik olarak karşımıza çıksa da, kullanılan antikorların pahalı olması yöntemin öne çıkan dezavantajlarından biri olarak sayılabilir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Glikoproteinler

Glikoproteinler, kovalent bağlı şeker grupları içeren proteinlerdir. Şekerlerin hidrofilik ve kutupsal özellikleri, bağlı oldukları proteinin kimyasal özelliklerini önemli ölçüde değiştirebilir. Bir glikoproteinin düzgün çalışması ve hücre veya organizmada nihai hedefine ulaşması için şekerlerin eklenmesi sıklıkla gereklidir. Yapısına ve sentez mekanizmasına göre 3 tip glikoprotein vardır: N-bağlantılı glikoproteinler, O-bağlantılı glikoproteinler ve enzimatik olmayan glikozile edilmiş glikoproteinler. Birçok hormon glikoprotein yapısındadır [8].

Glikoprotein hormon ailesi 3 gonadotropin; luteinizan hormon (LH), follikül stimulan hormon (FSH) ve koryonik gonadotropin (CG) ile gonadotropin olmayan tiroid stimulan hormon (TSH) tarafından oluşturulur.

#### 2.1.1. Luteinizan Hormonun Moleküler Yapısı

LH heterodimerik glikoproteinlerdendir.  $\alpha$  ve  $\beta$  alt birimlerinden oluşur. TSH, FSH, CG ile birlikte ortak bir 92 amino asit  $\alpha$  altbirimi paylaşırlar, insanlardaki geni ise 6q12-q21 kromozom üzerinde bulunur [9]. Eşsiz fonksiyonları ve reseptör bağlama kapasiteleri  $\beta$  altbirimleri (121 aminoasit) arasındaki farklılıklarından kaynaklanmaktadır (Çizelge 2.1).  $\beta$  alt biriminin transkripsiyonu, LH üretiminde hız sınırlayıcıdır [10]. Diğer benzer kategorideki hormonların aksine LH bütün omurgalı hayvanlarda bulunur. Dolaşımdaki yarılanma ömrü dolaşan izoformlarına bağlı olarak dakikalar ile sınırlıdır (yaklaşık 20 dakika). Yarılanma ömrünün kısa olmasının fizyolojik önemi LH pulsasyonlarına olanak sağlamasıdır [11].

Çizelge 2.1. Luteinizan hormon özellikleri

<b>Moleküler ağırlık (Da)</b>	~ 30,000
<b><math>\alpha</math> Altbirimi Gen lokalizasyonu</b>	6q12–q21
<b>Olgun altbirim boyutu (amino asit sayısı)</b>	92
<b><math>\beta</math> Altbirimi Gen lokalizasyonu</b>	19q13.32
<b>Olgun altbirim boyutu (amino asit sayısı)</b>	121

Doğal olarak bulunan LH varyantlarının özellikleri karakterize edilebilmiştir. Ek glikozilasyon kısmına sahip LH varyantının, doğal LH varyantı ile kıyaslandığında bazı popülasyonlarda fazla olduğu bilinmektedir [12]. LH varyantları aynı zamanda doğal LH varyantına göre farklı biyolojik etkilere sahiptir [13]. Bu varyantlar açıklanamayan infertilite, kadınlarda ovulatuvar disfonksiyona bağlı subfertilite, erkeklerde ise yavaşlamış puberte gelişimi ile ilişkili bulunmuştur [14]. Daha az sıklıkla görülen  $\beta$  altbiriminde tek aminoasit değişimi olan LH varyantı (102. aminoasitte serin yerine glisin) menstrüel düzensizlik ve erkeklerde infertilite ile ilişkili olduğu gösterilmiştir [15].

### **2.1.2. Dolaşım Formu**

Ön hipofiz bezin gonadotropik hücreleri, hipotalamus kaynaklı gonadotropin salgılatıcı hormona (GnRH) yanıt olarak ovulasyonu düzenleyen LH üretir. Bahsi geçen hipofiz hücreleri, başka bir gonadotropin olan FSH da salgırlar. LH ve FSH testis ve ovaryumdaki reseptörlere bağlanır ve seks steroid üretimini ve gametogenezi teşvik ederek gonadal fonksiyonu düzenler [16]. Her ikisi de erkeklerde ve kadınlarda üreme için gereklidir. LH ve FSH, hipotalamik-pituitar-gonadal ekseninde merkezi rol oynar ve bu nedenle eksiklikleri ile ilgili koşullar, hipotalamusun veya hipofizin patolojisinden kaynaklanabilir.

Kadınlarda LH overleri estradiol, progesteron ve androjenleri siklik olarak salgılatması için uyarır ve ovulasyon sinyali olarak görev yapar. Erkeklerde ise hem LH hem de FSH birlikte spermatogenezis için gerekli hormonlardır. LH, Leydig hücrelerinde kolesterolü testosterona dönüştürmeyi stimüle eder [17].

LH izoform kompozisyon varyasyonları üreme yaşam döngüsünde gözlemlenmiştir. Genç (puberte sonrasındaki) kadınlarda kısa yarı ömürlü ama yüksek biyopotent LH izoformları görülürken daha uzun yarı ömürlü LH türleri menopoz sonrasındaki kadınlarda saptanmıştır. Erkeklerde LH, testosteron üretimini testisteki Leydig hücreleri sayesinde stimüle eder [18].

### **2.1.3. Metabolizasyon**

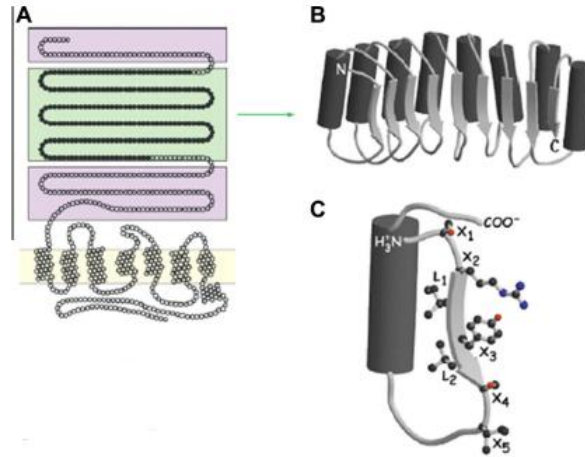
Gonadotropinler tamamıyla idrardan atılmadan önce bir dizi metabolik dönüşüm geçirir [9]. Gonadotropin glikozilasyonunun kapsamı moleküler yükü belirlerken temizleme oranını da yönetir, daha asidik izoformların in vivo olarak daha uzun yarılanma ömrü vardır [19]. Araştırmacılar LH'nin sialik asit içermesinin metabolik klirens oranı ile ilişkili olduğunu göstermişlerdir [20].

LH'nin birden fazla dolaşım biçimi kan ve idrardaki ölçümlerini zorlaştırır [21]. Glikozilasyon ve degradasyon hızlarındaki farklılıklara ek olarak, genetik varyantların immünoassay ile LH'nin saptanmasını engellediği gösterilmiştir [22, 23].

#### 2.1.4. Reseptöre Bağlanma ve Aktivasyon

LH veya lutropin reseptörü (LHR) olarak da bilinen LH/koryogonadotropin reseptörüne (LHCGR) bağlanır ve reseptörü etkinleştirir [24]. Bu 675 aminoasit G proteine eşlenmiş reseptör, FSH ve TSH reseptörleri gibi glikoprotein hormon reseptörlerinin rhodopsin alt ailesinin bir üyesidir. Tüm G proteinli reseptörlerde olduğu gibi, LHCGR de hücre zarı içinde yedi transmembran etki alanına yerleşir. LHCGR'nin alışılmadık büyük hücre dışı alanı, lösün açısından zengin tekrarları ve glikozilasyon için birden fazla bölgeye sahip olması ile karakterizedir (Şekil 2.1). İnsan LHCGR geni (FSH reseptörü ile aynı genel bölgede) kromozom 2p21 üzerinde bulunur [25].

LHCGR, dişi üreme rolüyle uyumlu olarak tekal, luteal, interstisyel ve farklılaşmış granuloza hücreleri de dahil olmak üzere yumurtalıkta birden fazla hücre tipiyle ifade edilir [24].



Şekil 2.1. Glikoprotein hormon reseptörünün yapısı; a) Hücre içi 7 geçişli transmembranın ve glikoprotein hormon reseptörlerinin karakteristik büyük hücre dışı alanları ilustrasyonu, b) Hücre dışı alanda lösün açısından zengin tekrarların (LRR'ler) üç boyutlu şematığı, c) Bir bireysel LRR'nin yapısı, burada "X" herhangi bir amino asidi temsil eder [26]

LHCGR'deki mutasyonlar, psuedohermafroditizm, mikropenis, hipospadias ve infertilite gibi gelişimsel ve üreme anormallikleriyle ilişkilidir [24]. Yeni veriler ayrıca, LHCGR dizisindeki

polimorfizmlerin polikistik over sendromu da dahil olmak üzere infertiliteye yol açan koşullar için risk oluşturduğunu ileri sürmektedir.

## **2.2. Nanopartiküller**

Nanometre metrenin milyarda veya milimetrenin milyonda biridir. Başka bir ifade ile bir nanometre içine ard arda 2-3 atom dizilebilir ve nano ölçekte bir yapı yaklaşık 100-1000 atomun bir araya gelmesiyle oluşturulur. Türk dil kurumu tarafından “n” sembolü ile ifade edilir ve SI birim sisteminde  $10^{-9}$ 'a karşılık gelir [27]. Nanopartiküller (NP); "American Society for Testing and Materials (ASTM)"'a göre partikül boyutları iki veya üç boyutlu olmak üzere 1 nm ile 100 nm uzunlukta olan parçacıklar olarak ifade edilir [28].

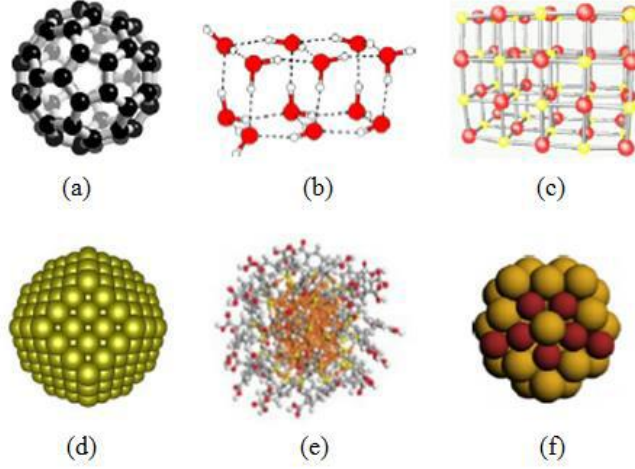
NP yüzyıllar önce, özellikleri bilinmeden çok geniş alanlarda kullanılmıştır. Mısırlılar koloidal altın NP'leri kozmetiklerde, ayrıca gümüş ve bakır NP'lerini seramik sırlara metalik parlaklık vermek için kullanmışlardır [29].

NP boyutu, şekli, yüzey özellikleri ve atomik dizilimleri büyük hacimli nesnelere daha avantajlı fiziksel ve kimyasal özellikler gösterir. Özellikle yüksek yüzey/hacim oranından dolayı, bu yapılar üstün mekanik, optik, manyetik, elektriksel ve termal özelliklere sahiptir [30].

Nanopartiküllerin sınıflandırılması birçok özelliğe göre yapılmakta olup, temel olarak kendilerini oluşturan atomların özelliklerine göre Şekil 2.2'de gösterildiği gibi sınıflandırılabilirler;

1. Karbon bazlı nanopartiküller (multi duvarlı karbon nanotüpler, fullerenler vb.),
2. Metal bazlı nanopartiküller (altın kolloidler, süperparamanyetik demiroksit nanopartiküller, nanoçubuklar, nanokabuklar vb.),
3. Yarı iletken bazlı nanopartiküller (kuantum noktaları vb.) [31].





Şekil 2.2. Nanopartiküllerin sınıflandırılması; a) Fullerenler, b) Moleküler nanopartiküller, c) İyonik nanopartiküller, d) Metal nanopartiküller, e) Pasifleştirilmiş nanopartiküller, f) Nano alaşımlar [29]

### 2.2.1. Nanopartiküllerin Kullanım Alanları

Günümüzde nanoteknolojinin gelişimi hızla devam etmektedir. Bu gelişim yaşam standartlarını ve hayat kalitesini yükselterek Dünyada enerji, yapı ve inşaat, gıda ve tarım, sağlık gibi birçok uygulama alanında önemli bir rol oynamaktadır. En önemli uygulama alanlarına örnek verilmiştir:

#### Sensör Uygulamaları:

Nanopartiküllerin optik özelliklerinden yararlanılarak tarım ve gıda alanlarında çok düşük miktarlardaki patojenlerin veya kimyasal kontaminasyonun tespit edilmesi sağlanabilir.

#### Depolama:

Hidrojen depolanmasındaki sorun, hidrojen enerjisinin kullanımını engellemektedir. Her ne kadar istenilen performansta bir sistem elde edilmemiş olsa da karbon nanotüpler sayesinde hidrojen depolanması hedeflenmektedir.

#### Çevre Temizliği:

Karbon nanotüplerin yüksek yüzey alanı, mekanik kuvvet gibi özellikleri su, hava ve diğer malzemeleri temizlemeye yarayan filtrelerde kullanılması planlanmaktadır.

#### Sağlık Alanı:

Nanopartiküllerin dış yüzeyinin fonksiyonlaştırılması sonucunda kontrollü ilaç salınımı sistemlerinde kullanılması adına bir çok çalışma yapılmaktadır. Bu sayede kanser tedavisinde

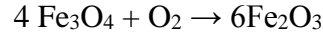
kullanılan kemoterapi ve radyoterapi yöntemlerinin yerine nano konteynerler sayesinde ilaçlar vücudumuzun tümör bölgesine güvenli bir şekilde ulaştırılabilir [32].

### 2.2.2. Manyetik Nanopartiküller

Manyetik nanopartiküller Ni, Co, Fe, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> ve Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> gibi metal ve metal oksitlerden oluşup bir sıvı içerisinde süperparamanyetik dispersiyonlar meydana getirir. Genelde metaller toksiktir ve oksitlenmeye eğilimlidir. Örneğin Ni, Co ve Fe atmosfer koşulları altında NiO, CoO ve FeO alaşımlarına oksitlenir. Nanopartiküllerin büyük yüzey alanı sebebiyle oksidasyon sorununu önlemek için sentetik ve/veya fiziksel bir yöntem geliştirilememiştir. Demir oksitlerin manyetik cevap özelliği diğer metallere göre daha düşük olmasına rağmen daha az okside olup kararlı manyetik etkilerini korumaktadırlar [33].

Demir oksitler ferrimanyetik özellik gösterir. Manyetit (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) ve maghemit ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) en genel ve en çok rastlanan demir oksitlerdir [34].

Manyetit havada maghemite, 300 °C'den yüksek sıcaklıklarda ise hematite oksitlenir. Maghemit ferrimanyetiktir (az manyetik özelliğine sahip), fakat hematit antiferromanyetik olduğundan bu dönüşümün göz önünde bulundurulması gerekmektedir [35].

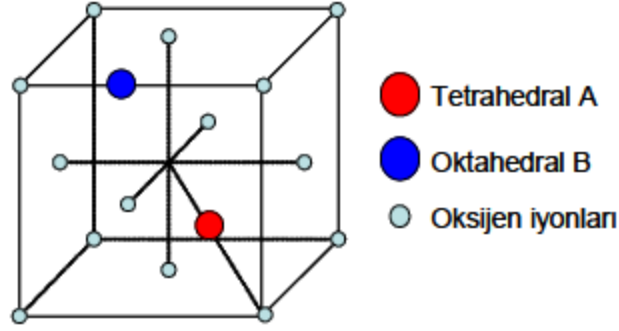


Manyetit ve maghemit aynı fiziksel özelliklere sahip olmalarına rağmen (Çizelge 2.2) manyetik özellikleri alt örgü etkileşimlerinden dolayı değişmektedir. Maghemitin ( $\gamma$ -Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kristal yapısında sadece Fe<sup>3+</sup> iyonları mevcuttur ve yarısı tetrahedral diğer yarısı da oktahedraldir. Manyetit (FeO.Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) kristal yapısı ise 1:2 molar oranında oktahedral Fe<sup>2+</sup> ve yarısı tetrahedral, diğer yarısı oktahedral Fe<sup>3+</sup> iyonlarından oluşmaktadır [34].

Çizelge 2.2. Manyetit ve maghemitin fiziksel özellikleri

	Kristal yapısı	Hücre boyutu (nm)	Renk	Doğunluk miktatsızlığı	Curie sıcaklığı
Manyetit	Kübik	a <sub>0</sub> =0.839	Siyah	90-98	850
Maghemit	Kübik tetragonal	a <sub>0</sub> =0.834	Kırmızı kahve	76-81	820-986

Manyetit ters spinal kristal yapısındadır (Şekil 2.3). Oksijen iyonları küp içinde düzenli olarak birbirine karşı gelen pozisyonlarda yerleşmiştir. Kübik birim hücre merkezi 56 atom olmak üzere, 32  $O^{2-}$  anyon ve 16  $Fe^{3+}$  ve 8  $Fe^{2+}$  katyonlardan oluşmaktadır.



Şekil 2.3. Manyetitin kristal yapısı [36]

Manyetitin elektron konfigürasyonu eşlenmemiş 3d elektronlarını içermektedir.  $Fe^{3+}$  iyonlarının spinleri ile  $Fe^{3+}$  ve  $Fe^{2+}$  iyonlarının spinleri ters paralel ve eşit olmayan bir biçimdedir [36]. Manyetitin izoelektrik noktası 6.8'dir. Kararlı bir manyetik koloidal sıvı oluşmasında, en önemli unsur manyetit nanopartiküllerin kararlı olmasıdır. Manyetit nanopartiküllerinin izoelektrik noktası sitrat veya silika ile kaplanarak modifiye edilir ve kararlılık sağlanır [35].

### 2.2.3. Manyetik Nanopartiküllerin Sentez Yöntemleri

Nano yapının farklı fazlarda ve fiziksel özelliklerde sentezlenmesi için (sentezlenen malzemenin kararlılık durumuna ve sentez süresine bağlı olarak) birçok teknik geliştirilmiştir. En yaygın olarak kullanılan teknikler şunlardır;

#### İkili Çöktürme

Oda sıcaklığında veya yüksek sıcaklıklarda belli oranlarda  $Fe^{2+}$  ve  $Fe^{3+}$  iyonları güçlü karıştırıcı altında bazik ortamda çöktürülür. Parçacıkların boyutları bazik ortam,  $Fe^{2+}/Fe^{3+}$  oranı, pH, sıcaklık, karıştırma hızı, iyonik şiddet gibi faktörlerden etkilenir [37].

#### Ters misel/mikroemülsiyon

Nano boyuttaki su küreleri, organik faz/su ara yüzeyinin yüzey aktif maddelerle kararlı hale ulaşması ile oluşur. Yüzey aktif madde/su oranı 15'in altında ise ters misel, üstünde ise mikro emülsiyon sistemler oluşur. Nano yapıdaki taneciklerin üretilmesi için su küreleri nanoreaktör olarak kullanılır. Su kürelerinin boyutu, oluşan taneciklerin boyutu ile doğrudan orantılıdır [38].

### Hidrotermal Sentez

Reaksiyon otoklavda, suyun kaynama noktasının üzerinde ve yüksek basınç altında buhara maruz bırakılarak gerçekleştirilir. Kontrol edilebilir bu reaksiyon sonucunda değişik morfolojik yapılara sahip tozlar üretilir [39].

### Termal Parçalanma

Demir-oleat kompleksleri yüksek sıcaklıklarda organik çözücüler ve oleik asit varlığında kaynatılır. Kompleksin parçalanması sağlandıktan sonra demir açığa çıkar ve oksijen varlığında manyetite dönüşür. Yöntem organik bazlı bir yöntem olarak bilinir [40].

#### **2.2.4. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller**

Altın kaplamalı manyetik çekirdek-kabuk nanopartikülleri, çekirdeği oksitlenme ve korozyondan koruyarak, amin/tiol terminal grupları vasıtasıyla iyi biyoyumluluk ve afinite sergilemek suretiyle kimyasal stabiliteyi arttırdığı bildirilmektedir. Bu durumda altın, kimyasal veya biyolojik-tıbbi ajanlarla spesifik yüzey işlevselliği nedeniyle, tercih edilen bir kaplama maddesi haline gelivermiştir. Demir oksit ( $Fe_2O_3$  veya kısmen oksitlenmiş  $Fe_3O_4$ ) çekirdek nanoparçacıklarına altın veya gümüş kabuklu çeşitli çekirdek-kabuk sistemleri sentezlenmiştir [41]. İlk olarak 2001 yılında Cui ve arkadaşları bu yeni kompozit partikülleri sentezlemişlerdir [42]. Sentez temel olarak iki aşamada gerçekleştirilmiştir. İlk olarak manyetik özellik gösteren manyetit ( $Fe_3O_4$ ) nanopartiküllerin sentezi daha sonra da bunların altın ile kaplanması yapılmıştır. Sentez bir kaç yöntemle yapılmakta olup, her yöntemin altın kabuk kalınlığı, partikül boyu kontrol zorluğu gibi dezavantajları bulunmaktadır. En yaygın olarak sabit reaktörler şeklindeki ters misel yöntemi, alkali bir ortamda ikili çöktürme yöntemi ile sulu fazda gerçekleştirilen demir tuzlarının manyetit nanopartiküllerinin kloraurik asit ile indirgenerek altın kaplamanın oluşturulması ve demir (III) oleatın ısı bozulması ile altın asetatın indirgenmesiyle kaplamanın yapılması gibi yöntemler kullanılmaktadır [34].

#### **2.2.5. Altın Kaplı Manyetik Nanopartiküller ile Yapılan Bazı Çalışmalar**

Mirkin ve ark. tiol ile modifiye edilmiş DNA moleküllerini Au parçacıklarına başarıyla combine etmişlerdir; daha sonra bu parçacık sistemini manipüle ederek, çeşitli enzimler varlığında bu yöntemi geliştirmişlerdir [43].

Mandal ve ark. misel çözeltisinde  $(\text{Fe}_3\text{O}_4)_{\text{çekirdek}}-(\text{Au})_{\text{kabuk}}$  yapısında partiküller sentezledi. Çeşitli yöntemlerle karakterize edilerek manyetik özellikler incelenmiştir. Hazırlanan partiküllerin MRI ve DNA sensörü gibi uygulamalarda kullanılabileceğini belirtmişlerdir [44].

Cui ve ark. immünolojik ve afinite temelli tayanlar için yeni bir substrat geliştirmişlerdir. Kan içindeki HBV antijenini belirlemek için  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au nanopartikül yüzeyine IgG ve IgM antikoların immobilize ederek katı faz substratı oluşturmuşlardır [42].

Jafari ve ark. ters misel yöntemiyle sentezledikleri  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au nanopartikülleri biyoyumlu poligliserol ile kaplamışlardır. Manyetik özellikleri incelenerek MTT ile hücrelerde toksik etki yaratmadığı ve ilaç salınımı için uygun olduğunu bildirmişlerdir [45].

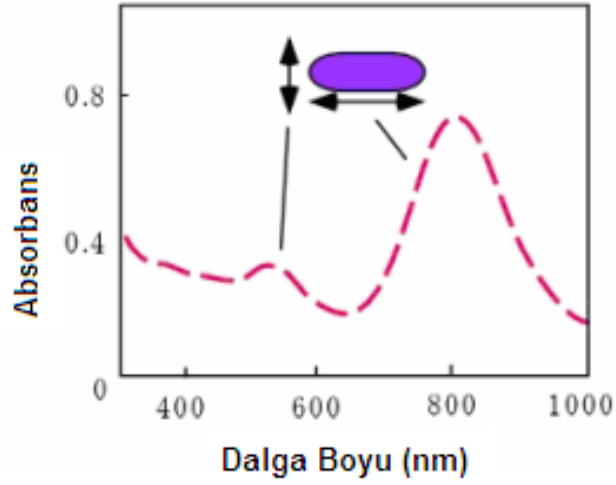
Wang ve ark. yetişkin bir sıçanın omuriliğinden 20 sinir kök hücrelerini izole ederek  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au NP ile etkileştirdikten sonra tekrar sıçanların omuriliğine yerleştirerek 48 saat ve bir ay sonra takibini MR ile yapmışlardır. Çalışmanın sonucunda  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ -Au NP'lerin güçlü kontrast artırıcı özellik gösterdiklerinden dolayı MR etiketleri olarak kullanılabileceğini belirtmişlerdir [46].

### **2.2.6. Altın Nanopartiküller**

Soy metal nanoparçacıkları son 15 yıl içinde yoğun bir şekilde incelenmiştir. Altın nanopartiküllerin en önemli özelliklerinden biri görünür bölgede belirgin optik rezonans sağlamalarıdır. Altın nanopartiküllerinin ışık saçılması yapıları ve diğer yarı iletken nanopartiküller gibi renk değişimi göstermeleri altın parçacıkların çevre değişikliklerine, boyutlarına ve biçimine bağlıdır. Bu nedenle uygulamalar, iyi tanımlanmış şekil ve boyutlar sağlayan sentez protokolleri gerektirir. Nihai ürünlerin farklı özelliklerini gösteren çeşitli sentez yolları vardır. İndirgeyicinin kuvveti yanında, bir stabilizatörün çözelti fazı sentezindeki etkisi de kritik önem taşımaktadır [47, 48].

Altın partiküllerin, Turkevich ve Frens'in [49] bu alandaki öncül çalışmalarına dayanarak, tanımlanmış boyut dağılımı ile, 9 ila 120 nm arasında geniş bir yelpazede üretilebileceği bulunmuştur.

Altın nanoçubuklar, “transverse” plazmon (TP) ve “longitudinal” plazmon (LP) olarak iki farklı plazmon rezonansı göstermektedir. TP; altın nanoçubuklar uyarıldığında enine küresel altın kolloidlerin plazmon rezonansına yakın bir rezonans gösterirler. LP; altın nanoçubuklar uyarıldığında boyuna oluşan plazmon rezonansıdır [50].



Şekil 2.4. Kolloidal altın nanoçubukların farklı yüzey plazmon bantları; transvers: 520-530 nm, enine yüzey plazmon bantı; longitudinal: 700-1500 nm, boyuna yüzey plazmon bantı [50]

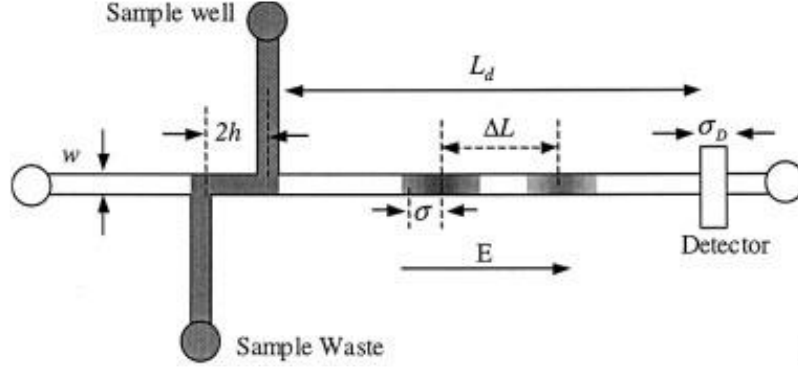
Şekil ve boyuta bağlı olarak güçlü yüzey plazmon rezonans spektrumu gösteren altın nanopartiküller; nanoküre, nanoçubuk, nanokabuk gibi değişik şekillerde sentezlenerek ultrasensitif dedeksiyon ve görüntüleme yöntemleri ile biyotanıma, farmakoloji gibi farklı uygulama alanı gösterirler [51, 52]. Altın nanopartiküllerin kümelenmesi plazmonların birleşmesine neden olur, bunun sonucunda da belirgin renk değişiklikleri meydana gelmektedir. Altın nanopartiküllerin bu önemli özelliği kalorimetrik sensor uygulamalarına yol açmıştır [47].

### 2.3. Mikroçip Sistemleri

Minyatürize edilmiş analiz sistemlerinin gelişimi son yıllarda oldukça artmıştır. Bu sistemlerin geliştirilmesi; örneklerin hazırlanması, ön işleme tutulması, ayrıştırılması ve tayini gibi analizlerin aynı mikroçip üzerine entegre edilmesine dayanır [53].

Bir sistemin aynı anda küçültülmesi ve yüksek performans sağlanması çok zordur. Ancak, birçok araştırmacı tarafından yüksek performanslı mikroakışkan analitik sistemler ile bu mümkün olmuştur [54, 55]. Çip esaslı kılcal elektroforez (CE) geleneksel CE'ye göre çok daha yüksek bir analiz hızı sunar [55, 56]. Yüksek çözünürlük, düşük numune hacmi gereksinimi ve daha kısa analiz süresi [54, 57] ile CE, geleneksel kılcal sistemlere göre önemli avantajlar sunmaktadır.

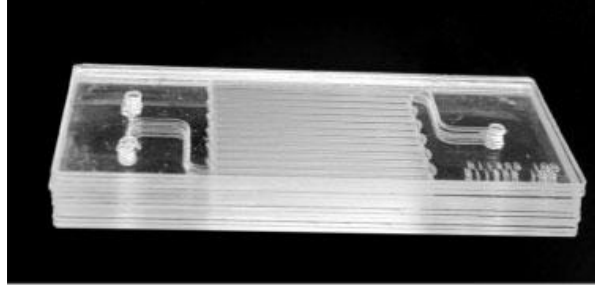
Mikroçip tabanlı kılcal elektroforez sisteminin şeması Şekil 2.5'te gösterilmektedir. Ayırma performansının optimal olması için numune enjeksiyon ve dedektör genişliği, numune varyansı ve iki en yakın aralıklı analit tepe noktası arasındaki mesafenin karakterize edilmesi gerekir.



Şekil 2.5. Kılcal elektroforez mikroçip ayırma sisteminin şematik görünümü;  $w$ -kanal hidrolik çapı,  $L_d$ -ayırma uzunluğu,  $\sigma$ -karakteristik analit bant genişliği,  $\Delta L$ -örnek tepeleri arasındaki en kısa ayırma mesafesi ( $\sigma$ , analit bantının genişlik entegre konsantrasyon dağılımının standart sapması olarak tanımlanır) [1]

Geleneksel bir makrosistemin minyatürize edilmesi için, tasarımı ve inşası, karıştırıcılar, reaktörler, vb. gibi ünite işlemlerinin düzgün bir şekilde birleştirilerek yapılması çok önemlidir [58]. Aksi takdirde ısı ve kütle transferi verimliliği veya spesifik arayüz alanının boyutu gibi birçok fiziksel parametre mikro alanlarda önemli derecede farklıdır [58, 59].

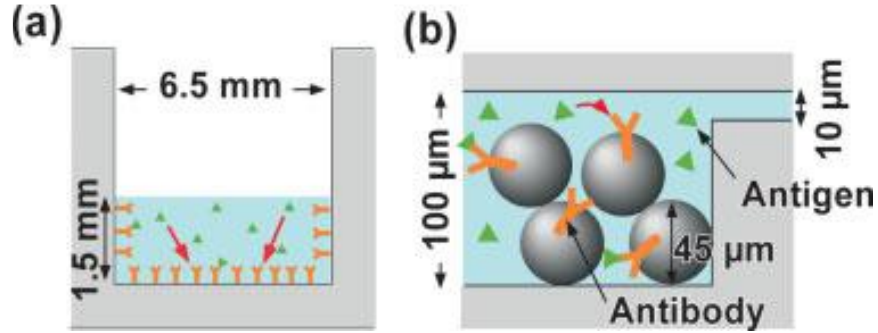
M. Tokeshi ve ark. tarafından on katmanlı bir yığın mikroreaktörü imal edildi [60]. Mikroreaktör içinde sulu solüsyonda amin ile organik çözeltilerde asit klorür arasında amid oluşum tepkimesi gerçekleştirildi ve on katmanlı yağma reaktör için maksimum verimin tek katmanlıdan on kat daha fazla olduğunu gözlemlenmiştir. Şekil 2.6, on katmanlı reaktörün bir fotoğrafını göstermektedir. Mikroreaktörün imalatı özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmadan ıslak aşındırma ve termal bağlama teknikleri ile gerçekleştirildi. On adet cam plaka bir mikrokanal ve büyük delikler kazındı. Tüm plaklar üst üste getirildi ve bir düz cam plaka üst plakı örtecek şekilde yerleştirildi. Alümin ağırlıkları ile sandviç haline getirildi ve tek katmanlı cam mikroçiplerinin imalatı için kullanılan aynı koşullar altında ısıtıldı [61]. Bu çalışma çok tabakalı mikroçiplerin, işlem sayısının tek bir çip üzerine nasıl entegre olabileceğinin iyi bir örneğidir.



Şekil 2.6. On katmanlı yığın mikroreaktörünün fotoğrafı [1]

Geleneksel heterojen immünosorbent ve enzim bağlantılı immünosorbent assay (ELISA) sistemleri yüksek seçicilik ve hassaslık nedeniyle, klinik teşhislerde, çevre analizlerinde ve biyokimyasal araştırmalarda yaygın olarak kullanılmakla birlikte uzun tahlil zamanı, rahatsız edici sıvı işleme prosedürleri ve pahalı antikor reaktifleri gibi dezavantajlar içerir. M. Tokeshi ve ark. analitik sistemleri bir mikroçip içine entegre ederek dezavantajların ortadan kalktığını bildirmişlerdir. Kolon kanseri tümörleri olan insan karsinoembriyonik antijen (CEA) test edilmiş ve kısa sürede başarıyla belirlendiği gösterilmiş.

Bir mikrokanal içine, anti-CEA antikoruna ile kaplanmış polistiren boncuklar konulmuş ve daha sonra ilk antikor olan CEA'ı ve koloidal altın ile konjuge edilmiş ikinci antikoruna içeren bir serum örneği ardışık olarak reaksiyona sokulmuş böylece üç antikor gerektiren bir sandviç immünoassay sistemi oluşturulmuş (Şekil 2.7). Oluşan antijen-antikor kompleksi, boncuk yüzeyine sabitlenmiş ve bir termal lens mikroskopu kullanılarak saptanmış [1].



Şekil 2.7. Antijen-antibadi etkileşiminin şematik gösterimi; a) ELISA plakası, b) Mikroçip [1]

#### 2.4. Raman Spektroskopisi

Spektroskopi, moleküllerin kimyasal ve fiziksel formları hakkında bilgi vermek, karakteristik spektrumlarından maddeleri tanımlamak ve numunedeki madde miktarını kantitatif olarak tespit etmek için kullanılır. Spektroskopi tekniği, analitik problemlere çözümler sunar. Numuneler



katı, sıvı ya da buhar, mikroskopik parçacıklar olarak veya yüzey tabakaları gibi fiziksel durumlarda incelenebilir.

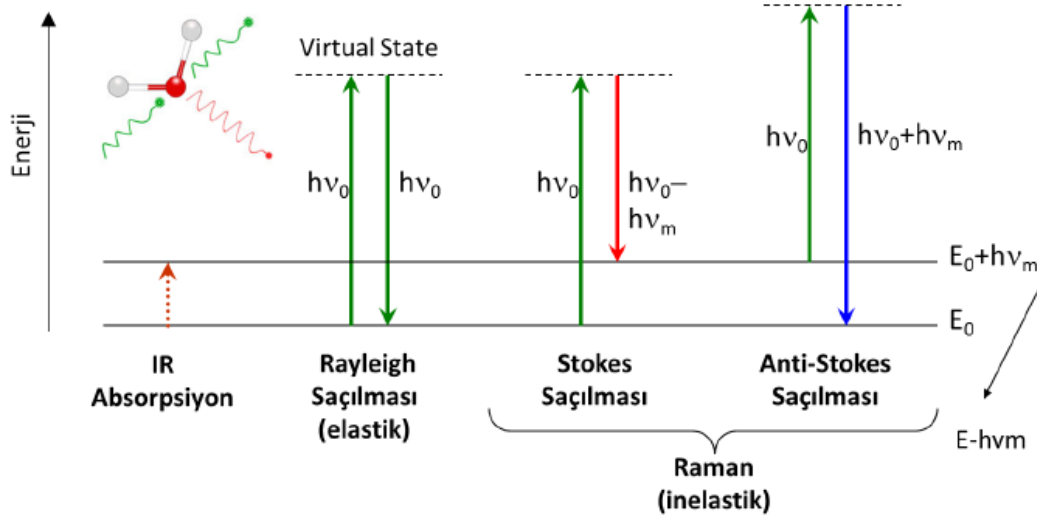
Tarihte ilk olarak Adolf Gustav Stephan Smekal 1923 yılında fotonlardaki inelastik saçılma olgusunu öngörmüştür [62]. 1928 yılında Hintli fizikçi Dr. Chandrasekhara Venkata Raman 1910 yılında ortaya attığı düşüncüyü deneysel olarak tespit etmiştir. Gemi yolculuğu sırasında denizin mavi rengi gökyüzünün mavisinin yansıması olduğunu söylemiştir [63]. C. V. Raman 1931 yılında gaz molekülleri üzerine ışık göndererek moleküller tarafından saçılan ışının dalga boyunun gelen demetin dalga boyundan farklılık gösterdiğini, dalga boyundaki kaymaların moleküllerin kimyasal yapılarına göre değiştiğini sistematik olarak açıklamasıyla Nobel Fizik ödülünü kazanmıştır. Raman saçılması olarak bilinen bu teori bir ışık kaynağından moleküle gelen ve molekül üzerinden ışığın yaptığı inelastik saçılmaları gösterir. Saçılmaların ölçülmesi ve molekülün titreşim spektrumunun incelenmesi ile Raman spektroskopisi ortaya çıkmıştır [64].

Raman spektroskopisinin avantajı suyun spektrumunu engellememesidir, böylece Raman spektrumu sulu çözeltilerden elde edilebilir. Ayrıca, cam ya da kuvarz hücrelerde de kullanılabilir [65]. Raman spektroskopisinin bazı dezavantajları da vardır; Floresans sinyaline göre Raman sinyalinin daha düşük oluşu, Raman saçılması kesit alanının çok düşük olmasından kaynaklanmaktadır ( $10^{-31}\text{cm}^2/\text{molekül}$ ). Bunun sonucunda tespit edilmesi de daha zordur [66]. Raman spektrumu ölçümlerinde, lazerden saçılan ışığın dağılması sonucunda oluşan floresans etkiyi engellemek için optik eksene paralel olarak bir notch filtre yerleştirilerek elastik saçılmalar (Rayleigh) önlenmektedir [67].

#### **2.4.1. Saçılma Teorisi**

Raman etkisinin anlaşılabilmesi için, ışığın madde ile etkileşimi kuantum mekanik etkisi ile açıklanabilir. Moleküle düşük enerjide ışık verildiğine bunun sonucunda molekülün titreşim hareketlerinde değişim olur. Bu temel ve uyarılmış durumlar arasındaki enerji farkını ölçmek için Infra-red spektroskopisi geliştirilmiştir. Eğer bir molekülün enerjisi kendisini uyarıcı enerjiden fazla ise kararsız bir şekilde temel halden uyarılmış hale geçer. Tekrar kararlı olması için temel hale geri dönmesi gerekmektedir. İlk hale döndüğünde saçılan ile gelen ışık enerjisi eşit ise bu bir elastik saçılmadır ve Rayleigh saçılması olarak adlandırılır. Bazı fotonlar uyarılmadan önceki seviyeye dönmeyip, farklı enerji seviyelerine yerleşirler. Bu elastik

olmayan bir saçılmadır ve enerji farklılığı ortaya çıkar. Bu saçılmaya Raman saçılması denir. Saçılan ışıklardan  $10^7$  tanesinden bir tanesi inelastik saçılmadır. Yayılan ışının enerjisi uyarılma enerjisinden küçük ise Stokes saçılması, büyük ise anti-Stokes saçılması meydana gelir (Şekil 2.8) [68].



Şekil 2.8. Rayleigh ve Raman saçılımının Jablonski enerji diyagramı [68]

Moleküllerin titreşim seviyeleri arasındaki enerji farkı, gelen ve saçılan ışının enerji farkları ile ilişkilidir. Dolayısı ile Raman spektrumları moleküllerin karakteristiğini açıklar.

İki kuantize durum arasındaki enerji farkı  $\Delta E=h\nu_0$  eşitliği ile verilir. Burada  $h$ , Planck sabitini,  $\nu_0$  ise ultraviyole görünür bölgede saçılan lazer ışığı frekansını ifade eder. Raman spektroskopisi ışığın  $\Delta E=h\nu_0$  şartını sağlamaz, çünkü saçılan ışığın frekans enerjisi ve dalga boyu gelen ışından farklıdır, bu durumda  $\nu=\nu_0+\nu_m$  olur,  $\nu_m$ =molekülün titreşim frekansıdır [69].

Stokes saçılmalarının, Anti-Stokes saçılmalarına göre daha şiddetli oluşu moleküllerin  $\nu=1$  frekans değerlerinin,  $\nu=0$  frekans değerlerine göre daha yoğun olmasından kaynaklanmaktadır. Bu durum Maxwell-Boltzmann dağılım prensibini sağlamaktadır. Klasik teoriye göre Stokes ve anti-Stokes saçılmaları aynı kabul edildiğinden, klasik mekanik yaklaşım bu durumu açıklamakta yetersiz kalmaktadır. Bu yüzden kuantum mekanik teorisiyle açıklanmasına gerek duyulmaktadır.

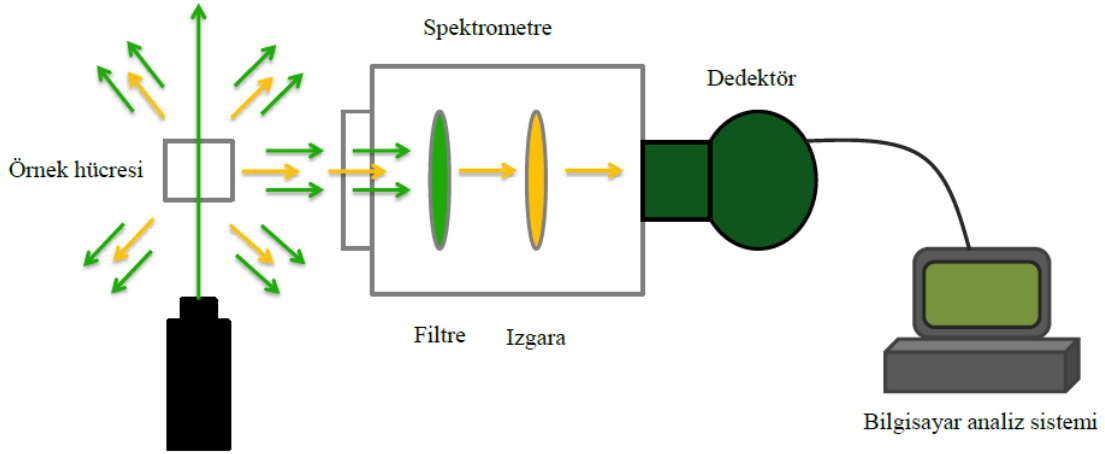
Stokes ile anti-Stokes saçılması arasındaki şiddet farkı başlangıç enerji seviyelerinin n doluluk yoğunluğuna bağlıdır. Isıl dengede Maxwell-Boltzmann dağılımına sahiptir ve aşağıdaki denklem ile ifade edilir [64];

$$\frac{I_{\text{antistokes}}}{I_{\text{stokes}}} = \frac{n_{(v=1)}}{n_{(v=0)}} = e^{\frac{-h\nu_m}{kT}}$$

Denklemdaki n terimi doluluk yoğunluğunu, k terimi fiziksel bir sabit olan  $1.3807 \times 10^{-23} \text{ J.K}^{-1}$  değerindeki Boltzmann sabitini, T sıcaklığı ifade etmektedir ve birimi Kelvin'dir.

#### 2.4.2. Raman Spektroskopisi Sistemi

Raman spektroskopisi sistemi başlıca; lazer kaynağı, dedektör, spektrometre, toplama ve odaklama optiklerinden oluşmaktadır (Şekil 2.9). Lazer yüksek şiddette ışın sağlayabildiği için ışık kaynağı olarak kullanılır. Lazer numuneyi uyarmak için ışımayı morötesi (UV), görünür (VIS) ve yakın kızılaltı (NIR) bölgelerinden sağlar. Raman spektrumu, lazer tarafından saçılan ışığın bir mercekle toplanması ve spektrometreden geçirilmesiyle elde edilir [70].



Şekil 2.9. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi [71]

Numune boyutu küçük olsa da, ölçüm esnasında lazer sayesinde istenilen noktaya odaklanılabilmekte böylece kolaylıkla ölçüm alınabilmektedir [72]. Lazerlerin; elektriksel güç değerleri, dalgaboyu ve boyut/ağırlık değerleri daha verimli sonuçlar elde etmek için önemli sistem parametrelerindedir. Raman spektroskopisi için kullanılan lazer çeşitleri ve dalga boyları Çizelge 2.3'de gösterilmiştir;

Çizelge 2.3. Raman spektroskopisi için kullanılan lazer türleri ve dalgaboyları [73]

Lazer Tipi	Dalgaboyu, nm	Referans
Argon İyon	488,0 ya da 514,5 nm	[30]
Kripton İyon	530,9 ya da 647,1 nm	[30, 31]
Helyum Neon	632,8 nm	[30, 32]
Diyot	785 ya da 830 nm	[30, 33]
Nd-YAG	1064 nm	[30, 34]

Detektör, spektral olarak saçılan ışını kaydeder. Raman saçılması zayıf olduğu için duyarlı detektörlere ihtiyaç duyulur. Raman sinyalini kaydetmek için, belli dalgaboyunda yüksek kuantum verimliliği ve düşük gürültü seviyesine sahip dedektörler kullanılmalıdır. Günümüzde Raman sistemlerinde dedektör olarak yüksek hassasiyet ve performansından dolayı yüke bağlantılı kameralar (CCD: Charge Coupled Devices) tercih edilmektedir. Bunun dışında fotonçoğaltıcı tüpler (PMT: Photomultiplier Tubes) ve fotodiyot dizini de kullanılmaktadır.

Dalgaboyu seçicisi olan spektrometre için en önemli parametreler dalgaboyu aralığı ve spektral çözünürlüktür. Dalgaboyu aralığı hedef numuneyi uyaracak lazerin dalgaboyuna göre seçilebilir. Yüksek spektral çözünürlük zayıf Raman piklerinin tanımlanması için kullanılabilir [74].

#### 2.4.3. Yüzeysel Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

Yüzeysel Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS) Raman sinyalinin artırılması için geliştirilen bir yöntemdir. SERS yönteminin keşfi 1974 yılında Fleischmann ve ark. tarafından yapılmıştır. Gümüş yüzey üzerinde elektrokimyasal olarak piridin analizi yaparken, gümüş yüzeyin pürüzlülüğünü artırılması sonucunda adsorplanan piridin miktarının da artmış olduğunu düşünmüşlerdir. Deney sonucunda yüzeyden yüksek sinyal oranına sahip Raman spektrumu alınmıştır ve bunun yüzey alan artışı ile ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir [75]. Van Duyne ve Creighton birkaç yıl sonra yaptıkları çalışmalar sonucunda yüzey alanının artışının yanı sıra yüzey pürüzlülüğünün de önemli olduğunu bildirmişlerdir [76]. Bir başka çalışmada ise 1979, yılında sulu altın ve gümüş koloidal çözeltiler içinde piridin molekülünün Raman sinyalini arttırdığı gözlemlenmiştir [77]. Yapılan

tüm çalışmalara dayanarak 1985 yılında SERS yöntemi altında yatan temel mekanizmanın ‘yüzey plazmon’ ve ‘kimyasal mekanizma’ olarak açıkladığını bildirilmiştir. Yüzey plazmonlar elektromanyetik alanları titreştirmektedir. Lazer sayesinde yüzeydeki plazmonlar salınmakta ve elektromanyetik güçlendirme sağlanmaktadır. Kimyasal mekanizma yüzey ile adsorplanan molekül arasına yük transferinin olması ve molekülün polarlanabilmesi prensibine dayanır. Her iki mekanizmada da güçlendirmenin sağlanabilmesi için yüzey pürüzlülüğü temel gerekliliktir [7].

### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

#### 3.1. Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kimyasal madde olarak;

- FLUKA (Bucharest, Romania)'dan temin edilen Demir (III) klorür ( $\text{FeCl}_3$ ),
- SIGMA-ALDRICH (St. Lois, U.S.A)'ten temin edilen Demir (II) sülfat hepta hidrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ), Hidrojen tetrakloro Altın (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ), Hidroksilamin hidroklorür, L-Askorbik asit ( $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$ ), %99.9 Etanol ( $\text{EtOH}$ ), Heksadesiltrimetil amonyum bromür (CTAB), 11-Merkaptoundekaonik asit (11-MUA), %98 N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorür (EDC), %98 N-Hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu (NHS), Sodyum klorür ( $\text{NaCl}$ ), Disodyum fosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), Potasyum fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ), Potasyum klorür ( $\text{KCl}$ ), 2-(N-Morfolino)etanesulfonik asit (MES monohidrat), Etilendiamintetraasetik asit disodyum tuzu (EDTA),
- MERCK (Darmstadt, Germany)'ten temin edilen Gümüş nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ), 4-Aminotiyofenol (4-ATP), %98 Etanolamin, Sodyum borohidrür ( $\text{NaBH}_4$ ), Perklorik asit ( $\text{HClO}_4$ ),
- TEKKİM (Bursa)'den temin edilen %50 Benzalkonyum klorür (BCC) kullanılmıştır.

Kimyasallar, ultra saf su ( $>18.3 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$ ) ile hazırlanmıştır.

#### 3.2. Biyokimyasallar

- İnsan luteinizan hormonu standardı (hLH) - 1.0 mL'lik vialler içinde 0, 0.6, 3, 15, 75, 240 IU/L konsantrasyonlarında.
- İnsan luteinizan hormonu antikoru (Anti-hLH-Eu) - fare monoklonal antikoru, 0.65 mL'lik vialler içinde ~20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  konsantrasyonunda.

Standartlar, Tris-HCl tuz çözeltisi tamponu (pH 7.8) ile bovin serum albumin ve  $< \%0.1$  sodyum azit içinde hazırlanmıştır. Son kullanma tarihinden önce  $+2^\circ\text{C}$  -  $+8^\circ\text{C}$ 'de vialler içinde muhafaza edilmiştir.

Yöntemin hLH'ya seçici olduğunu, insan korionik gonadotropin (hCG), insan büyüme hormonu (hGH) ve immünoglobülin G (IgG) standartları ile test edilerek gösterilmiştir.

Çalışmada kullanılan tüm biyomoleküller AutoDELFA® markasına aittir ve Hacettepe Üniversitesi, Doping Kontrol Merkezi'nden temin edilmiştir.

- Biorad orijinli kontrol serum örnekleri (Level 1, 2 ve 3); 96 farklı analit içerir, stabilitenin artırılması amacıyla liyofilize formda sağlanmıştır.

### 3.3. Çözeltiler

- NaOH: 1 M olacak şekilde 2 g katı NaOH tartıldı, balon jofede 50 mL deiyonize su içinde çözünmesi sağlandı.
- Hidrojen tetrakloro Altın (III) ( $\text{HAuCl}_4$ ): 0.01M  $\text{HAuCl}_4$  çözeltinin hazırlanması için, stok sıvı  $\text{HAuCl}_4$ 'den 35  $\mu\text{l}$  alındı, 10 mL'lik balon jofeye aktarıldı ve hacmi deiyonize su ile tamamlandı.
- 4-Aminotiyofenol (4-ATP): Stoktan katı 4-ATP 50 mM olacak şekilde tartıldı ve Eppendorf tüpe aktarıldı. Eppendorf tüp içinde 1 mL Etanol'de çözünmesi sağlandı.
- Sodyum Borohidrür ( $\text{NaBH}_4$ ): 1.9 mg katı  $\text{NaBH}_4$  tartıldı, 5 mL soğutulmuş deiyonize su içerisinde çözünmesi sağlanarak 0.01 M çözelti hazırlandı.
- Askorbik Asit: 88 mg katı askorbik asit tartıldı, 5 mL deiyonize su içerisinde çözünmesi sağlanarak 0.05 M çözelti hazırlandı.
- Gümüş Nitrat ( $\text{AgNO}_3$ ): 8.45 mg katı  $\text{AgNO}_3$  tartıldı, 5 mL deiyonize su içerisinde çözünmesi sağlanarak 0.01 M çözelti hazırlandı.
- MES Tamponu: MES monohidrat 0.05M olacak şekilde tartıldı ve içinde deiyonize su olan balon jofeye aktarıldı. 1M NaOH çözeltisi eklenerek, pH'sı 6.5'e ayarlandı. Son hacim 50 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.
- PBS Tamponu: Sırasıyla 0.1 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  ve  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  çözeltileri karıştırılır ve pH'sı 7.4 olacak şekilde ayarlandı. Daha sonra 0.2 g/L KCl ve 8 g/L NaCl tuz ilavesi yapıldı.
- EDTA: 1 g katı EDTA tartıldı, 10 mL 1M NaOH çözeltisi içinde çözünmesi sağlandı.
- CTAB: 1.84 g katı CTAB tartıldı, 50 mL deiyonize su içerisinde çözünmesi sağlanarak 0.1 M çözelti hazırlandı.

- MUA: 4.37 mg katı MUA tartıldı, 1 mL etanol içinde çözünmesi sağlanarak 20 mM çözelti hazırlandı.
- EDC/NHS: 100 mM olacak şekilde, her ikisinden 8 mg tartıldı, 1 mL MES tamponunda çözünmesi sağlandı.
- D-alanin: 4 mg katı D-alanin tartıldı, 1 mL MES tamponu içinde çözünerek çözelti hazırlandı.
- Etanolamin: 1 mL MES tamponu içine 10 µL etanolamin eklenmesi ile etanolamin çözeltisi hazırlandı.
- FeCl<sub>3</sub> ve FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O çözeltileri: 1.28 M ve 0.64 M olacak şekilde sırasıyla 1.038 g FeCl<sub>3</sub> ve 0.889 g FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O tartıldı, 5 mg deiyonize su içinde çözümleri sağlanarak çözeltiler hazırlandı.

### 3.4. Cihazlar ve Gereçler

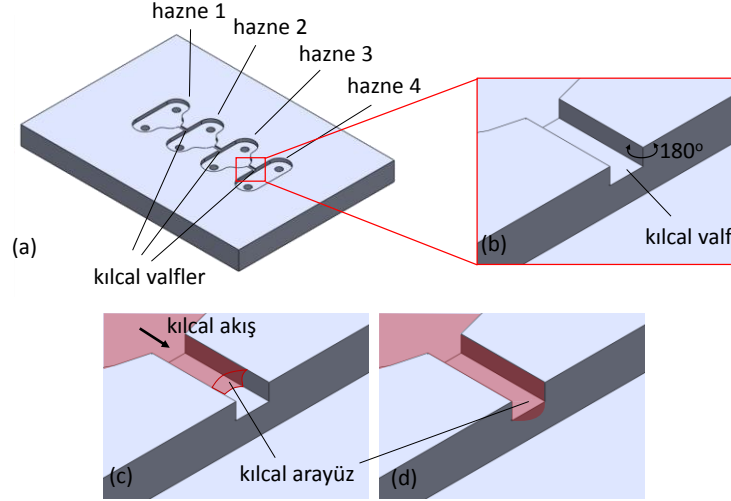
- Raman spektroskopisi (DeltaNu ExamineR Inc. Laramie, WY, U.S.A & Qimaging MicroPublisher-RTV-5.0, Canada): Raman mikroskobu 785 nm lazer kaynağı, numune için hareketli lamel haznesi ve CCD dedektörü optimizasyon çalışmaları ve kalibrasyon grafiğinin oluşturulması sırasında, 4-Aminotiyofenol sinyal ölçümü için kullanılmıştır. Cihaz parametreleri 45 sn veri toplama süresi, 10X objektif, 30 µm lazer spot alanı, 150 mW lazer gücü olarak ayarlanmıştır.
- Geçirgenli Elektron Mikroskop (TEM) ölçüm düzeneği (JEOL JEM 1400, Jeol Ltd., Tokyo Japan): Sentezlenen nanopartiküller ve oluşan sandviç yapısı karakterizasyon çalışmalarında kullanılmıştır. Örneklere %2 uranil asetatla negatif boyama yapılmıştır ve 80-120 kV'de incelenmiştir.
- UV-Visible spektrofotometre (SPECTRONIC GENESYS, California ABD): Sentezlenen nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları tek ışın yollu UV-visible spektrofotometre ile kaydedilmiştir.
- Santrifüj cihazı (EPPENDORF 5418, Eppendorf Middle EAST and Africa FZ-LLC, Dubai Media City U.A.E.): Partiküllerin çökmesini sağlayarak ortamda bulunan aşırı reaktiflerin uzaklaştırılması ve modifikasyonlardan sonra yıkama işleminin yapılması için kullanılmıştır.



- Ultrasonik banyo (SONOREX RK 156, BANTELIN Electronic GmbH & Co. KG, Berlin Germany): Nanopartiküllerin çökme, topaklanma problemlerini engellemek; homojen dağılım ve etkileşimini sağlamak amacıyla kullanılmıştır.
- Etüv (O Heraeus INSTRUMENTS GmbH. 63450, Hanau Germany): Yıkama işlemi sonrası, mikroçip odacıklarında hava kabarcığı veya sıvı kalmaması amacıyla, mikroçipler 80-90 °C’de 15 dk kadar etüvde bekletilmiştir.
- Çalkalayıcı (N-BIOTEK Co. Ltd. Gyeonggi-do Korea): Sentez ve modifikasyon aşamalarında, etkileşimlerin daha yüksek olması amacıyla beklemeler çalkalayıcıda yapılmıştır.
- pH metre (SENOVA LABTECH Co.,Ltd., PEN TYPE SX-610, Shanghai China): Tampon çözeltilerin hazırlanması sırasında kullanılmıştır.
- Hassas terazi (SHIMADZU Inc., Kyoto, Japan), Deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt Germany), Mikropipet (1-10, 10-100, 100-1000 µl)

### **3.5. Mikroçip Tasarımı ve Üretimi**

Sürekli akış çiplerine alternatif olarak, çalışma sıvılarının statik olarak durduğu ve pipet kullanılarak işletilen pasif bir mikroçip tasarlanmıştır. Mikroçip birbirlerine kılcal valfler [78, 79] ile bağlı 4 haznedenden oluşmaktadır (Şekil 3.1). Çalışma sıvıları haznelere içerisinde sırasıyla pipet kullanılarak aktarılmaktadır. Tasarlanan bu mikroçipin en önemli özelliklerinden biri sıvının sonraki hazneye doğru ilerleyememesidir. Bu sayede her bir hazneye sıvı aktarılmasına rağmen birbirlerine karışması mümkün olmamaktadır.



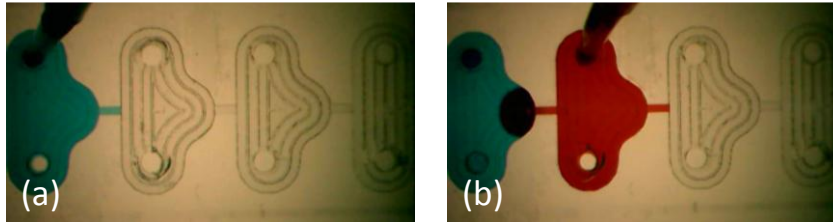
Şekil 3.1. a) Mikroçipin genel görünümü, b) Kılcal valfin detay görünümü, c) Kılcal arayüzün valf kanalı boyunca hareketi, d) Kılcal arayüzün 180°'lik dönüşe ulaştığında durması [79]

Kılcal arayüz, valf kanalının bir sonraki hazneye açılan ucundaki 180°'lik dönüşe geldiğinde kılcal arayüzde gelişen yüzey gerilmesi ve buna bağlı olarak akışa ters yönde oluşan arayüz basınç etkisi ile sıvı daha da ileriye gidememektedir (Şekil 3.2).

$$\Delta p = \gamma \left( \frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2} \right)$$

Young-Laplace eşitliği;  $\Delta p$ , kılcal arayüzün iki taraf arasındaki basınç farkını,  $\gamma$  yüzey gerilimini,  $R_1$  ve  $R_2$  kılcal arayüzün geometrisini ifade eden temel yarıçaplarıdır.

Mikroçipin tasarımı şekil 1.d'de görülen kılcal arayüzde,  $R_1$  ve  $R_2$ 'nin aldığı değerler nedeniyle  $\Delta p$  negatif bir değer almakta ve kılcal akışa ters yönde bir basınç oluşmaktadır.



Şekil 3.2. Kılcal valflerin çalışması; a) Birinci haznenin doldurulması ile çalışma sıvısının valf kanalı boyunca ilerlemesi ve ikinci hazneye ulaşmadan durması, b) İkinci haznenin doldurulmasında birinci hazneye doğru geri akışın olması bir miktar karışmaya neden olmaktadır, ancak bu karışma miktarı çalışmayı etkilememektedir

Mikroçip tasarımı için Çankaya Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümü'nde yer alan ProLight WPLM1000 işleme merkezi kullanılmıştır. Mikroçipi oluşturan kanallar ve haznelere poli (metil metakrilat) (PMMA) bloklar üzerine mikro frezleme yöntemi ile işlenmiş, işlenen kanalların üzeri ise yine PMMA bloklar kullanılarak termokompresyon yöntemi ile kapatılmıştır. Haznelere 3mm çaplı, haznelere birleştiren valf kanalları ise 400 µm genişlikte ve 200 µm derinlikte freze çakısı kullanılarak işlenmiştir. İşlem sırasında PMMA'nın ısınması ve buna bağlı olarak bozulmasını engellemek amacıyla yüzey bor yağı ile soğutma işlemi gerçekleştirilmiştir. Haznelere giriş-çıkış portlarında PMMA parçayı boydan boya delen 1 mm çaplı delikler açılmıştır. Kanalların üstlerinin kapatılması için ikinci PMMA parça termokompresyon (thermo-compressive bonding) yöntemi mikroçipin yüzeyine bağlanmıştır. Termokompresyon işleminin 110 °C'nin üzerinde yapılması ısıl gerilimlere ve bunun neticesinde ölçü değişikliklerine neden olabilmektedir. Kompresyon sıcaklığını düşürebilmek için, her iki PMMA parça işlem öncesinde oda sıcaklığında 4 dakika boyunca kloroform buharına maruz bırakılmıştır [80], sonrasında sıcaklık kontrollü pres kullanılarak 60 °C sıcaklık altında 20 dakika boyunca 68.75 N/cm<sup>2</sup> basınç uygulanarak birbirlerine bağlanmıştır.

Kullanım sırasında nanopartiküllerin yapışma problemini ortadan kaldırmak amacıyla mikroçipler 10 saniye boyunca hava plazmasına maruz bırakılarak yüzey hidrofiliği artırılmıştır.

### **3.6. Yöntem**

Çalışmada luteinizan hormonun hızlı ve hassas tayini için yeni bir alternatif yöntem sunulmuştur. Bu kapsamda, LH tayini için PMMA tabanlı bir mikroçipin içinde immünomanyetik ayırma esasına dayanan sandviç tipi bir biyosensör geliştirilmiştir. Sandviç yapısı 'Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP – LH – Au NP' konjugatları ile oluşturulmuştur.

Birinci aşamada demir partiküllerin ve altın partiküllerin sentezi yapılmıştır. Sentezlenen demir partikülleri daha sonra altın ile kaplanarak, çekirdek-kabuk (core-shell) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'leri oluşturulmuştur. Altın partiküllerin sentezinde benzalkonyum klorür (BCC), alternatif bir sentez daha yapılarak setrimonyum bromür (CTAB) kullanılmıştır. Bu sayede küre ve çubuk yapılarına sahip altın nanopartiküller sentezlenmiştir.

İkinci aşamada sentezlenen NP'lerin yüzeyleri 11-MUA ile modifiye edilmiştir. Daha sonra Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerin üzerindeki karboksil grupları NHS-EDC reaksiyonu ile aktif hale

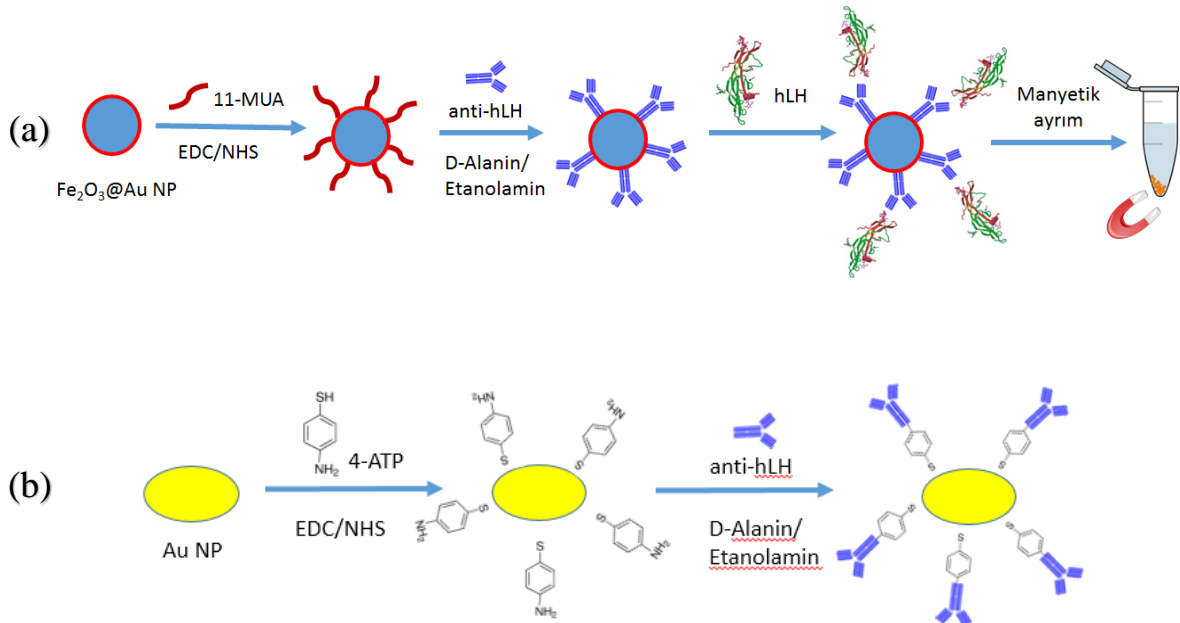
getirilmiştir. Au NP'lerin yüzeyi ise ilk olarak SERS etiketi 4-ATP, ardından EDC/NHS ile modifiye edilmiştir. Her modifikasyon sonunda partiküllerin yıkanması üç defa 0.05M MES tamponu ile yapılmıştır.

Üçüncü aşamada aktif hale getirilen karboksil gurplarının LH antikoru (Ab-hLH-Eu) ile etkileştirerek 45 dakika boyunca bağlanmaları sağlanmıştır. Bu süre sonunda partiküller üç defa 0.1M PBS tamponu ile yıkanmış ve bağlanmayan antikoru ortamdaki uzaklaştırılmıştır.

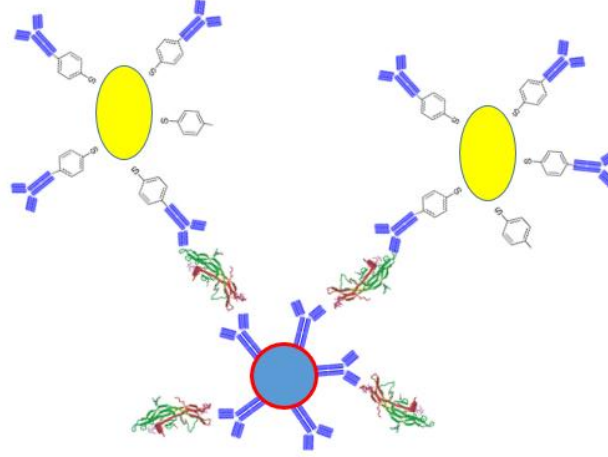
Dördüncü aşamada D-alanin/Etanolamin ile partikülleri 30 dakika etkileştirerek spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlanmıştır. Bu süre sonunda partiküllerin yıkanması üç defa 0.05M MES tamponu ile yapılmıştır.

Beşinci aşamada LH hormonu ile  $Fe_3O_4@Au$  NP'leri 45 dakika etkileştirilmiştir. Etkileşimin sonunda bağlanmayan LH'ların uzaklaştırılması, yıkama işleminin tekrar üç defa 0.05M MES tamponu ile yapılması sonucunda sağlanmıştır. Burada tam olarak bir antijen-antikor etkileşimi oluşturulmuştur.

Bu aşamalarda yapılan tüm modifikasyonlar Eppendorf tüp içerisinde, ' $Fe_3O_4@Au$  NP – LH – Au NP' sandviç yapının oluşumu ise mikroçip içerisinde gerçekleştirilmiştir.

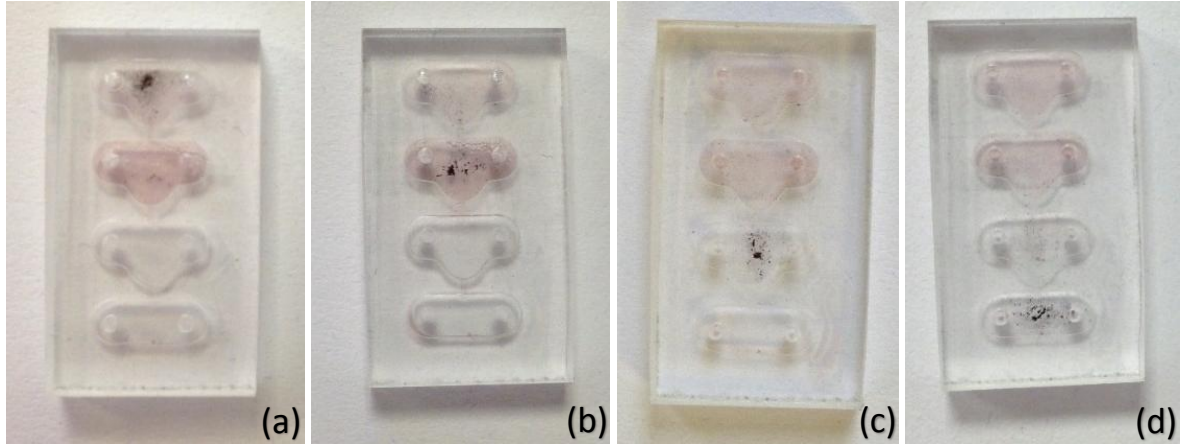


(c)



Şekil 3.3. Nanopartiküllerin modifikasyon aşaması ve homojen sandviç yapısının oluşumu; a)  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP modifikasyonu, b) Altın NP modifikasyonu, c) Mikroçipte ' $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ -hLH-AuNP' sandviç yapısının oluşumu

Dört hazneden oluşan mikroçipin ilk haznesine  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP – LH konjugatı, ikinci haznesine modifiye Au NP'leri 15  $\mu\text{L}$  kadar aktarılır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP'lerin manyetik özelliğinden yararlanarak, mıknatıs yardımı ile  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP – LH konjugatı toplanıp mikroçipin kılcal valfinden sürüklenerek ikinci haznede bulunan Au NP'leri ile yaklaşık 1 dakika etkileştirilir. Bu etkileşimin sonucunda sandviç yapının oluşması sağlanır. Yine mıknatıs yardımı ile sandviç yapı kılcal valften geçirilerek yıkama tamponunun (0.05 M MES) bulunduğu üçüncü hazneye aktarılır. Bu sayede  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP – LH konjugatı ile etkileşmeyen, sürüklenme etkisiyle üçüncü hazneye taşınan Au NP'leri elimine ederek, ölçüm haznesine ulaşmaları engellenir. Yıkama işleminin sonunda partikül topluluğu yine mıknatısla belli bir noktada toplanarak dördüncü hazneye aktarılır. Ölçüm SERS ile yapılmakta olup, Au NP'ler ile etkileşen 4-ATP sinyalleri kaydedilmektedir. Farklı konsantrasyonlarda LH içeren ' $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  NP – LH – Au NP' sandviç yapının SERS pikleri ölçülmüştür ve kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Kullanılan antikorun seçiciliğini test etmek amacıyla aynı yöntem hCG, IgG ve hGH ile yapılmıştır.



Şekil 3.4. Yöntemin PMMA tabanlı mikroçipte uygulanması; a)  $Fe_3O_4@Au$  NP – LH konjugatının mikroçipin birinci haznesine ve 4-ATP ile modifiye AuNP mikroçipin ikinci haznesine aktarılması, b) İkinci haznede NP'lerin ektileştirilmesi ve homojen sandviç yapının oluşumu, c) NP'lerin oluşturduğu sandviç yapının mıknatısla üçüncü hazneye sürüklenerek MES (pH 6.0) tamponu ile yıkanması, d) Yıkama işleminden sonra NP'lerin mıknatısla mikroçipin ölçüm haznesine aktarılması

## 4. DENEYSEL ÇALIŞMALAR VE BULGULAR

### 4.1. Sentez Çalışmaları

#### 4.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik özelliğe sahip küresel Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin sentezi, Fe<sup>+3</sup> ve Fe<sup>+2</sup> demir iyonlarının 1/2 oranında karıştırılması ve oluşan demir oksit tuzlarının oda koşullarında kontrollü bir şekilde yükseltgenmesiyle gerçekleştirilmiştir. İlk olarak 5 mL 1.28 M FeCl<sub>3</sub> ve 5 mL 0.64 M FeSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O deiyonize su içerisinde çözünene kadar 2 dakika karıştırılmıştır. Koyu sarı-yeşil renk gözlemlenmiştir. Karışıma 125 mL 1M NaOH çözeltisinden büret yardımı ile yaklaşık 45 dakika boyunca damla damla ilave edilmiştir. Elde edilen siyah demir tuzları çökeleği bir mıknatıs yardımı ile toplanarak süpernatant uzaklaştırılmıştır. Daha sonra karışım tüplerine aktarılıp üç defa 4000 rpm 5 dakika santrifüj edilerek deiyonize su ile yıkanmıştır. Asitlendirme aşaması için 5 mL 2 M HClO<sub>4</sub> çözeltisi ilave edilmiştir ve bir gece oda koşullarında çalkalayıcıda bekletilmiştir. Kahverengiye dönüşen demir nanopartiküllerini içeren çözelti tekrar üç defa 10.000 rpm 20 dakika santrifüj edilerek aşırı miktardaki asit uzaklaştırılıp üç defa 5 mL etanol ile yıkandıktan sonra kurutulmaya bırakılmıştır [81].

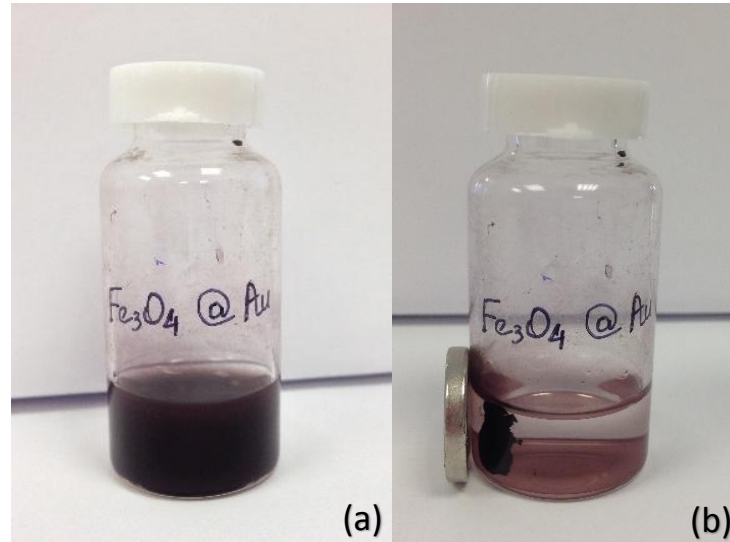


Şekil 4.1. Laboratuvar ortamında sentezlenen manyetik nanopartiküller

#### 4.1.2. Altın Kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> Nanopartiküllerin Sentezi

Sentezlenen manyetik nanopartiküllerin Au kaplama işlemi için; 5 mg Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri tartılmıştır ve 5 mL deiyonize su içinde yaklaşık 5 dakika ultrasonik banyoda çözünmesi sağlanmıştır. Çözeltiye, 1M NaOH içinde hazırlanan 0.27 M EDTA çözeltisi eklenerek tekrar

yaklaşık 5 dakika sonikasyon yapılmıştır. Daha sonra süspansiyon edilen çözeltinin altında mıknatıs tutarak nanopartiküllerin dipte toplanması sağlanmıştır ve süpernatant atılıp üç defa deiyonize su ile yıkanmıştır. Çökelti önce 5 mL 0.1 M CTAB içine alınmıştır, daha sonra sırasıyla 3 mL 0.01 M HAuCl<sub>4</sub> çözeltisi, 5 mL 0.1 M CTAB ve 300 µL 1 M NaOH çözeltisi eklenmiştir. Her çözeltinin eklenme aşaması ultrasonik banyoda gerçekleştirilmiştir. Ultrasonik banyoda vial şiddetli bir şekilde karıştırılırken 150 mg katı hidroksilamin hidroklorür indirgeyici ajanı eklenmiştir. Bu sırada çözelti şarap kırmızı rengine dönmüştür. Çözelti bir gece boyunca çalkalayıcıda bekletildikten sonra, küresel yapıda sentezlenen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au nanopartikülleri mıknatıs yardımı ile toplanarak üç defa deiyonize su ile yıkanıp son hacim 5 mL'ye tamamlanmıştır [82].



Şekil 4.2. Laboratuvar ortamında sentezlenen altın kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartikülleri; a) Dış manyetik alan olmadığında kolloidal Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP b) Dış manyetik alan uygulandığında Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP çözeltide toplanması

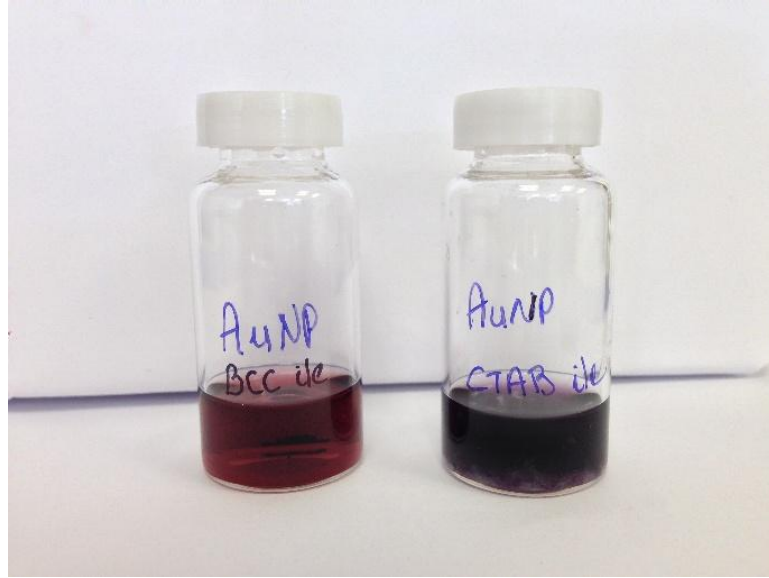
#### 4.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin ve Altın Nanoçubukların Sentezi

Sentezin ilk aşamasında Au nanopartiküllerden oluşan çekirdek çözeltisi hazırlanmıştır. Çekirdek çözeltisi 7.5 mL 0.1 M CTAB ve 250 µL 0.01 M HAuCl<sub>4</sub> karışımı ile hazırlanmıştır, ardından 600 µL buz banyosunda hazırlanan 0.01 M NaBH<sub>4</sub> çözeltisi ilave edilmiştir. Hazırlanan çekirdek çözeltisi yaklaşık 30 °C'de ve 45 dakika bekleme sonucunda açık çay rengine dönüşmüştür. Altın nanoçubukların sentezi için öncelikle bir vial içinde 4.75 mL 0.1 M CTAB, 100 µL HAuCl<sub>4</sub> ve 60 µL AgNO<sub>3</sub> çözeltileri karıştırılarak koyu turuncu renk elde edilmiştir. Çözeltiye 250 µL 0.01 M Askorbik Asit çözeltisi ilave edilmesiyle renk



berraklaşmıştır. Son olarak, şiddetli bir şekilde karıştırılarak ilk aşamada hazırlanan çekirdek çözeltilisinden 10 µL eklenmiştir. Yaklaşık 3 saat bekleme süresinin sonunda şeffaf renk lacivert tonlarına doğru değişim göstermiştir [83].

Altın nanokürelerin sentezi için; altın nanoçubukların sentezi sırasında kullanılan 0.1 M CTAB yerine 0.1 M BCC kullanılması dışında diğer protokol adımlarının aynısı uygulanmıştır. Sentezin son aşamasında bekleme süresinin sonunda şeffaf renk koyu kırmızı tonlara bürünmüştür.



Şekil 4.3. Laboratuvar ortamında küresel altın NP ve altın nanoçubukların sentezi

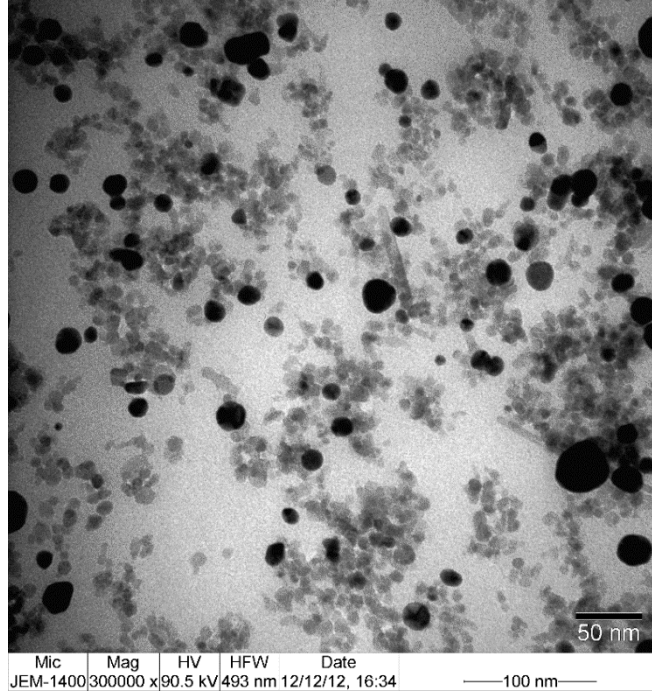
### 4.3. Karakterizasyon Çalışmaları

Sentezlenen altın kaplı  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin, altın nanoçubukların ve altın nanokürelerin karakterizasyonu geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ve UV-görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi ile yapılmıştır.

#### 4.3.1. Altın Kaplı $Fe_3O_4$ Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

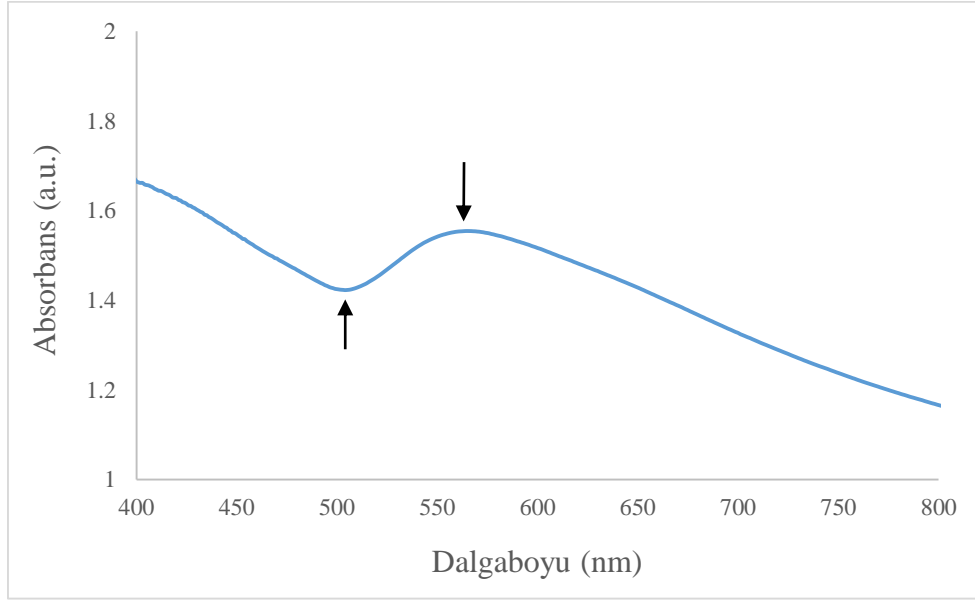
Altın kaplı  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin metal optik özelliklerinden yararlanılarak karakterizasyonu yapılmıştır. Şekil 4.4'te Altın kaplı  $Fe_3O_4$  nanopartiküllerin çekirdek çapı 9 nm ve kabuk kalınlığı 3 nm olan çekirdek-kabuk yapılarının TEM görüntüsü yer almaktadır. TEM mikrografi demir altın nanopartiküllerin, kaplanmamış demir nanopartiküllerle kümelenmiş halde olduğunu gösteriyor. TEM görüntüsündeki koyu çekirdekler, demir-altın nanopartiküllerinin

çekirdek-kabuk yapılarının oluşumunu göstermektedir. Partiküllerin neredeyse homojen bir dağılıma sahip oldukları ve küresel yapıda olduğu saptanmıştır.



Şekil 4.4. Altın kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin TEM görüntüsü

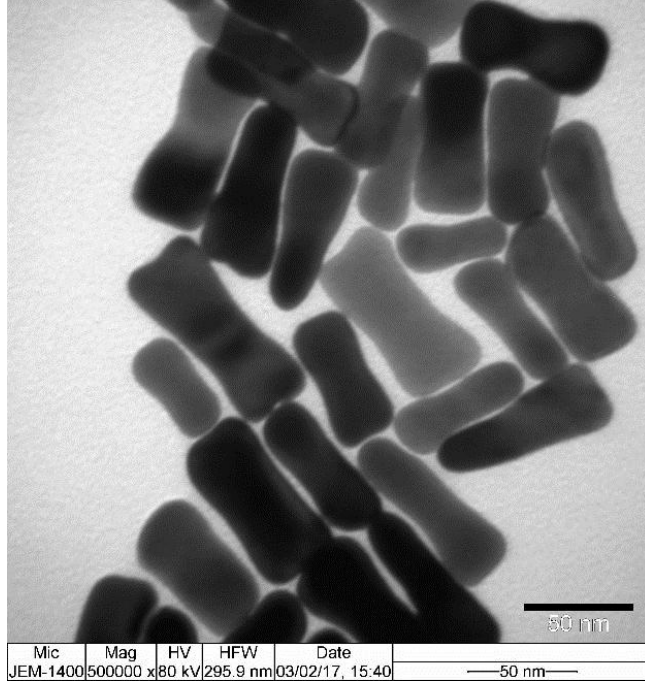
Altın kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin sahip olduğu yüzey plazmon rezonans özelliği, nanopartiküllerin ışığı absorplamasına ve saçmasına yol açar. Şekil 4.5'te UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumu gösterilmektedir. Spektrum incelendiğinde yaklaşık 550 nm'de absorpsiyon bandı görülmektedir, bu bant küresel nanopartiküllerin karakteristik bir özelliğidir ve Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin altın ile kaplandığını göstermektedir.



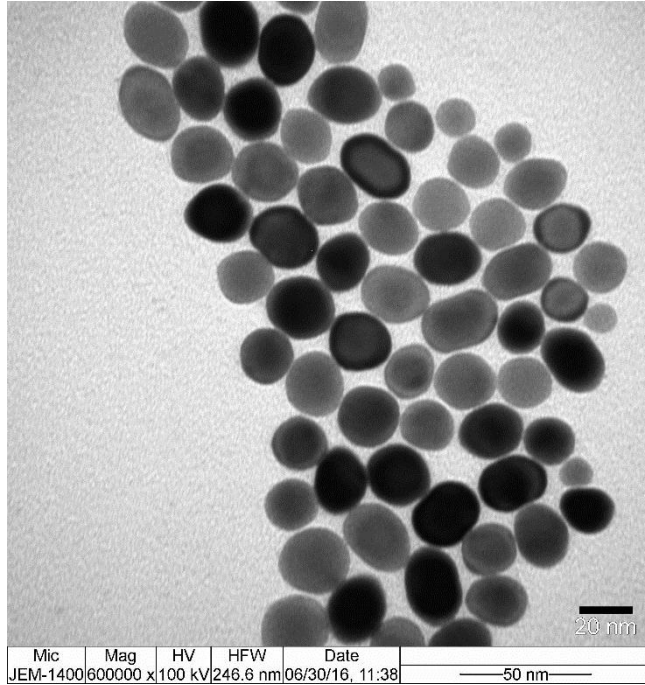
Şekil 4.5. Altın kaplı Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu

#### 4.3.2. Küresel Altın Nanopartiküllerin ve Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu

Küresel altın nanopartiküllerin ve altın nanoçubukların TEM görüntüsü Şekil 4.7'de verilmiştir. Altın nanopartiküllerin plazmon rezonans özellikleri boyutlarına, yapılarına (katı ya da boşluklu yapıda bulunmaları vs.), şekillerine ve buldukları ortamın refraktif indeksine göre değişir. Çalışmada farklı iki partikül için farklı karakterde iki spektrum kaydedilmiştir. Küresel altın nanopartiküllerinin ortalama boyutu 25 nm olarak saptanmıştır. En/boy oranı bir parçacığın genişliğine (~15 nm) bölünen uzunluğu (~45 nm) olarak tanımlanır. Sentezlenmiş altın nanoçubukların en/boy oranı yaklaşık 3 olarak hesaplanmıştır.



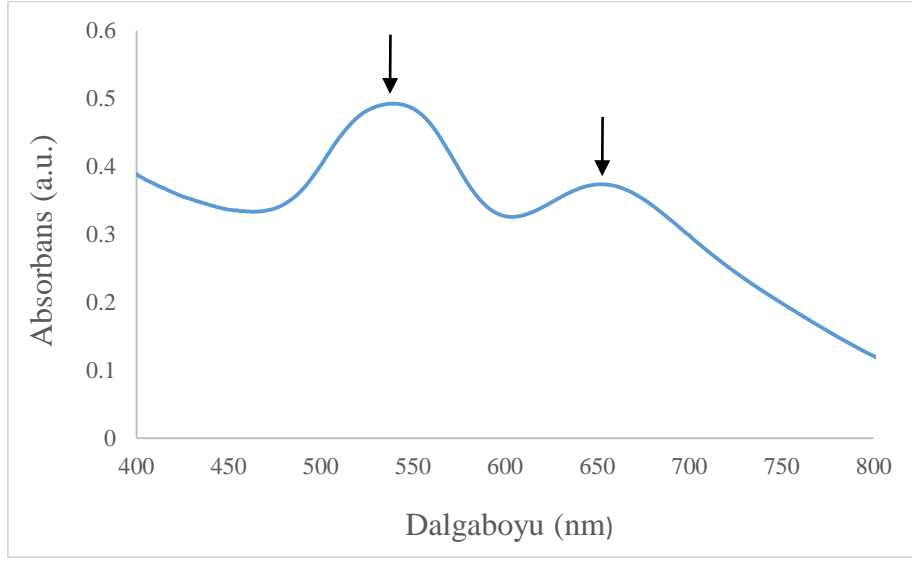
Şekil 4.6. Altın nanoçubukların TEM görüntüsü



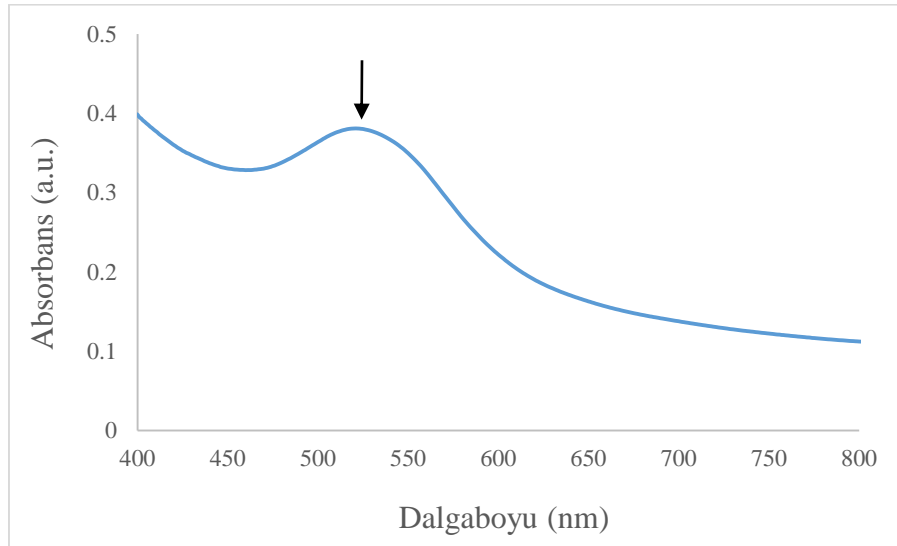
Şekil 4.7. Küresel altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü

Şekil 4.8 ve 4.9’da, altın nanopartiküllerin şeklini incelemek için kolloidlerin UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları kaydedilmiştir. Küresel altın nanopartiküller 534 nm’de bir plazmon bandına sahiptir. Öte yandan, altın nanoçubukların ilk plazmon bandı 531 nm’de çapraz plazmon

bandıdır, ikinci plazmon bandı ise 744 nm'de uzunlamasına plazmon bandıdır ve kırmızıya doğru kaymıştır. İlk plazmon, küresel nanopartiküller için klasik plazmon bandından kaynaklanmaktadır. İkinci plazmon bandı daha uzun dalga boyu bölgesinde görünür ve çubuk şeklindeki nanoparçacıkların en/boy oranına bağlıdır. Bu band 600-1600 nm civarında görünür ve çubuk şeklindeki nanopartiküllerin uzunlamasına plazmon bandına karşılık gelir. En/boy oranı arttıkça, düşük enerjili görünür bölge ile NIR'da çalışma olanağının artması, Raman verimliliğinin artması gibi avantajlar sağlamaktadır. Farklı en/boy oranına sahip nanoçubukların sentezlenmesi, farklı optik özelliklerin kazanılmasına yol açar.



Şekil 4.8. Altın nanoçubukların UV-Vis absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.9. Küresel altın nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumu

#### **4.4. Modifikasyon Çalışmaları**

##### **4.4.1. Yüzeyde Moleküllerin Tek Tabaka Halinde Düzenlenmesi (SAM)**

$Fe_3O_4@Au$  NP'lerin yüzeyinde moleküllerin tek tabaka halinde oluşturulması (SAM) işleminden önce manyetik NP'lerin yıkama işlemi yapılmıştır. Mıknatis yardımı ile NP'ler bir araya getirilip sıvı kısmı uzaklaştırılmıştır. Aynı işlem 3 defa tekrarlanıp yıkama deiyonize su ile yapılmıştır. Saf etanol içerisinde 20 mM 11-MUA hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözelti ile yıkanan manyetik NP'ler 1 gece boyunca çalkalayıcıda bekletilmiştir. Bekleme süresinin sonunda altın yüzey üzerinde karbonil grupları oluşturulmuştur. 11-MUA'nın fazlası, yine mıknatis yardımıyla partiküllerin MES (pH 6.50) tamponu ile üç defa yıkanmasıyla uzaklaştırılmıştır [84].

##### **4.4.2. Raman Etiketinin Bağlanması**

SERS sinyali takibi için 4-Aminotiyofenol SERS aktif molekülü kullanılmıştır. Bunun için 50 mM 4-ATP 1 mL saf etanol içinde hazırlanmıştır. Altın NP'lerin yüzeyine tiyol gruplarından bağlanması için önce partiküllerin yıkama işlemi yapılmıştır. Yıkama işlemi için altın NP'ler 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Sıvı uzaklaştırıldıktan sonra MES (pH 6.50) tamponu ile yıkaması yapılmıştır. Yıkama işlemi 2 defa tekrarlanmıştır. Yüzeyde SAM oluşturulması için altın NP'ler 4-ATP çözeltisi ile 1 gece boyunca çalkalayıcıda karıştırılmıştır. Süre sonunda yıkama işlemi aynı şekilde tekrarlanmıştır. 4-ATP'nin yüzeye bağlanmasıyla modifikasyon işlemleri 4-ATP'ye ait karbonil grupları üzerinden yapılmıştır.

##### **4.4.3. Karbonil Grupların Aktif Hale Getirilmesi**

$Fe_3O_4@Au$  NP'lerin yüzeylerinde oluşan serbest karbonil uçların aktif hale getirilmesi için 500  $\mu$ L MES tamponu içinde 4'er mg tartılan EDC ve NHS çözeltileri hazırlanmıştır. NP'ler bu çözeltiler ile karıştırıldıktan sonra 45 dakika çalkalayıcıda etkileşmeleri sağlanmıştır. Aktif hale getirilen gruplar üzerine gönderilen amin grupları ile kovalent bağ yapması sonucunda NP'lerin yüzeyinde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Süre sonunda  $Fe_3O_4@Au$  NP'ler mıknatis yardımıyla 3 defa MES tamponu ile yıkanmıştır [84].

Altın NP'ler için de aynı işlemler uygulanmıştır. Süre sonunda altın NP'ler 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilerek MES tamponu ile 2 defa yıkanmıştır.

#### **4.4.4. Nanopartikül Yüzeyine Antikorum İmmobilizasyonu**

Çalışma kapsamında hedef analitin ortamdaki seçici bir şekilde izole edilmesi için antikor-antijen kompleksinin oluşması sağlanmıştır.  $Fe_3O_4@Au$  NP'lerin yüzeyinde aktifleştirilen karbonil gruplarının üzerine antikorun bağlanması sağlanmıştır. LH izolasyonu için monoklonal fare Euketli anti- $\beta$  hLH IgG insan antikorunu kullanılmıştır. Tris-HCl tamponu (pH 7.8), BSA tuz çözeltisi ve  $< \%0.1$  sodyum azit içerisinde  $\sim 20 \mu\text{g/mL}$  konsantrasyonunda ticari olarak hazırlanan antikor dilüsyonu manyetik NP'ler ile karıştırılarak 1 gece çalkalayıcıda etkileşmesi sağlanmıştır. Süre sonunda yıkama işlemi mıknatıs yardımıyla 3 defa PBS (pH 7.40) tamponu ile yapılmıştır.

Altın NP'ler için de aynı işlemler uygulanmıştır. Süre sonunda altın NP'ler 10 dakika 13.000 rpm'de santrifüj edilerek PBS (pH 7.40) tamponu ile 2 defa yıkanmıştır [85].

#### **4.4.5. Spesifik Olmayan Bağlanmaların Bloklama Ajanları ile Engellenmesi**

Sandviç yapısının oluşması sırasında  $Fe_3O_4@Au$  ile Au NP'ler etkileşimi dışında meydana gelebilecek diğer nonspesifik bağlanmaların engellenmesi için bu partiküllerin yüzeylerinde açıkta kalan grupların bloklama ajanları ile kapatılması gerekmektedir. Çalışma kapsamında bloklama ajanı olarak  $\%10$  etanolamin-4 mg/mL D-alanin karışımı kullanılmıştır. Etanolamin/D-alanin çözeltileri hazırlandıktan sonra 500'er  $\mu\text{L}$  modifiye  $Fe_3O_4@Au$  ve Au NP'e eklenir. Çalkalayıcıda 1 saat boyunca etkileşmeleri sağlanır. Süre sonunda yıkama işlemi PBS (pH 7.40) tamponu ile  $Fe_3O_4@Au$  NP için 3 defa, Au NP için 2 defa tekrarlanmıştır [85].

#### **4.4.6. $Fe_3O_4@Au$ NP'lerin Protein ile Etkileştirilmesi**

Modifikasyon sonrası yüzeyi antikor ile kaplanmış  $Fe_3O_4@Au$  NP'ler beş ayrı Eppendorf tüpte farklı derişimlerdeki ( $\sim 0.4, 2, 10, 50, 250 \text{ IU/L}$ ) insan LH standartları ile etkileşmesi sağlanmıştır. Tüplerin ağzı iyice kapatıldıktan sonra oda sıcaklığında 1 saat süreyle çalkalayıcıda inkübe edilmiştir. Bu sayede hedef proteinin LH antikor uçlarına bağlanmaları sağlanmıştır. Çalkalama işleminin sonunda NP'ler 3 defa PBS (pH 7.40) tamponu ile mıknatıs yardımıyla yıkanarak bağlanmayan hLH'lerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır.

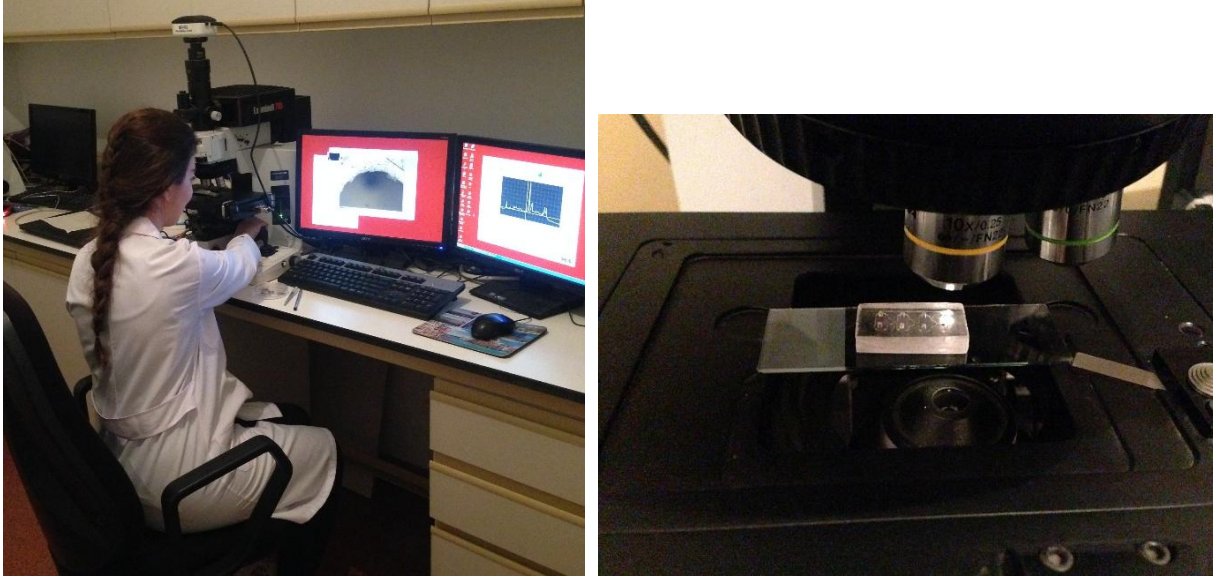
### **4.5. Optimizasyon Çalışmaları**

#### **4.5.1. Raman Mikroskopu Objektifinin Optimizasyonu**

Mikroskop objektifi, mikroskopik sistemlerde çok önemli bir rol oynar ve iki fonksiyona sahiptir: lazerle numuneyi taramak ve numunedeki üretilen Raman sinyalinin toplamak. Bu

nedenle, sinyalin yüksek bir transmittansının elde edilmesi için iyi bir hizalamanın yapılması gerekmektedir. Raman konfokal mikroskopunun çözünürlüğünün artırılması ve penetrasyon derinliği mikroskop objektifinin çalışma mesafesiyle sağlanır. Objektifin iyi bir sapma değerinin düzeltilmesini sağlamak için, objektifin çalışma mesafesinin yanı sıra, ortamın kırma indisi ( $n$ ) de kesinlikle dikkate alınmalıdır. Ayrıca, mikroçip ile objektif merceğinin aşınmasını önlemek için, uzun çalışma mesafesi hedefi de dikkate alınmalıdır.

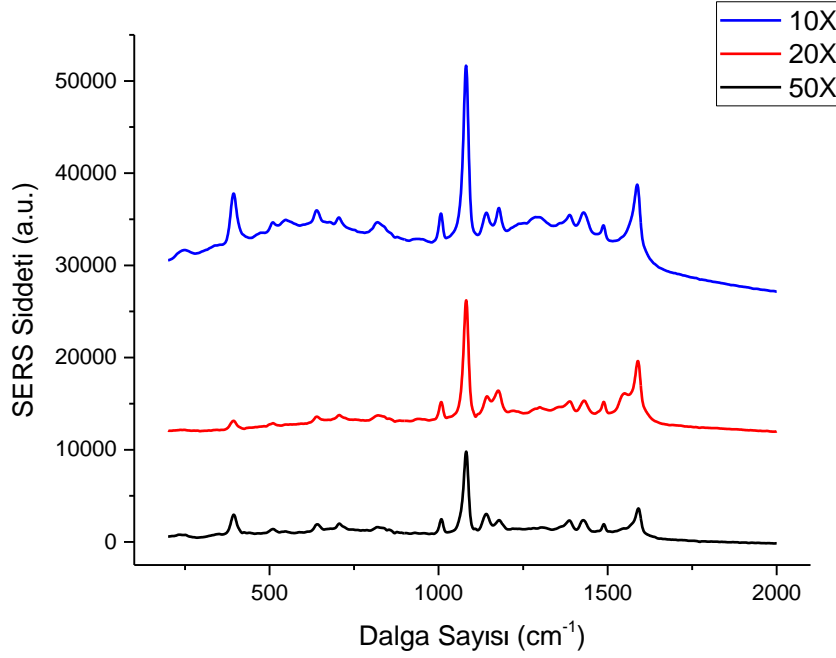
Objektif optimizasyon çalışması kapsamında; Raman mikroskop 785 nm lazer kaynağı, yaklaşık 30  $\mu\text{m}$  lazer spot alanı, 150 mW lazer gücü ve 45 saniye veri toplama süresi olarak ilgili parametreler ayarlanmıştır.



Şekil 4.10. Raman spektroskopisi ile mikroçipten ölçüm alınması ve mikroçipin son odacığına odaklı Raman mikroskopunun 10X objektifi

Lazer ışınının odaklanması ve dağınık ışığın toplanması için 10X/0.25, 20X/0.40 ve 50X/0.75'lik mikroskop objektifleri optimize edilmiştir. Sandviç yapının oluşumu için stoktan alınan 500  $\mu\text{L}$  süspansiyon  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  NP ve Au NP modifiye edilmiştir. Derişimi  $\sim 20 \mu\text{g}/\text{mL}$  hLH antikorlu, 50  $\mu\text{L}$  kadar modifiye NP'ler ile etkileştirilip son hacim 250  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Son olarak yine 50  $\mu\text{L}$ , 2 IU/L derişiminde hLH hormonu, yüzeyinde antikor bulunan  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  NP ile etkileştirilip son hacim 100  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.





Şekil 4.11. Farklı Raman mikroskobu objektiflerinden alınan SERS spektrumları

Mikroçipin son odacığının deliğine lazer ışının odaklanması ile 4-ATP'den gelen SERS sinyalleri ölçülmüştür. En yüksek SERS sinyal şiddeti 10X/0.25 objektifi ile elde edilmiştir.

#### 4.5.2. Deneysel Parametrelerin Optimizasyonu

Nanopartiküllerin modifikasyonu için başlıca kullanılan; 11-MUA, 4-ATP, EDC/NHS ve Etanolamin/D-Alanin çözeltileri, antikor derişimi, PBS/MES yıkama tamponu daha önce yapılan benzer çalışmalarda optimize edilmiştir. Bu nedenle zamandan, maddeden, özellikle de antikor miktarından tasarruf etmek için önceden kullanılan optimize değerler esas alınmıştır.

##### 4.5.2.1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP Miktarının Optimizasyonu

###### Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au Partikül Sayısının Hesaplanması

Eppendorf tüp ağırlığı = 1.1089 g

Eppendorf tüp ağırlığı + kurutulmuş süspansiyon Fe@Au NP'lerin ağırlığı = 1.1133 g

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerin ağırlığı =  $4.4 \times 10^{-3}$  g = 4.4 mg

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerin hazırlanması için kullanılan Fe miktarı = 5 mg

Partikül kayıp miktarı = 0.6 mg

$$V_{\text{partikül}} = \frac{4}{3} \pi r^3 \quad r = 6 \text{ nm}$$

$$V_{\text{partikül}} = 904.78 \text{ nm}^3$$

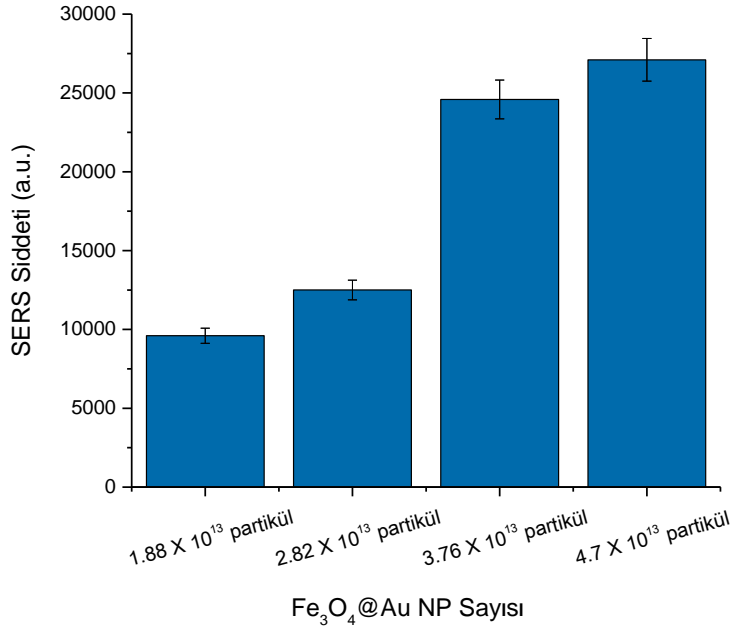
$$\rho_{\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}} = 5.17 \times 10^{-21} \text{ g/nm}^3$$

$$V_{\text{toplamlam}} = 8.5106 \times 10^{17} \text{ nm}^3$$

$$\text{Partikül sayısı} / 5 \text{ mL} = \frac{V_{\text{toplamlam}}}{V_{\text{partikül}}}$$

$$\text{Partikül sayısı} / 5 \text{ mL} = 9.4 \times 10^{14}$$

Sentezlenen  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  NP vialler içinde 5 mL deiyonize suda muhafaza edilmiştir. Modifikasyonları Eppendorf tüpte yapılmıştır ve mikroçipe aktarılmadan önce hafif çalkalayarak homojen dağılımları sağlanmıştır ve yaklaşık 10  $\mu\text{L}$ 'si çipte kullanılmıştır. Sandviç yapının sağlam bir şekilde oluşumunu sağlamak amacıyla  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  partikül miktarını ve buna paralel olarak partikül sayısını optimize etmek gerekmektedir. Optimizasyon için stok 5 mL'lik  $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Au}$  NP'lerinden sırasıyla 100, 150, 200 ve 250  $\mu\text{L}$  ayrı Eppendorf tüplerine aktarılmıştır ve son hacimleri deiyonize su ile 250  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Prosedüre uygun olarak yıkamaları ve modifikasyonları tamamlanmıştır. Son olarak; partiküller 50  $\mu\text{L}$  hLH antikoru ile etkileştirilip paralel bir şekilde her bir Eppendorf tüpünün son hacmi 250  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır. Aynı şekilde 50  $\mu\text{L}$  hedef protein hLH (50 IU/L) ile etkileştirip son hacim 250  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.

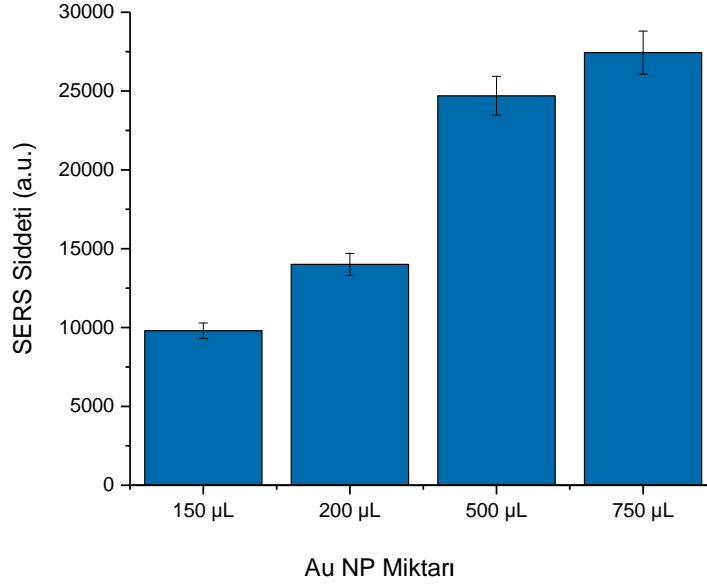


Şekil 4.12. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda modifiye edilen Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerden kaydedilen SERS sinyalleri

Elde edilen verilerin sonucunda, Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerin miktarı arttıkça SERS sinyallerinde de bir artış gözlemlenmiştir. Ancak 200 µL ile 250 µL arasında önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır. Homojen sandviç yapının oluşumu için, başlangıçta modifiye edilecek optimum Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP miktarı 200 µL olarak belirlenmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerin mevcut aralıklarda optimize edilmesinin başlıca sebebi; daha düşük miktarların sandviç yapının oluşumuna yetmemesi, daha yüksek miktarların ise mikroç vanasının tıkanmasına sebep olmasıdır.

#### 4.5.2.2. Altın Nanoçubuk ve Küresel Altın Nanopartikül Miktarının Optimizasyonu

Sentezlenen altın NP vialler içinde 5 mL deiyonize suda muhafaza edilmiştir. Modifikasyonları Eppendorf tüpte yapılmıştır ve mikroçipe aktarılmadan önce hafif çalkalayarak homojen dağılımları sağlanmıştır ve yaklaşık 10 µL'si çipte kullanılmıştır. Sandviç yapının sağlam bir şekilde oluşması ve 4-ATP'nin SERS sinyallerinin düzgün alınması için altın NP miktarı oldukça önemlidir. Optimizasyon için stok 5 mL'lik altın NP'lerinden sırasıyla 150, 250, 500 ve 750 µL ayrı Eppendorf tüplerine aktarılmıştır ve son hacimleri deiyonize su ile 750 µL'ye tamamlanmıştır. Prosedüre uygun olarak yıkamalar ve modifikasyonlar tamamlanmıştır. Son olarak; partiküller 50 µL hLH antikoru ile etkileştirilip paralel bir şekilde her bir Eppendorf tüpünün son hacmi 250 µL'ye tamamlanmıştır.



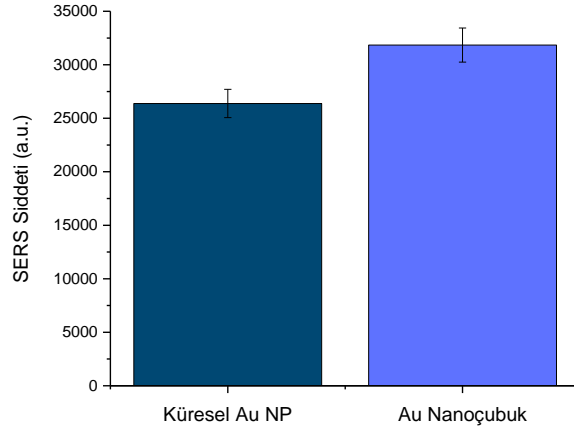
Şekil 4.13. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda modifiye edilen Au nanoçubuklardan kaydedilen SERS sinyalleri

Elde edilen verilerin sonucunda, Au NP'lerin miktarı arttıkça SERS sinyallerinde de bir artış gözlemlenmiştir. Ancak 500 µL ile 750 µL arasında önemli düzeyde bir fark olmadığı saptanmıştır. Homojen sandviç yapının oluşumu için, başlangıçta modifiye edilecek optimum Au NP miktarı 500 µL olarak belirlenmiştir. Au NP'lerin yüksek aralıklarda optimize edilmesinin başlıca sebebi; Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'ün yapısal olarak daha yoğun olmasından dolayı 4-ATP'nin SERS sinyal takibini zorlaştırmasıdır.

#### 4.5.2.3. Altın Nanoçubuklar/Nanoküreler Kullanılarak Elde Edilen SERS Sinyalleri

Literatüre bakıldığında altın NP'lerin yapısı SERS sinyallerini etkilemektedir; Yüzey alanının büyümesi ile SERS sinyalleri artmaktadır. Bu çalışma kapsamında altın nanoçubuklar ve küresel altın NP sentezlenmiştir [83]. Bu doğrultuda istenilen Au nanoçubukların her zaman aynı yapıda sentezlenmesi güç olmuştur. SERS sinyalinin ne kadar etkilendiğini saptamak amacıyla her iki yapıdaki Au NP ile immünoanaliz sistemi oluşturulmuştur.

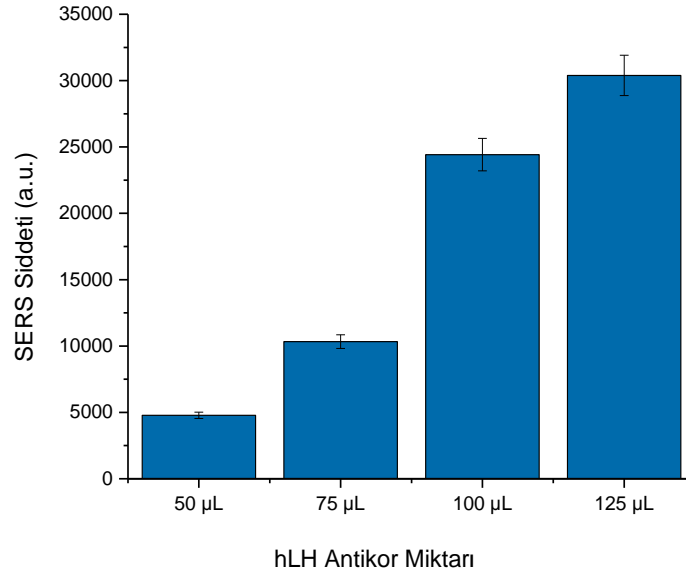
SERS sinyal verilerine göre, Au nanoçubuk kullanıldığında daha yüksek şiddette sinyal elde edilmesine rağmen önemli bir ölçüde fark olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun sonucunda çalışma kapsamında her iki yapıdaki Au NP kullanılmıştır.



Şekil 4.14. İmmunoanaliz yönteminde homojen sandviç yapısının küresel Au nanopartiküller ve Au nanoçubuklar kullanılarak oluşturulması sırasında kaydedilen SERS sinyalleri

#### 4.5.2.4. NP ile Etkileşen Antikor ve Protein Miktarının Optimizasyonu

Optimize edilen değerlerde stoktan 200  $\mu\text{L}$   $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  ve 500  $\mu\text{L}$  Au NP'lerin yıkama ve modifikasyon işlemleri tamamlanmıştır.  $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$  ve Au NP ile etkileşecek antikor ( $\sim 20 \mu\text{g/mL}$ ) miktarı için sırasıyla; 50, 75, 100, 125  $\mu\text{L}$  hLH antikorunu NP ile etkileştirilmiştir ve son hacim 250  $\mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.



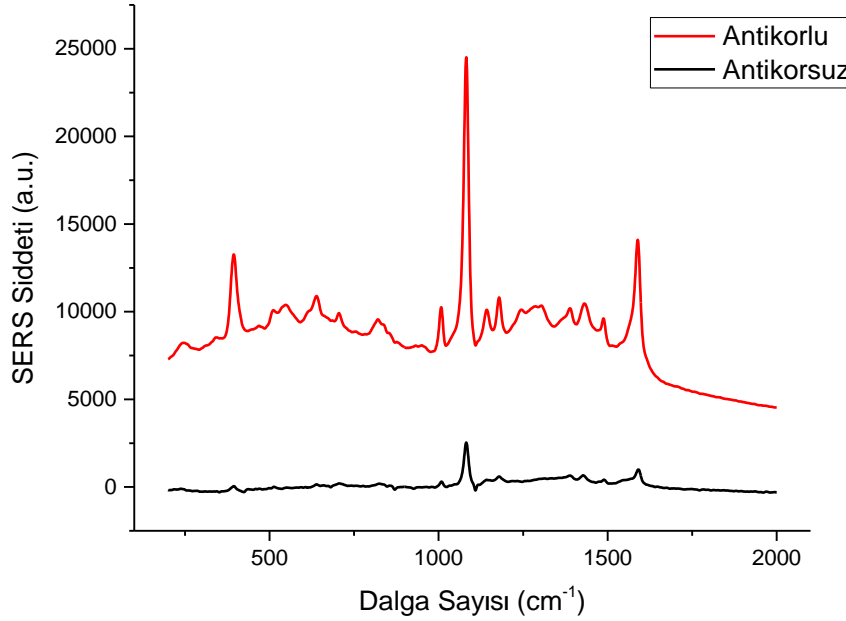
Şekil 4.15. Sandviç yapının oluşumu için farklı miktarlarda antikor ile etkileşen NP'lerden elde edilen SERS sinyalleri

Optimizasyon verilerine göre antikor miktarı arttıkça SERS sinyalleri de artmaktadır, ancak 100  $\mu\text{L}$ 'den sonra önemli düzeyde bir artış gözlemlenmemiştir. Antikor maaliyetini de göz önünde bulundurarak homojen sandviç yapının oluşumu için NP ile etkileşecek optimum antikor miktarı 100  $\mu\text{L}$  olarak belirlenmiştir. Bu değerden yola çıkarak antikor-antijen bağlanması gerçekleşeceğinden LH-Ab ile aynı miktarda hLH kullanılmıştır.

#### 4.6. Tasarlanan İmmunoanaliz Sistemin Kontrolü

##### 4.6.1. Antikor Kullanılmadan Yapılan Nonspesifik Deneme

Spesifik olarak proteinin NP'lerin yüzeyine modifiye edilen antikorlara bağlanması dışında, süspansiyonda doğrudan çıplak NP'lerin yüzeyine bağlanması da olası bir durumdur. Spesifik olmayan etkileşimlerin meydana gelmesi ve bu partiküllerin mikroçipin son odacığına taşınması SERS sinyallerine olumsuz etki sağlayacaktır. SERS sinyaline etkisini incelemek için optimize edilen değerlerde NP'ler kullanılmıştır. Yine optimize edilen değerlerde antikor ( $\sim 20 \mu\text{g/mL}$ ) ve protein (10 IU/L) kullanılmıştır. Deney aynı koşullarda üç kez tekrarlanmıştır.

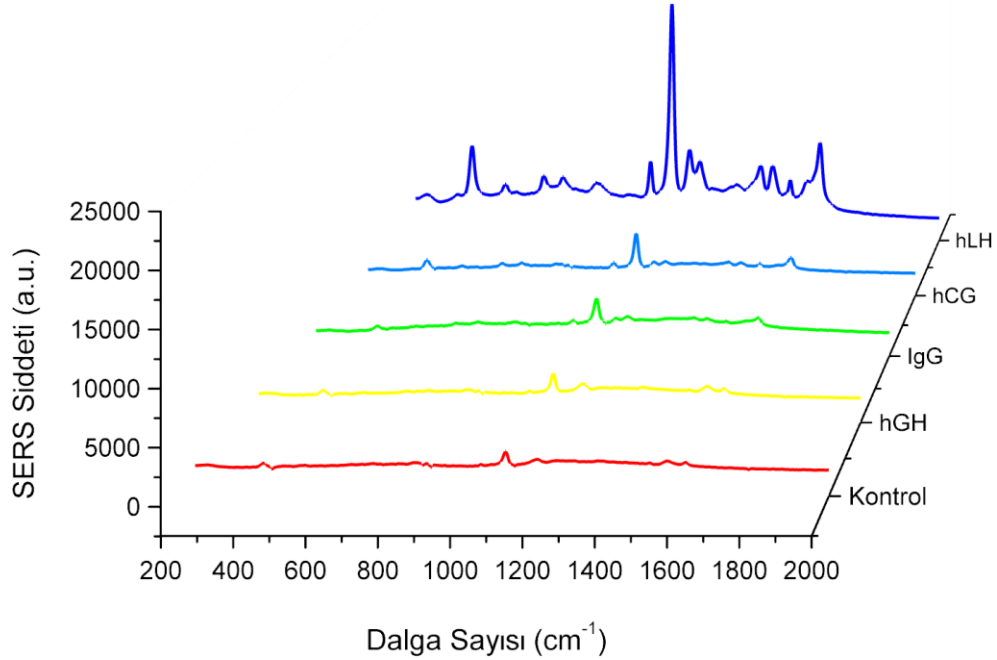


Şekil 4.16. Modifikasyon aşamasında NP'lerin yüzeyine antikor bağlanması ve antikor kullanılmadan elde edilen SERS spektrumlarının incelenmesi

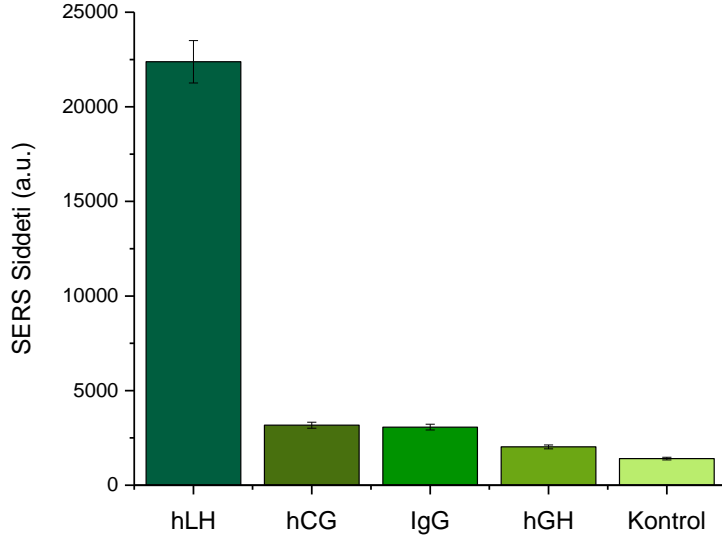
Alınan SERS sinyalleri incelendiğinde; gözlenen sinyal ile kör sinyal arasında anlamlı bir fark olmadığını, bu da hLH antikor olmaksızın spesifik olmayan bağlanmalar yapılmayıp homojen sandviç yapıyı oluşturmadığını göstermiştir.

#### 4.6.2. Antikor Seçiciliğinin Test Edilmesi

hLH iki polipeptid bağ;  $\alpha$  ve  $\beta$  epitoplarına sahiptir. hLH'nin  $\alpha$  epitopu hCG, hFSH, hTSH gibi moleküller ile benzerdir.  $\beta$  epitopu ise hLH'nin biyolojik ve fizyolojik özelliklerini belirler. Tasarlanan immünoanaliz sisteminde ortamdan hedef proteini yakalayabilmek için hLH özgü antikor kullanılmalıdır. Antikorum hLH seçiciliğini kontrol etmek amacıyla insan serumu matrisinde bulunan benzer epitoplara sahip proteinler (hCG, IgG, hGH) ile deneme yapılmıştır. PBS tamponu içerisinde 0.5 mg/mL IgG ve hGH, bu derişime eşdeğer olarak 2 IU/L hCG ve hLH hazırlanmıştır. hLH tayini için tasarlanan aynı prosedür mevcut proteinler için de uygulanmıştır.



Şekil 4.17. İmmünoanaliz yöntemin luteinizan hormona seçici olduğunu gösteren SERS spektrumu



Şekil 4.18. Aynı derişime sahip farklı proteinler ve kör çözelti ile yapılan denemeler sonucu elde edilen SERS sinyallerinin incelenmesi

Analiz sonunda tüm proteinler için SERS sinyalleri kaydedilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre hLH ile aynı derişimdeki proteinlerin SERS sinyal şiddetleri kör sinyal ile yaklaşık değerlerde olduğu, hLH antikorunun spesifik olarak hLH tanıyabildiği ve diğer proteinlerin hLH tayininde girişim yapmadığı saptanmıştır.

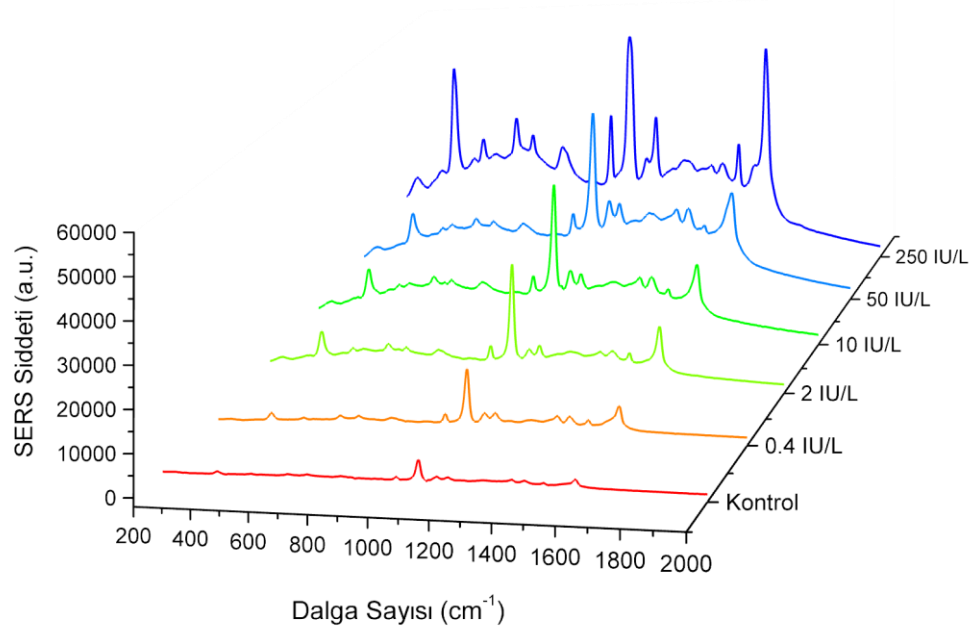
#### 4.7. Kalibrasyon Grafiğinin Oluşturulması

Optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra, kantitatif analiz amacıyla geliştirilen bu analitik metodun doğrusal çalışma aralığının belirlenmesi için kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Optimize edilen değerler doğrultusunda  $Fe_3O_4@Au$  ve Au NP'lerin modifikasyon ve yüzeylerine antikor immobilizasyon işlemleri tamamlanmıştır.  $Fe_3O_4@Au$  NP'ler ile etkileştirilecek hLH standartlarının derişimleri, biyolojik insan sıvılarında bulunması öngörülen değer aralıklarına uygun olarak kullanılmıştır.

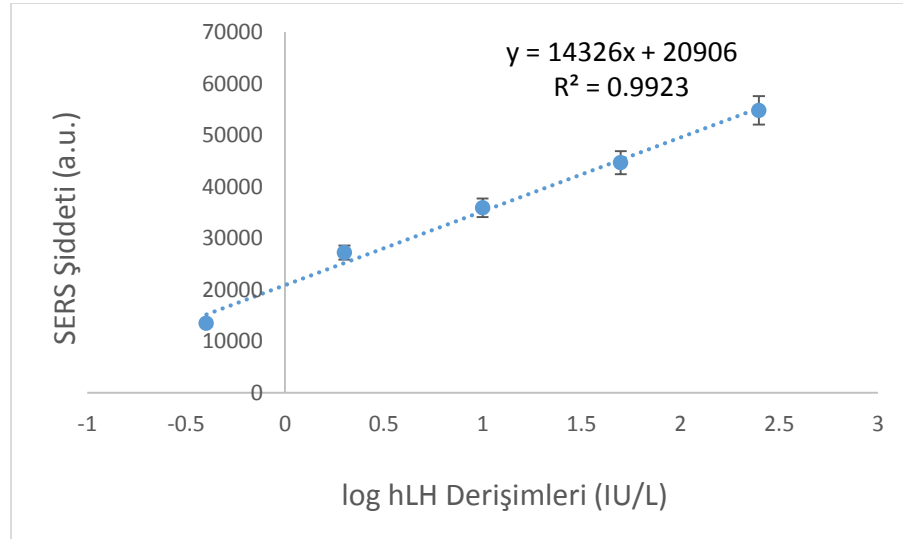
Her derişim için immünoanaliz yöntem aşamalarına uygun olarak mikroçipte ' $Fe_3O_4@Au$  NP – LH – Au NP' konjugatları ile sandviç yapısı oluşturulmuştur. hLH standart çözeltileri 0.4, 2, 10, 50 ve 250 IU/L değişen aralıklarda stok çözeltilerden hazırlanmıştır ve kullanılan dilüsyonlardan SERS spektrumları elde edilmiştir. Raman etiketi olarak kullanılan 4-ATP'nin 1086  $cm^{-1}$ 'deki C-S grubuna ait bant şiddetlerinin, hLH derişimlerine karşılık gelen değerlerle



kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Sonuç olarak, hazırlanan bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9923$ ) elde edilmiştir.



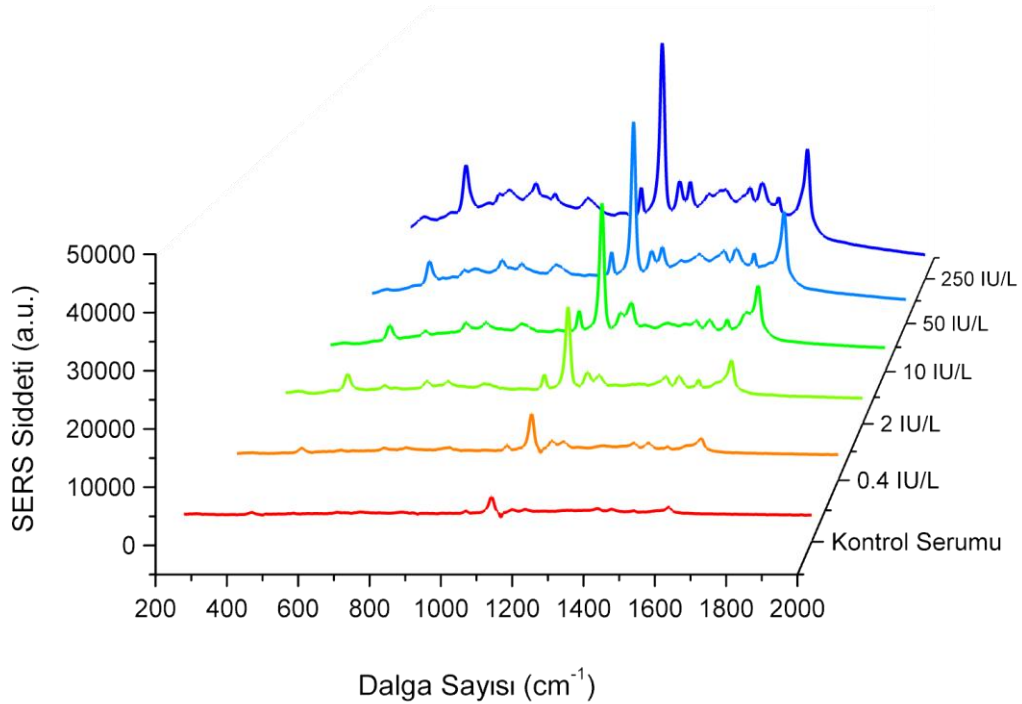
Şekil 4.19. Homojen sandviç sisteminde farklı hLH derişimlerinde elde edilen SERS spektrumları



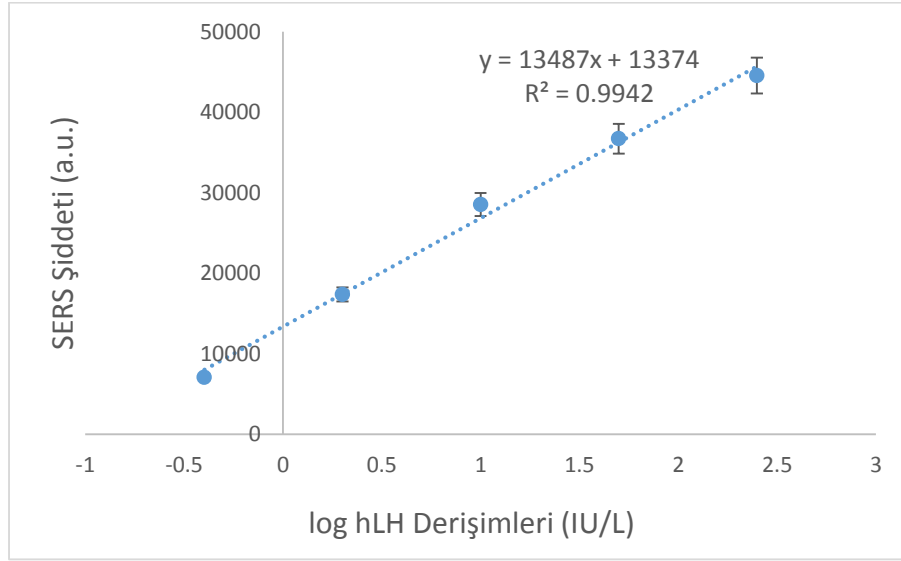
Şekil 4.20. Homojen sandviç sisteminde farklı hLH derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9923$ ,  $y = 14326x + 20906$ )

#### 4.8. Yöntemin Biorad Orijinli Kontrol Serum Örneklerine Uygulanması

Yöntemin gerçek örnek denemelerinde de geçerli olduğunu göstermek için 96 farklı analit içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerine (Seviye 2) hLH standartları ‘spike’ edilmiştir. Biorad orijinli kontrol serum örneği ticari flakon kapları içerisinde stabilitenin artırılması amacıyla liyofilize formda bulunmaktadır. Kullanma prosedürüne uygun olarak 5 mL deiyonize su eklenmiştir ve 35°C’ye kadar ısıtılarak 15 dakika hafif çalkalanmıştır. Kontrol serum çözeltisi homojen hale geldikten sonra altı farklı Eppendorf tüp içerisine 500’er µL eklenmiştir ve sırasıyla 250 µL hLH standartları (0.4, 2, 10, 50 ve 250 IU/L) ile etkileştirilmiştir. Her derişim için immünoanaliz yöntem aşamalarına uygun olarak mikroçipte ‘Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP – LH – Au NP’ konjugatları ile sandviç yapısı oluşturulmuştur. Raman etiketi olarak kullanılan 4-ATP’nin 1086 cm<sup>-1</sup>’deki C-S grubuna ait bant şiddetlerinin, hLH derişimlerine karşılık gelen değerlerle kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Sonuç olarak, hazırlanan bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiği (R<sup>2</sup> = 0.9942) elde edilmiştir.



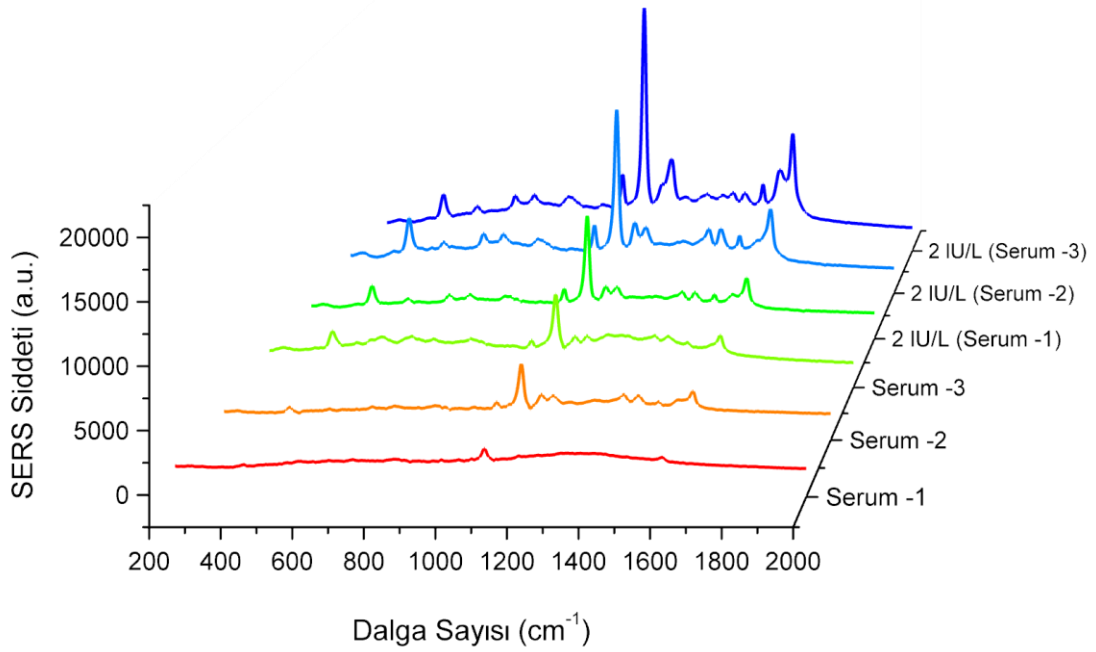
Şekil 4.21. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerde hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen SERS spektrumları



Şekil 4. 22. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerde hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9942$ ,  $y = 13487x + 13374$ )

#### 4.9. Validasyon Deneyleri

Endojen ve rekombinant hLH ayrımını gösterebilmek için üç farklı derişimde (Seviye 1, 2 ve 3 için sırasıyla hLH derişimi; 1.5, 2.5, 5 IU/L) hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örnekleri kullanılmıştır. Örnekler iki kısma ayrılmıştır; ilk kısmı doğrudan analiz edilmiştir, ikinci kısmı ise 2 IU/L hLH ile etkileştirilip analiz edilmiştir. SERS spektrumları incelendiğinde hLH (2 IU/L) içeren örneklerin SERS şiddetlerinin, kör olarak kullanılan kontrol serumlarından daha yüksek olduğu, bunun sonucunda geliştirilen yöntemin hedef analiti tanımakta seçici ve hassas olduğu gösterilmiştir.



Şekil 4.23. Homojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumlarının analizi

Validasyon çalışması kapsamında yöntemin seçiciliği, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), doğruluğu ve geri kazanım değerleri tespit edilmiştir. Tespit limiti ve tayin limiti değerlerinin hesaplanması için 0-250 IU/L arasında hLH içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliği kullanılmıştır. IUPAC'a göre LOD ve LOQ değerleri aşağıdaki eşitlikten hesaplanmıştır;

$$LOD = \frac{k1 \times sb}{b}, \quad LOQ = \frac{k2 \times sb}{b}$$

b = kalibrasyon doğrusunun eğimi, sb = regresyon bağımsız teriminin standart sapması, k1 ve k2 sırasıyla yaklaşık olarak 3.3 ve 10'dur. Hesaplanan LOD ve LOQ değerleri çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1. Homojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen regresyon eşitliğinden hesaplanan LOD ve LOQ değerleri

<b>Homojen Sandviç Sistemi</b>	
Regresyon Eşitliği	$y = 13487x + 13374$
LOD (IU/L)	0.036
LOQ (IU/L)	0.1108

Yöntemin doğruluğunu ve geri kazanım değerlerini hesaplamak için 0.4, 2 ve 10 IU/L derişimlerinde hLH, biorad orijinli kontrol serum örneklerine eklenmiştir. Üç gün aynı koşullarda analiz tekrar edilmiştir. Biorad orijinli kontrol serum örnekleri ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliği kullanılarak aşağıdaki değerler hesaplanmıştır;

Çizelge 4.2. Biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen geri kazanım değerleri ve geliştirilen immünoanaliz yöntemin doğruluğu

<b>Homojen Sandviç Sistemi</b>				
Konsantrasyon (IU/L)	Bulunan (IU/L)	Geri Kazanım (%)	Doğruluk (%)	RSD (%)
0.4	0.36	90	-10	3.8073
2	1.87	93.5	-6.5	1.1243
10	9.63	96.3	-3.7	3.9584

## 5. SONUÇ VE TARTIŞMA

Biyomoleküllerin hızlı bir şekilde analiz edilmesi ve tanımlanması son zamanlarda önemli bir araştırma konusu olarak ele alınmaktadır. Biyomoleküllerin alt sınıfında yer alan LH tespiti için bu çalışma kapsamında düşük tayin sınırı, yüksek hassasiyet ve yüksek seçiciliğe sahip alternatif bir tayin yöntemi geliştirilmiştir. Kompleks insan serumu matriksinden hLH'ın tespiti için minyatürize sistem, immünomanyetik ayırma ve optik ölçüm tekniği değerlendirilmiştir. Minyatürize düzenek olarak poli (metil metakrilat) tabanlı mikroçip kullanılmıştır. İmmünomanyetik ayırmanın mikroçipin içinde gerçekleşmesi için homojen sandviç yapısı oluşturulmuştur. Homojen sandviç yapısının oluşumu için ilk olarak altın kaplı demir NP'ler ve altın NP'ler sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Karakterizasyon çalışmaları TEM ve UV-Vis Absorpsiyon spektroskopisi ile yapılmıştır. Au NP'lerin spektrumları incelendiğinde; çubuk yapısına sahip Au NP'lerin sahip olduğu ikinci plazmon bandı karakteristik bir banttır, daha uzun dalga boylarında görünür ve partiküllerin en/boy oranına bağlıdır. Bu sayede TEM mikrografi olmaksızın, farklı yapılara sahip NP tanımlanabilir. TEM mikrografi sayesinde sentezlenen NP'lerin dağılımları ve boyutları saptanmıştır.

Modifikasyon çalışmaları sonucunda Fe@Au NP'lerin yüzeyi kovalent bir şekilde antikor ile kaplanmıştır. Au NP'ler ise öncelikle SERS aktif substrat 4-ATP ile kaplanmıştır, etiketleme işleminden sonra antikor ile bağlanmıştır. Antikor ile modifiye edilen Fe@Au NP'ler numune ile karıştırılmıştır ve hLH'ın analiz ortamından başarılı bir şekilde ayrılması sağlanmıştır. Sandviç yapının tamamlanması için ortama 4-ATP etiketli Au NP'ler eklenerek SERS sinyalleri kaydedilmiştir.

Nanopartiküllerin hazırlanması ve yüzey modifikasyonlarında kullanılan 11-MUA ve NHS/EDC miktarları, reaksiyon süresi, antikor derişimi ve etkileşim süresi, spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için bloklama ajanlarının kullanılması daha önce yapılan çalışmalarda optimize edildiğinden aynı değerler kullanılmıştır. Hedef proteinin yakalanması için mikroçipe enjekte edilecek Fe@Au NP ve Au NP miktarı, farklı yapıda Au NP'lerin etkisi, antikor miktarı, ölçüm aşamasında Raman mikroskopu objektifi gibi parametreler en ideal S/G oranını sağlayacak şekilde optimize edilmiştir.

Lazer ışınının odaklanması ve dağınık ışığın toplanması için 10X/0.25, 20X/0.40 ve 50X/0.75'lik mikroskop objektifleri optimize edilmiştir. Mikroçipin son odacığının deliğine

lazer ışının odaklanması ile 4-ATP'den gelen SERS sinyalleri ölçülmüştür. En yüksek SERS şiddeti 10X/0.25 objektifi ile elde edilmiştir. Literatüre bakıldığında Mondal S. ve arkadaşları lab-on-a-chip sistemleri üzerine yaptıkları çalışmada 10X objektifle mikroçip üzerinde odaklanan bir 470 nm mavi LED kaynağı kullanmışlardır [86].

Sandviç yapısının oluşumu sırasında, partiküllerin topaklanması sonucu mikroçipin kapiler bağlantılarını tıkanma sorunu dolayısıyla baç tipi sistemlerden farklılık göstermektedir. Bunu destekleyen literatür çalışmaları mevcuttur [84, 85]. Bu nedenle hazneye konulacak nanopartiküllerin miktarı optimize edilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP miktarının optimizasyonu için stok 5 mL'lik Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP'lerinden sırasıyla 100, 150, 200 ve 250 µL ayrı Eppendorf tüplerine aktarılmıştır ve son hacimleri deiyonize su ile 250 µL'ye tamamlanmıştır. Prosedüre uygun olarak yıkamaları ve modifikasyonları tamamlanmıştır. Son olarak; Partiküller 50 µL hLH antikoru ve hedef protein ile etkileştirilip her bir Eppendorf tüpünün son hacmi 250 µL'ye tamamlanmıştır. Optimize edilen hacimler sırasıyla, 1.88 x 10<sup>3</sup>, 2.82 x 10<sup>3</sup>, 3.76 x 10<sup>3</sup> ve 4.7 x 10<sup>3</sup> partikül sayısına karşılık gelmektedir. Bunun sonucunda Şekil 4.5'te gösterildiği gibi başlangıçta modifiye edilecek optimum Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au NP miktarı 200 µL yani 3.76 x 10<sup>3</sup> partikül olarak belirlenmiştir. Yıkamalarda kayıplar ihmal edildiğinden mikroçipe enjekte edilen Fe@Au NP miktarı yaklaşık olarak 150'dir.

Sandviç yapının sağlam bir şekilde oluşması ve 4-ATP'nin SERS sinyallerinin düzgün alınması için altın NP miktarı oldukça önemlidir. Optimizasyon için stok 5 mL'lik altın NP'lerinden sırasıyla 150, 250, 500 ve 750 µL ayrı Eppendorf tüplerine aktarılmıştır ve prosedüre uygun olarak yıkamaları ve modifikasyonları tamamlanmıştır. Son olarak; Partiküller 50 µL hLH antikoru ile etkileştirilip paralel bir şekilde her bir Eppendorf tüpünün son hacmi 250 µL'ye tamamlanmıştır. Bunun sonucunda Şekil 4.6'da gösterildiği gibi başlangıçta modifiye edilecek optimum Au NP miktarı 500 µL olarak belirlenmiştir.

SERS sinyalinin ne kadar etkilendiğini saptamak amacıyla küresel ve çubuk yapıda Au NP ile immünoanaliz sistemi oluşturulmuştur. Literatüre bakıldığında altın NP'lerin yapısı SERS sinyallerini etkilemektedir; yüzey alanının büyümesi ile SERS sinyalleri artmaktadır. Yazgan N.N. ve arkadaşları proteolitik enzim aktivitesini ölçmek için yaptıkları çalışmada Au nanoçubuklardan elde ettikleri SERS sinyal şiddetlerinin küresel yapıdaki Au NP'lerden daha yüksek olduğunu saptamışlardır [83]. Bu çalışma kapsamındaki SERS sinyal verilerine göre;

Au nanoçubuk kullanıldığında daha yüksek şiddette sinyal elde edilmesine rağmen önemli bir fark olmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Bunun sonucunda çalışma kapsamında her iki yapıdaki Au NP kullanılmıştır.

Çalışmanın en önemli dezavantajları antikor maaliyetinin yüksek olmasıdır. İsriftan kaçınmak amacıyla antikor derişimi literatürü destekler şekilde ~ 20 µg/mL olarak kullanılmıştır [85]. Çalışma kapsamında NP'ler ile etkileşecek antikor miktarı optimize edilmiştir. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@Au ve Au NP ile etkileşecek antikor (~ 20 µg/mL) miktarı için sırasıyla; 50, 75, 100, 125 µL hLH antikoru NP'ler ile etkileştirilmiştir ve son hacim 250 µL'ye tamamlanmıştır. Antikor maaliyetini de göz önünde bulundurarak homojen sandviç yapının oluşumu için NP ile etkileşecek optimum antikor mikarı 100 µL olarak belirlenmiştir (Şekil 4.8). Bu değerden yola çıkarak antikor-antijen bağlanması gerçekleşeceğinden LH-Ab ile aynı miktarda hLH kullanılmıştır.

Optimizasyon çalışmaları tamamlandığında etiket olarak kullanılan 4-ATP'nin 1086 cm<sup>-1</sup>'deki C-S grubuna ait sinyal şiddetlerinin artan hLH derişimlerine (0.4, 2, 10, 50 ve 250 IU/L) karşılık gelen değerleri kullanarak kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Sonuç olarak, hazırlanan bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9923$ ) elde edilmiştir.

Literatür çalışmalarına bakıldığında kalibrasyon eğrileri genelde standart analit örnekleri için oluşturulmuştur ve hesaplamalar bu eğriler üzerinden yapılmıştır [87]. Çalışmamızda ise yöntemin gerçek örnek denemelerinde geçerli olduğunu göstermek için 96 farklı analit içeren biorad orijinli kontrol serum örneklerine hLH standartları 'spike' edilmiştir. Sonuç olarak, hazırlanan 0.4, 2, 10, 50 ve 250 IU/L konsantrasyonlar için doğrusal kalibrasyon grafiği ( $R^2 = 0.9942$ ) elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin biorad orijinli kontrol serum örneklerinden ve standart çözeltilerden elde edilen SERS sinyal şiddetleri karşılaştırıldığında, serum örneklerinden elde edilen SERS şiddetlerinin daha düşük olduğu bulunmuştur, bu da gerçek örneklerle yapılan analizlerde beklenen bir sonuçtur. Validasyon verilerinin hesaplanması için biorad orijinli kontrol serum örneklerinden elde edilen regresyon eşitliği kullanılmıştır. Yöntemin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0.0365 IU/L ve 0.1108 IU/L olarak bulunmuştur. hLH tayini için çalışmamızda geliştirilen yöntemin literatür taraması sonucunda diğer çalışmalardan elde edilen LOD değerlerinin karşılaştırılması yapılmıştır (Çizelge 5.1).



Çizelge 5.1. LH tayini için geliştirilen yöntemlerin LOD değerlerine göre karşılaştırılması

Analitik Metod	LOD
CL immunoassay	0.010 IU/L (5.93 fM) [88]
ECL immunoassay	0.100 IU/L (593 fM) [89]
NP etiketli immunoassay	0.0012 IU/L (7.12 fM) [89]
TSH-nanoarray çip	$6.07 \times 10^{-8}$ (360 zM) [89]
Manyetik CL enzim immunoassay	0.2 IU/L (0.5–200 IU/L) [90]
UPLC–MS	0.24 ng/L (0.36 ng/L) [91]
Sandviç immunoassay	0.036 IU/L (0.4–250 IU/L)

CL, chemiluminescence; ECL, electrochemiluminescence

Yöntemin doğruluğunu ve geri kazanım değerlerini hesaplamak için 0.4, 2 ve 10 IU/L derişimlerinde hLH, biorad orijinli kontrol serum örneklerine eklenmiştir. Üç gün aynı koşullarda analiz tekrar edilmiştir. Geri kazanım değerleri sırasıyla %90, %93.5 ve %96.3 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirilen bu yöntemde seçilen antikorun hLH'ı özgün bir şekilde bağlayabildiğini göstermek amacıyla insan serumu matriksinde bulunan benzer epitoplara sahip proteinler (hCG, IgG, hGH) şiddetleri kör sinyal ile yaklaşık değerlerde olduğu, hLH antikorunun spesifik olarak hLH'ı tanıyabildiğini ve diğer proteinlerin hLH tayininde girişim yapmadığı saptanmıştır.

Endojen ve rekombinant hLH ayrımını gösterebilmek için, biorad orijinli insan serum örneğinin bir kısmı doğrudan analiz edilmiştir, ikinci kısmı ise 2 IU/L hLH ile etkileştirilip analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlarda; SERS sinyal şiddetlerinin kullanılan kontrol serumlarından daha yüksek olduğu, bunun sonucunda geliştirilen yöntemin hedef analiti tanımakta seçici ve hassas olduğu gösterilmiştir.

Çalışma kapsamında geliştirilen analiz yönteminin, günümüzde Doping kontrol analizlerinde kullanılan tekniklere kıyasen daha hassas, seçici, hızlı ve düşük maliyetli olduğu gösterilmiştir.

Günümüzde yaygın olarak kullanılan ELISA yönteminde enzim etiketli antikorlar ve ikincil antikorların kullanılması, florometrik yöntemlerde floresans etiketli antikorların kullanılması, maliyet olarak bu çalışmada kullanılan saf monoklonal fare antikorlarından daha yüksek olmaları çalışmamıza büyük bir avantaj sağlamaktadır.

Doping kontrol merkezlerinde protein analizleri için kullanılan LC-MS, ELISA ve jel elektroforez (SDS-PAGE, IEF-PAGE ve SAR-PAGE) teknikleri oldukça fazla kimyasal ve analitik süreç gerektirir.

Jel elektroforez tekniğinde; Yaklaşık 10 mL'lik numuneler 100 µL'ye konsantre edilir. Kullanılacak PVDF membranları önışlemlere tabii tutulur. Ticari jellerden (%10'luk) yürütme işleminin tamamlanması için yaklaşık 3 saat bekleme süresi gereklidir. Semi-Dry Blotting tekniği ile jelden membrana görüntü aktarımının sağlanması için yaklaşık 1 saat bekleme süresi gereklidir. Bir sonraki aşamada ikinci membrana görüntü aktarımının sağlanması için aynı adımlar tekrarlanır. BlotCycler cihazında görüntünün aktarıldığı membranlar önce birincil antikora etkileştirilir, ardından bir gece boyunca ikincil antikor ve Streptavidin HRP ile etkileştirilir. Son olarak CCD kamera görüntüsü alınır. Analiz iki gün içinde tamamlanır.

Sunulan bu çalışma kapsamında geliştirilen yöntemde; sentezlenen nanopartiküllerin modifiye halde hazır bulundurulmaları taktirde antikor ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin sahip olduğu yüksek seçicilikten dolayı hedef analiti tanıyarak tek basamakta (yaklaşık 1 saat bekleme süresi) oldukça düşük miktarlarda (0.4 IU/L) LH'ı insan sıvısı matriksinden uzaklaştırabilmektedir. Bu sayede ön hazırlama, önzenginleştirme ve immünopürifikasyon aşamalarına ihtiyaç duyulmamaktadır. Pasif mikroçip içinde sandviç yapısının oluşumu ve SERS tekniği ile ölçümlerin kaydedilmesi yaklaşık 20 dakika kadar bir süre gerektirir. Analiz iki saatten daha az bir zaman içerisinde tamamlanır.

Elde edilen sonuçlar doğrultusunda, bu çalışmanın ileride ticari olarak üretilebilecek pasif mikroçiplerin uygulanması için bir platform oluşturduğunu ve Doping analizlerinde LH tayini için alternatif bir yöntem olarak uygulanabileceğini öngörmekteyiz.

## 6. KAYNAKLAR

- [1] Tokeshi, M., Minagawa, T., Uchiyama, K., Hibara, A., Sato, K., Hisamoto, H., Kitamori, T., Chemical processing on microchips for analysis, synthesis, and bioassay, *Electrophoresis*, 24(21): p. 3583–3594, **2003**.
- [2] Denizli, A., *Protein Kromatografisi ve Yeni Nesil Polimerik Sistemler*, Ankara: Detay Copy Matbaa Yayıncılık, **2014**.
- [3] WADA prohibited list. [http://www.wadaama.org/Documents/World\\_AntiDoping\\_Program/WADP-Prohibitedlist/2012/WADA\\_Prohibited\\_List\\_2012\\_EN.pdf](http://www.wadaama.org/Documents/World_AntiDoping_Program/WADP-Prohibitedlist/2012/WADA_Prohibited_List_2012_EN.pdf). (Şubat, **2017**)
- [4] E. Griffin, J.D.W., Disorders of the testes and male reproductive tract, in *William Textbook of Endocrinology*, Saunders, Philadelphia 259, **1985**.
- [5] Jelkmann, W. and C. Lundby, Blood doping and its detection, *Blood*, 118(9): p. 2395-404, **2011**.
- [6] Baniukevic, J., et al., Magnetic gold nanoparticles in SERS-based sandwich immunoassay for antigen detection by well oriented antibodies, *Biosensors and Bioelectronics*, 43: p. 281-8, **2013**.
- [7] Champion A., K.P., Surface-enhanced Raman scattering, *Chemical Society Reviews*, 27(4): p. 241-250, **1998**.
- [8] Berg, J.M.T., J. L.; Stryer, L., *Biochemistry*, ed. 5th. New York: W. H. Freeman, **2002**.
- [9] Melmed, S., Polonsky, K.S., Larsen, P.R., Kronenberg, H.M. , *Williams Textbook of Endocrinology*, ed. 12th., Philadelphia, PA: Elsevier Saunders 1920, **2011**.
- [10] Nagirnaja, L., Rull, K., Uuskula, L., Hallast, P., Grigorova, M., Laan, M., Genomics and genetics of gonadotropin beta-subunit genes: unique FSHB and duplicated LHB/CGB loci, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 329(1-2): p. 4-16, **2010**.
- [11] Rahman, N.A., Rao, C.V., Recent progress in luteinizing hormone/human chorionic gonadotrophin hormone research, *Molecular Human Reproduction*, 15(11): p. 703-11, **2009**.
- [12] Lamminen, T., Huhtaniemi, I., A common genetic variant of luteinizing hormone; relation to normal and aberrant pituitary-gonadal function, *European Journal of Pharmacology*, 414(1): p. 1-7, **2001**.
- [13] Haavisto, A.M., Pettersson, K., Bergendahl, M., Virkamaki, A., Huhtaniemi, I., Occurrence and biological properties of a common genetic variant of luteinizing hormone, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 80(4): p. 1257–1263, **1995**.
- [14] Raivio, T., Huhtaniemi, I., Anttila, R., Siimes, M.A., Hagenas, L., Nilsson, C., et al., The role of luteinizing hormone-beta gene polymorphism in the onset and progression of puberty in healthy boys, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 81(9): p. 3278–3282, **1996**.
- [15] Hashad, D., Mohamed, N., Hashad, M.M., Luteinising hormone beta-subunit gene Gly102Ser variant and oxidative stress biomarkers in Egyptian infertile males, *Andrologia*, 44((Suppl. 1)): p. 484–489, **2012**.

- [16] Dahan, M.H., et al., A comparison of outcomes from in vitro fertilization cycles stimulated with either recombinant luteinizing hormone (LH) or human chorionic gonadotropin acting as an LH analogue delivered as human menopausal gonadotropins, in subjects with good or poor ovarian reserve: a retrospective analysis, *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology*, 172: p. 70-3, **2014**.
- [17] Dadoune, J.P., New insights into male gametogenesis: what about the spermatogonial stem cell niche? *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 45(3): p. 141-7, **2007**.
- [18] Reader, S.C., W.R. Robertson, and E. Diczfalusy, Microheterogeneity of luteinizing hormone in pituitary glands from women of pre- and postmenopausal age. *Clinical Endocrinology (Oxford)*, 9(3): p. 355-63, **1983**.
- [19] Lambert, A., et al., Gonadotrophin heterogeneity and biopotency: implications for assisted reproduction, *Molecular Human Reproduction*, 4(7): p. 619-29, **1998**.
- [20] Burgon, P.G., P.G. Stanton, and D.M. Robertson, In vivo bioactivities and clearance patterns of highly purified human luteinizing hormone isoforms, *Endocrinology*, 137(11): p. 4827-36, **1996**.
- [21] Cole, L.A., New discoveries on the biology and detection of human chorionic gonadotropin, *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7: p. 8, **2009**.
- [22] O'Connor, J.F., et al., Tyhe expression of the urinary forms of human luteinizing hormone beta fragment in various populations as assessed by a specific immunoradiometric assay, *Human Reproduction*, 13(4): p. 826-35, **1998**.
- [23] Pettersson, K.S. and J.R. Soderholm, Individual differences in lutropin immunoreactivity revealed by monoclonal antibodies, *Clinical Chemistry*, 37(3): p. 333-40, **1991**.
- [24] Ascoli, M., F. Fanelli, and D.L. Segaloff, The lutropin/choriogonadotropin receptor, a 2002 perspective, *Endocrinology Review*, 23(2): p. 141-74, **2002**.
- [25] Rousseau-Merck, M.F., et al., The chromosomal localization of the human follicle-stimulating hormone receptor gene (FSHR) on 2p21-p16 is similar to that of the luteinizing hormone receptor gene, *Genomics*, 15(1): p. 222-4, **1993**.
- [26] Vassart, G., L. Pardo, and S. Costagliola, A molecular dissection of the glycoprotein hormone receptors, *Trends in Biochemical Sciences*, 29(3): p. 119-26, **2004**.
- [27] O'Brien, P.P., Nanocrystalline Semiconductors: Synthesis, Properties and Perspectives, *Chemistry of Materials*, 13(2): p. 3843-3858, **2001**.
- [28] Terminology for Nanotechnology in *ASTM International*. **2006**.
- [29] Hosokawa, M., Nogi, K., Naito, M., & Yokoyama, T., *Nanoparticle Technology Handbook*, Oxford: Elsevier, **2012**.
- [30] Ramsden, J.J., *Applied Nanotechnology: The Conversation of Research Results to Products*, Burlington: Elsevier Press, **2009**.
- [31] Lewinski N, C.V., Drezek R., Cytotoxicity of nanoparticles, *Small*, 4(1): p. 26-49, **2008**.

- [32] Park HY, S.M., Wang L, Lim S, Njoki PN, Kim SH, et al., Fabrication of Magnetic Core@Shell Fe Oxide@Au Nanoparticles for Interfacial Bioactivity and Bio-separation, *Langmuir*, 23(17): p. 9050-9056, **2007**.
- [33] Sorensen, C.M., *Nanoscale Materials in Chemistry*. John Wiley and Sons, Inc. New York, **2001**.
- [34] Sayar, F., *Mikroemülsiyon Polimerizasyonu Yöntemiyle MMA/AAC/PEG-MA Esaslı Manyetik Nanopartiküllerin Üretimi*, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2004**.
- [35] Schwertmann, U., Cornell, R. M., *Iron Oxides in the Laboratory: Preparation and Characterization*, Weinheim: Wiley-WCH, **2000**.
- [36] Brabers, V., *Handbook of Magnetic Materials*, Vol. 8., Elsevier Science, **1995**.
- [37] Vidal-Vidal J., R.J., Lopez Quintela M.A., Synthesis Of Monodisperse Maghemite Nanoparticles By The Microemulsion Method. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 288(1): p. 44-51, **2006**.
- [38] Sato, H.H., Mechanism of formation of composite CdS-ZnS ultrafine particles. *Industrial & Engineering Chemical Research*, 34(7): p. 2493–2498, **1995**.
- [39] Li, C., Yamai, I., Murase, Y., Kato, E., Formation of acicular monoclinic zirconia particles under hydrothermal conditions, *Journal of the American Ceramic Society*, 72: p. 1479–1480, **1989**.
- [40] Tartaj P., M.M.P., Gonzalez-Carreno T., Veintemillas-Verdaguer S., and S.C. J., Advances In Magnetic Nanoparticles For Biotechnology Applications, *Journal Of Magnetism And Magnetic Materials*, 290-291: p. 28-34, **2005**.
- [41] O. Pana, C.M.T., et al., Structure, morphology and magnetic properties of Fe–Au core-shell nanoparticles, *Surface Science*, 601: p. 4352–4357, **2007**.
- [42] Cui Y., W.Y., Hui W., Zhang Z., Xin X., Chen C., The synthesis of GoldMag nanoparticles and their application for antibody immobilization, *Biomedical Microdevices*, 7(2): p. 153–156, **2005**.
- [43] Lim, I.-I.S., *Molecularly mediated assembly of nanoparticles towards functional nanostructures*, Vol. 69-07, Binghamton, New York: ProQuest Dissertations & Theses, **2008**.
- [44] Mandal M., K.S., Ghosh S. K., Panigrahi S., Sau T. K., Yusuf S.M., Pal T., Magnetite nanoparticles with tunable gold or silver shell, *Journal of Colloid and Interface Science*, 286(1): p. 187–194, **2005**.
- [45] Jafari T., S.A., Khakpash N., Synthesis and cytotoxicity assessment of superparamagnetic iron-gold core-shell nanoparticles coated with polyglycerol, *Journal of Colloid and Interface Science*, 345(1): p. 64–71, **2010**.
- [46] Wang F.H., L.I.H., Holmström N., Yoshitake T., Kim D.K., Muhammed M., Frisen J., Olson L., Spenger C. and Kehr J., Magnetic resonance tracking of nanoparticle labelled neural stem cells in a rat's spinal cord, *Nanotechnology*, 17(8): p. 1911–1915, **2006**.

- [47] Burda, C.C., X.; Narayanan, R.; El-Sayed, M. A., Chemistry and Properties of Nanocrystals of Different Shapes, *Chemical Review*, 105(4): p. 1025–1102, **2005**.
- [48] Cushing, B.L.K., V. L.; O'Connor, C. J., Recent advances in the liquid-phase syntheses of inorganic nanoparticles, *Chemical Review*, 104(9): p. 3893-946, **2004**.
- [49] J. Kimling, M.M., B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, and A. Plech, Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited, *The Journal of Physical Chemistry*, 110(32): p. 15700-15707, **2006**.
- [50] SAYAR, F., *Production of Nanoparticles and their Applications in Nanomedicine*, in Bioengineering, Hacettepe University, Ankara, **2010**.
- [51] Daniel M.C., A.D., Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. *Chemical Review*, 104(1): p. 293-346, **2004**.
- [52] Niazov T., P.V., Xiao Y., Gill R., Willner I., DNAzyme-Functionalized Au Nanoparticles for the Amplified Detection of DNA or Telomerase Activity, *Nano Letters*, 4(9): p. 1683–1687, **2004**.
- [53] Jemere, A.B., Oleschuk R. D., Ouchen F., Fajuyigbe F., Harrison D. J., An integrated solid-phase extraction system for sub-picomolar detection, *Electrophoresis*, 23(20): p. 3537-3544, **2002**.
- [54] Freemantle, M., Chemical analysis and synthesis on microchips promise a variety of potential benefits, *Chemical Engineering News*, 77(8): p. 27–36, **1999**.
- [55] Ambrose, W.P., Goodwin, P. M., Jett, J. H., Orden, A. V., Werner, J. H., Keller, R. A., Single Molecule Fluorescence Spectroscopy at Ambient Temperature, *Chemical Review*, 99(10): p. 2929–2956, **1999**.
- [56] Landers, J.P., *Handbook of Capillary Electrophoresis*, Boca Raton, FL: CRC Press, **1996**.
- [57] Figeys, D., Pinto, D., Lab-on-a-chip: a revolution in biological and medical sciences, *Analytical Chemistry*, 72(9): p. 330A-335A, **2000**.
- [58] Tokeshi, M., Minagawa, T., Uchiyama, K., Hibara, A., Sato, K., Hisamoto, H., Kitamori, T., Continuous-Flow Chemical Processing on a Microchip by Combining Microunit Operations and a Multiphase Flow Network, *Analytical Chemistry*, 74(7): p. 1565–1571, **2002**.
- [59] Ehrfeld, W., Hessel, V., Löwe, H., *Microreactors: New Technology for Modern Chemistry*, Weinheim: Wiley-VCH, **2000**.
- [60] Kikutani, Y., Hibara, A., Uchiyama, K., Hisamoto, H., Tokeshi, M., Kitamori, T., Pile-up glass microreactor, *Lab on a Chip*, 2(4): p. 193-196, **2002**.
- [61] Hibara, A., Tokeshi, M., Uchiyama, K., Hisamoto, H., Kitamori, T., Integrated multilayer flow system on a microchip, *Analytical Sciences*, 17(1): p. 89-93, **2001**.
- [62] Smekal, A., Zur Quantentheorie der Dispersion, *Die Naturwissenschaften*, 11(43): p. 873-875, **1923**.

- [63] Raman, C.V.K., K. S., A new type of secondary radiation, *Nature*, 121(3048): p. 501-502, **1928**.
- [64] Nakamoto, K., *Infrared and Raman Spectra of Inorganic and Coordination Compounds*, 6th ed., New York: John Wiley and Sons, **2009**.
- [65] Ewen Smith, G.D., *Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach*, 224, **2005**.
- [66] M., C., *Characterization, detection and monitoring of harmful substances in food, using Raman spectroscopic techniques*, in Physics, Romania, **2013**.
- [67] Martyshkin D., A.R., Effective Suppression Of Fluorescence Light in Raman Measurements Using Ultrafast Time Gated Charge Coupled Device Camera. *Review Of Scientific Instruments*, 75(3): p. 35294-1178, **2004**.
- [68] Yılmaz, M., *Yüzey Zenginleştirilmiş RAMAN Spektroskopisi (SERS) için nano-yaklaşım temelli platformların geliştirilmesi ve tanı amaçlı uygulanması*, in Bioengineering, Hacettepe University, Ankara, **2014**.
- [69] Başar G., P.U., Şeninak Ş., Günel T., Benian A. and Kalelioğlu İ., Investigation of Preeclampsia Using Raman Spectroscopy, *An International Journal*, 27(4): p. 239-252, **2012**.
- [70] A., S., *Handbook of Solid State Spectroscopy: Applications of Laser Raman Spectroscopy*, ed. 1st., Florida: Kluwer Academic, **2006**.
- [71] Holvarson S., V.P.J. *Raman Spectroscopy*, University of Notre Dame, [https://www3.nd.edu/~kamatlab/facilities\\_spectroscopy.html](https://www3.nd.edu/~kamatlab/facilities_spectroscopy.html) (Şubat, **2017**)
- [72] D.A. Skoog, F.J.H.a.T.A.N., *Principles of Instrumental Analysis*, ed. 5th., Harcourt Brace & Co., **1998**.
- [73] Wahadosszamen M., R.A., Hoque N., Talukder A., Abeedin K., Laser Raman Spectroscopy with Different Excitation Sources and Extension to Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Journal of Spectroscopy*, 2015: p. 1-8, **2014**.
- [74] Li Z., D.M., Kumar S., Selvaganapathy P., Raman Spectroscopy for In-Line Water Quality Monitoring, Instrumentation and Potential, *Sensors*, 14(9): p. 17275- 17303, **2004**.
- [75] Fleischmann M, H.P., McQuillan A., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, Vol. 26, *Chemical Physics Letters*, **1974**.
- [76] M., M., Surface-enhanced spectroscopy, *Reviews of Modern Physics*, 57(3): p. 783-826, **1985**.
- [77] Kneipp K., K.H., Itzkan I., Surface-enhanced Raman scattering and biophysics, *Journal of Physics*, 14(18): p. 597–624, **2002**.
- [78] Man, P.P.F., Mastrangelo, C. H., Burns, M. A., & Burke, D. T. Microfabricated capillarity-driven stop valve and sample injector. *The 11th Annual International Workshop on Micro Electro Mechanical Systems*. **1998**.
- [79] Cho, H., Kim, H.-Y., Kang, J. Y., & Kim, T. S. , How the capillary burst microvalve works, *Journal of Colloid and Interface Science*, 306(2): p. 379–85, **2007**.

- [80] Ogilvie, I.R.G., Sieben, V. J., Floquet, C. F. A., Zmijan, R., Mowlem, M. C. ve Morgan, H., Reduction of surface roughness for optical quality microfluidic devices in PMMA and COC, *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 20(6), **2010**.
- [81] Tamer, U., Gündoğdu, Y., Boyacı, İ.H., Synthesis of magnetic core–shell Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>–Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection, *Journal of Nanoparticle Research*, 12(4): p. 1187–1196, **2010**.
- [82] Tamer, U., et al., Gold-Coated Iron Composite Nanospheres Targeted the Detection of Escherichia coli, *International Journal of Molecular Sciences*, 14(3): p. 6223-40, **2013**.
- [83] Temur, E., et al., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397(4): p. 1595-604, **2010**.
- [84] Doğan Ü., K.E., Çetin D., Suludere Z., Boyacı İ. H., Türkyılmaz C., Ertaş N., Tamer U., Rapid detection of bacteria based on homogenous immunoassay using chitosan modified quantum dots, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 233: p. 369–378, **2016**.
- [85] Selbes, Y.S., et al., Surface-enhanced Raman probe for rapid nanoextraction and detection of erythropoietin in urine, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(29): p. 8447-8456, **2016**.
- [86] Mondal, S. and V. Venkataraman, Novel fluorescence detection technique for non-contact temperature sensing in microchip PCR, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(5): p. 773-7, **2007**.
- [87] Agoston, R., et al., Rapid isolation and detection of erythropoietin in blood plasma by magnetic core gold nanoparticles and portable Raman spectroscopy, *Nanomedicine*, 12(3): p. 633-41, **2016**.
- [88] Ognibene, A., et al., A new modular chemiluminescence immunoassay analyser evaluated, *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 38(3): p. 251-60, **2000**.
- [89] Lee S., K.S.H., Wide-range quantification of human thyroid-stimulating hormone using gold-nano patterned single-molecule sandwich immunoassay chip, *Talanta*, 99: p. 1030–1034, **2012**.
- [90] Xiao, Q., et al., Development of a rapid and sensitive magnetic chemiluminescent enzyme immunoassay for detection of luteinizing hormone in human serum, *Clinical Biochemistry*, 42(13-14): p. 1461-7, **2009**.
- [91] Su, B., et al., In vitro digestion of luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa) using simulated gastric conditions in assessing human food safety, *Food Chemistry*, 192: p. 409-14, **2016**.



## ÖZGEÇMİŞ

### Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Belma Gjergjizi  
Doğum Yeri : Prizren/Kosova  
Medeni Hali : Bekar  
E-posta : belmagjergjizi@gmail.com  
Adresi : Rr. Bajrakli No. 34, Prizren/Kosovë, 20000

### Eğitim

Lise : M.A. College, Natural Sciences, Prizren (2007-2011)  
Lisans : Marmara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, İstanbul (2011-2015)  
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyomühendislik ABD, Ankara (2015-2017)

### Yabancı Dil ve Düzeyi

Arnavutça : Ana Dil  
Türkçe : İleri Düzey  
İngilizce : İleri Düzey  
Sırpça : Başlangıç Düzeyi

### İş Deneyimi

Stajyer : Laboratuvar Stajı, SEGAL Çevre Ölçüm ve Analiz Laboratuvarı, Ankara  
Stajyer : İşletme Stajı, Elvan Gıda San. ve Tic. A.Ş., İstanbul

### Deneyim Alanları -

### Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi -

### Tezden Üretilmiş Yayınlar -

### Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar -



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ  
BİYOMÜHENDİSLİK ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 10/05/2017

Tez Başlığı / Konusu: Poli (Metil Metakrilat) Tabanlı Mikroçip Kullanarak Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi Ölçümüne Dayalı Luteinizan Hormon Tayini

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 67 sayfalık kısmına ilişkin, 10/05/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 2 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dan~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Adı Soyadı: BELMA GJERGJIZI  
Öğrenci No: N14328991  
Anabilim Dalı: BİYOMÜHENDİSLİK  
Programı: -  
Statüsü:  Y.Lisans  Doktora  Bütünleşik Dr.

Tarih ve İmza  
10/05/2017

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Unvan, Ad Soyad, İmza)