

AĞUSTOS 2023

Yüksek Lisans-Kimya

HATİCE ONAT

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PLAZMONİK NANOÇUKURCUKLAR ÜZERİNDE YÜZEYDE
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA DAYALI
PROTEİN TAYİNİ

KİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ

HATİCE ONAT
AĞUSTOS 2023

**PLAZMONİK NANOÇUKURCUKLAR ÜZERİNDE YÜZEYDE
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA DAYALI
PROTEİN TAYİNİ**

Gaziantep Üniversitesi

Kimya

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Prof. Dr. Mehmet KAHRAMAN

Hatice ONAT

Ağustos 2023



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

Hatice ONAT

ABSTRACT
**PROTEIN DETECTION BASED ON SURFACE ENHANCED RAMAN
SCATTERING ON PLASMONIC NANOWELLS**

ONAT, Hatice
M.Sc. in Chemistry
Supervisor: Prof. Dr. Mehmet Kahraman
Agust 2023
50 pages

Qualitative and quantitative analyses of proteins, which are organic macromolecules with various functions in the structure of living things, have an important place today. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) technique, which is among the detection methods of biological and chemical molecules, allows the sensitive, fast, and accurate detection of proteins. By utilizing the plasmonic properties of nanomaterials, Raman scattering can be enhanced, and the detection of proteins can be performed even at low concentrations. Within the scope of this thesis, silver nanoparticles (AgNPs) prepared by the chemical reduction method were mixed with latex microparticles of different sizes and deposited on the glass slide surface by the convective assembly method. Nanowells were obtained by washing latex particles with an organic solvent. Nanowell SERS substrates were characterized by atomic force microscopy (AFM) and scanning electron microscopy (SEM). The SERS activities of the prepared surfaces were determined using 4-aminothiophenol (4-ATP). According to the results obtained, it was determined that the SERS substrate, consisting of nanowells prepared with 1.0 μm latex particles, had the highest SERS activity. SERS spectra of different concentrations of proteins (Avidin, BSA, Cytochrome-C, Hemoglobin, and Lysozyme) were taken on the YZRS substrate with the highest SERS activity, and the lowest detection limit was determined to be 0.1 $\mu\text{g/mL}$. The results showed that proteins can be detected down to low concentrations using SERS substrate prepared with a fast, inexpensive, and simple technique.

Keywords: Convective assembly, AgNPs, Nanowell, SERS, Latex, Protein.

ÖZET
PLAZMONİK NANOÇUKURCUKLAR ÜZERİNDE YÜZEYDE
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA DAYALI PROTEİN
TAYİNİ

ONAT, Hatice
Yüksek Lisans Tezi, Kimya
Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet KAHRAMAN
Ağustos 2023
50 Sayfa

Canlıların yapısında bulunan çeşitli görevlere sahip organik makro moleküllerden olan proteinlerin nitel ve nicel analizleri günümüzde önemli bir yere sahiptir. Biyolojik ve kimyasal moleküllerin tayin yöntemleri arasında yer alan Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) tekniği hassas, hızlı ve doğru bir şekilde proteinlerin tespitine olanak sağlamaktadır. Nanomalzemelerin plazmonik özelliklerinden yararlanılarak Raman saçılması zenginleştirilebilir ve proteinlerin tayini düşük derişimlerde bile gerçekleştirilebilir. Bu tez kapsamında kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlanan gümüş nanoparçacıklar (AgNPs) farklı büyüklüklerdeki lateks mikroparçacıklar ile karıştırılarak iletim derleme yöntemi ile cam lam yüzeyine biriktirildi ve organik çözücü ile yıkanarak nanoçukurcuklar oluşturuldu. Elde edilen nanoçukurcuklardan oluşan YZRS substratları atomik kuvvet mikroskobu (AFM) ve taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile karakterize edildi. Hazırlanan yüzeylerin YZRS aktiviteleri 4-Aminotiyofenol (4-ATP) kullanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlara göre 1,0 µm büyüklüğündeki lateks parçacıkları ile hazırlanan nanoçukurcuklardan oluşan YZRS substratının en yüksek YZRS aktivitesine sahip olduğu belirlendi. En yüksek YZRS aktivitesine sahip YZRS substratı üzerine farklı derişimlerdeki proteinlere (Avidin, BSA, Sitokrom-C, Hemoglobin ve Lizozim) ait YZRS spektrumları alındı ve en düşük tespit sınırının 0,1 µg/mL olduğu belirlendi. Sonuçlar hızlı, ucuz ve basit bir teknik ile hazırlanan YZRS substratı kullanılarak proteinlerin düşük derişimlere kadar tespit edilebileceğini gösterdi.

Anahtar Kelimeler: İletim derleme, AgNPs, Nanoçukurcuk, YZRS, Lateks, Protein.



“Canum aileme”

TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, sayın Prof. Dr. Mehmet KAHRAMAN'a sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Deneyisel çalışmalarım sırasında desteklerini benden esirgemeyen değerli arkadaşım Ayşe Mine SARIDAĞ'a çok teşekkür ederim.

Çalışma süresince beni hep destekleyen ve güvenen tüm aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ABSTRACT	iv
ÖZET.....	v
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER LİSTESİ.....	xiv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
BÖLÜM 1 GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2 GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Nanomalzemeler.....	3
2.1.1 Nanomalzemelerin Üretim Yöntemleri	4
2.1.2 Yukarıdan Aşağıya (Top Down) Üretim Yöntemleri	5
2.1.3 Aşağıdan Yukarıya (Bottom Up) Üretim Yöntemleri	6
2.1.4 Nanomalzemelerin Karakterizasyonu	7
2.2 Raman Spektroskopisi	7
2.2.1 Raman Spektrometre Bileşenleri	10
2.2.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS).....	12
2.2.3 YZRS Substratları.....	13
2.3 Proteinler	15
2.3.1 Protein Yapıları.....	16
2.3.2 Protein Denatürasyonu.....	17
2.3.4 Proteinlerin Saflaştırılması	19
2.5 YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini.....	19
BÖLÜM 3 MATERYALLER VE YÖNTEMLER	23
3.1 Cihazlar	23
3.2 Kimyasallar	23
3.3 AgNPs'nin Sentezlenmesi	24
3.4 Cam Lamların Hazırlanması.....	25

3.5 100X AgNPs Hazırlanması	25
3.6 Farklı Derişimlerde Protein Çözeltilerinin Hazırlanması.....	25
3.7 Lateks ile AgNPs'nin Karıştırılması	25
3.8 İletim Derleme Yöntemi İle Yüzey Hazırlanması.....	26
3.9 Nanoçukurcukların Oluşturulması.....	26
3.10 Hazırlanan Nanoçukurcukların YZRS Aktivitesinin Belirlenmesi	27
3.11 Hazırlanan Nanoçukurcukların Üzerinde YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini	27
BÖLÜM 4 BULGULAR ve TARTIŞMA.....	28
4.1 Gümüş Nanoçukurcukların Hazırlanması ve Karakterizasyonu	28
4.2 Hazırlanan Nanoçukurcukların YZRS'ye Dayalı Etiketsiz Protein Tespitinde Kullanılması.....	35
BÖLÜM 5 SONUÇ.....	44
KAYNAKLAR	46
ÖZGEÇMİŞ.....	50

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 3.1. Kullanılan proteinlerin listesi.....	27
Tablo 4.1 Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri.....	35



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Farklı şekillerdeki gümüş nanoparçacıkların TEM görüntüleri: (A) nanoküreler, (B) nanoprizmalar, (C) nanobarlar ve (D) nanoteller. (E) nanoküpler, (F) piramitler, (G) nanopirinç ve (H) nanoçiçeklerin SEM görüntüleri.....	4
Şekil 2.2 Nanomalzeme sentez yaklaşımı.	5
Şekil 2.3 Nanomalzeme üretim yöntemleri.	6
Şekil 2.4 Rayleigh saçılması ve Stokes ve Anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı.....	8
Şekil 2.5 CO ₂ molekülünün IR ve Raman aktivitelerinin karşılaştırılması[30].	9
Şekil 2.6 Benzoik asidin IR ve Raman spektrumlarının karşılaştırılması[31].....	10
Şekil 2.7 Raman spektroskopisinin ana bileşenleri.	11
Şekil 2.8 Farklı YZRS substratı türlerinin SEM görüntüleri: (A) Küresel altın nanopartikülleri, (B) altın nanoçubuklar, (C)gümüş nanobarlar, (D) gümüş plazmonik nanokubbe dizisi, (E) altın nanokümesi, (F) altın nanodelikler, (G) gümüş nanoboşluklar, (H) gümüş nanosütunlu film ve (I) gümüş nanosütunlar.	13
Şekil 2.9 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının gösterimi..	16
Şekil 2.10 Aminoasitlerin genel yapısı.	18
Şekil 3.1 AgNO ₃ çözeltisinden AgNPs'in sentez aşaması A) AgNO ₃ çözeltisinin kaynama esnasındaki fotoğrafı, B) Sodyum sitrat dihidrat ilavesi sonrasındaki fotoğraf ve C) Elde edilen AgNPs süspansiyonu fotoğrafı.	25
Şekil 3.2 İletim derleme cihazının fotoğrafı ve AgNPs-lateks karışımının cam slayt üzerinde yürütülme fotoğrafı. ...	26
Şekil 4.1 AgNPs ve 1,6µm'lik lateks karışımının yürütme sonrası oluşan nano yüzey fotoğrafı.	29
Şekil 4.2 AgNPs-lateks yüzeylerinin yıkamadan önceki (sol) ve yıkama sonrası (sağ) SEM görüntüleri (10000X büyütme).	30
Şekil 4.3 AgNPs-lateks yüzeylerinin yıkamadan önceki (sol) ve yıkama sonrası (sağ) SEM görüntüleri (30000X büyütme).	31
Şekil 4.4 Farklı büyüklükteki latekslerden elde edilen nanoçukurcukların SEM görüntüleri (20000X).	32
Şekil 4.5 AgNPs-1,6 µm lateks parçacıkların (solda), AgNPs nanoçukurcukların (sağda), 3D AFM görüntüleri.	33
Şekil 4.6 Yıkama öncesi yüzeylerdeki latekslerin yükseklik ve yıkama sonrası oluşan nanoçukurcuklukların 2D derinlik analizi.	34
Şekil 4.7 Proteinlerin hidrodinamik çap grafiği.....	35

Şekil 4.8 Aynı yüzey üzerinde 10 farklı bölgeden alınan YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliği.....	36
Şekil 4.9 Farklı zamanlarda hazırlanmış yüzeylerden elde edilen YZRS spektrumları.	37
Şekil 4.10 Farklı büyüklükteki lateksler ile elde edilen nanoçukurcuk yüzeylerinin 4-ATP inkübasyonu sonrası alınan YZRS spektrumları.	38
Şekil 4.11 YZRS spektrumlarından elde edilen 1077 cm^{-1} 'deki pik şiddetlerinin değişim grafiği.	39
Şekil 4.12 Avidin ve Hemoglobin proteinlerinin YZRS tekrarlanabilirlik spektrumları.	40
Şekil 4.13 Farklı yüzey üzerinde Avidin ve BSA proteinlerinden elde edilen YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliği.	41
Şekil 4.14 Her bir proteine ait YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.	42
Şekil 4.15 Farklı derişimlerde hazırlanan her bir proteine ait YZRS spektrumları.	43

SEMBOLLER LİSTESİ

Ag	Gümüş
Au	Altın
Cu	Bakır
Al	Alüminyum
AgNO₃	Gümüş Nitrat
Rpm	Dakikada devir sayısı (Rotation Per Minute)



KISALTMALAR LİSTESİ

YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi
SERS	Surface-Enhanced Raman Saçılması Spektroskopisi
AFM	Atomik Kuvvet Mikroskopu (Atomic Force Microscope)
IR	İnfrared
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Elektron Microscope)
MS	Kütle Spektroskopisi (Mass Spectroscopy)
	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (High Performanced
HPLC	Liquid Chromatography
FT-IR	Fourier Dönüşüm İnfrared
SDS-PAGE	Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez
EDX	Enerji Dispersif X-Işınları (Energy-Dispersive X-ray)
XRD	X-Işını Kırınımı
UV-Vis	Morötesi-Görünür
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
pI	İzoelektrik Nokta
AgNP	Gümüş nanoparçacık
AgNPs	Gümüş nanoparçacıklar
nm	Nanometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
mg	Miligram
mL	Mililitre
s	Saniye
µL	Mikrolitre
µg	Mikrogram

SiNW	Silikon nanotel
AuNS	Altın nano yıldız
4-ATP	4-Aminotiyofenol (4-Aminothiophenol)



BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Proteinler; enzim, antikor, nükleik asit ve hormon gibi biyolojik sistemlerin çalışmasında önemli bir yere sahip moleküllerdir. Bir kısmı canlı vücudunda sentezlenen proteinlerin bir kısmı ise vücudumuzda sentezlenmediği için dışarıdan besinler aracılığıyla alınmaktadır. Canlılarda yapısal olarak görev alan makro moleküller olan proteinlerin yapı ve miktar tayini diğer moleküllerle olan etkileşimi günümüzde önemli yer tutmaktadır. Protein ile ilgili çalışmaların yürütülebilmesi için ilk olarak proteinlerin bulundukları karışımlardan ayrıştırılması ve saflaştırılması gerekir. Proteinlerin hızlı, hassas ve doğru bir şekilde tayin edilmelerinin yanında düşük derişimlerde ve karmaşık olmayan yöntemlerle tayin edilebilmesi önemlidir.

Proteinlerin bulunduğu ortamdan izole edilmesi ve karakterizasyonunun belirlenmesi çeşitli yöntemler ve teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir. Proteinlerin saflaştırılması; proteinlerin büyüklük/kütle, şekil, çözünürlük, polarite, affinite gibi fiziksel özellikleri dikkate alınarak gerçekleştirilebilir. Proteinleri büyüklük/kütleye göre ayırmada ultrafiltrasyon, jel filtrasyonu kromatografisi, Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektforezi (SDS-PAGE) , yüklerine göre saflaştırma işleminde iyon değişim kromatografisi, izoelektrik fokus, polarite farkından yararlanarak adsorpsiyon kromatografisi, Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) gibi yöntemler kullanılır. Saflaştırılan protein Kütle Spektroskopisi (MS) ile incelenerek parmak izi ile 3 boyutlu yapısı ve protein dizilimi ile ilgili bilgi edinilir.

Proteinlerin yapısının aydınlatılmasında kullanılan kütle spektroskopisi yönteminin yanında titreşimsel spektroskopi yöntemleri olarak bilinen İnfrared (IR) ve Raman spektroskopisi yöntemleri ile ilgili çalışmalar günümüzde önemli yer tutmaktadır.

IR dipol moment değişikliğine bağlı olarak absorpsiyon spektrumu vermektedir. IR ile yapılan çalışmalarda örnek hazırlanması uzun ve zahmetlidir. Ayrıca suyun spektruma girişim yapması ve spektrumların karmaşık olması gibi dezavantajları mevcuttur. Raman spektroskopisinde ise polarite değişimine bağlı olarak enerji absorplayan moleküldeki enerjinin değişmesi sonucunda Raman spektrumu elde edilmektedir.

Raman ölçümlerinde su molekülünde herhangi bir polarite değişimi olmadığı için spektrum oluşmaması ve örnek hazırlanmanın kolay olması gibi avantajlar vardır. Bu gibi avantajları nedeniyle Raman spektroskopisi sulu ortamda bulunan analitleri tayin etmek için kullanım kolaylığı da sağlamaktadır. Ayrıca moleküle özgü parmak izi spektrumları ile biyolojik moleküller ile ilgili bilgilere ulaşılabilir. Avantajlarının yanında Raman spektroskopisinin dezavantajlarından birisi floresansın spektruma girişim yapmasıdır. Bu girişim daha uzun dalga boyuna sahip ve daha az enerjili lazerler kullanılarak giderilmeye çalışılmıştır. Diğer bir dezavantajı ise Raman saçılması zayıf olması nedeniyle düşük şiddetli pikler içeren spektrumların oluşmasına neden olur. Saçılmayı zenginleştirmek için ise plazmonik özelliğe sahip nanomalzemeler kullanılarak Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS) adı verilen teknik geliştirilmiştir. YZRS tekniği için geliştirilen plazmonik nanomalzemeler kullanılarak analitlerin düşük olan Raman şiddeti artırılır. Böylece Raman'ın her analite spesifik parmak izi bölgesi vermesinden faydalanılarak analite ait spesifik spektrumlar elde edilerek analitlerin tanı ve tayini hızlı bir şekilde yapılmaktadır.

Bu tez çalışmasında plazmonik nanoçukurcuklardan elde edilen bir YZRS substratı hazırlandı ve hazırlanan bu substrat ile YZRS'ye dayalı protein tespiti yapıldı. Bu amaç doğrultusunda ilk olarak AgNPs süspansiyonu kimyasal indirgenme tekniği ile hazırlandı ve karakterize edildi. Daha sonra AgNPs'den elde edilen nanoçukurcukları hazırlamak için farklı büyüklüklerdeki her bir lateks ile AgNPs karıştırıldı ve böylece 6 farklı büyüklükte nanoçukurcuk elde etmek için 6 farklı karışım elde edildi. Her bir karışım iletim derleme cihazı ile cam lam yüzeyine düzenli bir şekilde biriktirildi. 6 farklı büyüklüğe sahip lateks-AgNPs karışımı ile elde edilen nanoyüzeyler organik çözücü ile yıkanarak ortamdan lateks parçacıkları uzaklaştırıldı ve böylece AgNPs'den oluşan nanoçukurcuklar hazırlandı. Hazırlanan nanoçukurcuklardan oluşan YZRS substratlarının AFM ve SEM ile karakterizasyonu gerçekleştirildi. Farklı büyüklükteki lateksler ile oluşturulan plazmonik nanoçukurcukların YZRS aktiviteleri 4-ATP ile belirlendi ve en yüksek aktiviteye sahip yüzeyin tekrarlanabilirlik ölçümü gerçekleştirildi. En yüksek YZRS'e aktivitesine sahip nanoçukurcuklardan elde edilen YZRS substratı Avidin, BSA, Sitokrom-C, Hemoglobin ve Lizozim proteinlerinin tayini için kullanıldı ve her bir proteinin tespit edilebilir en düşük derişim sınırı belirlendi.

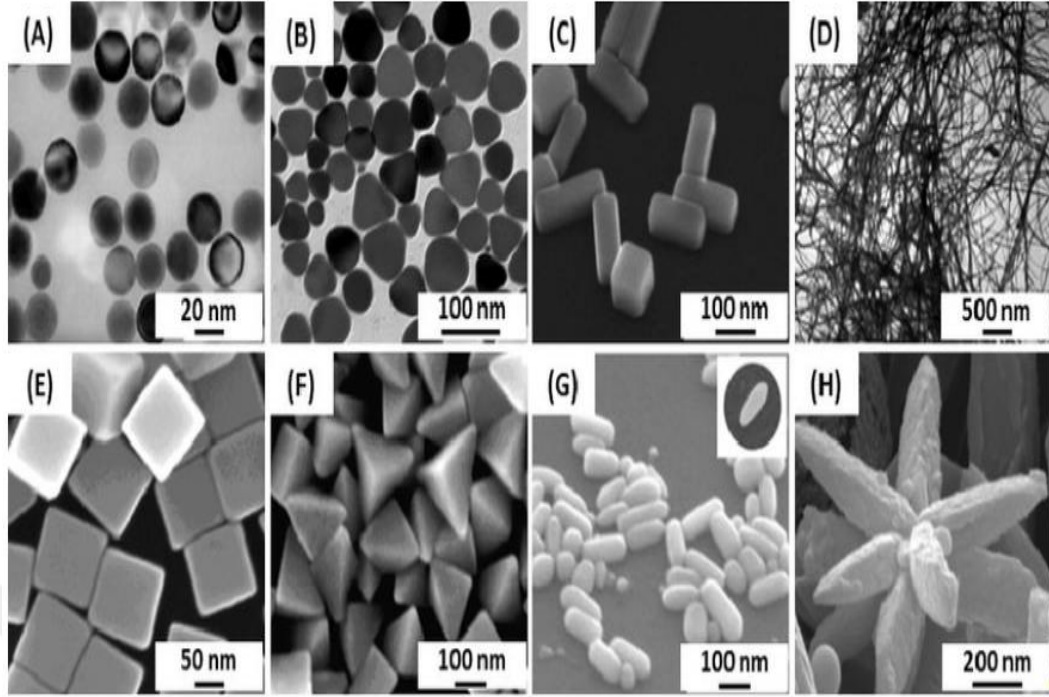
BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Nanomalzemeler

Nano kavramı Yunanca cüce anlamında kullanılır ve 1-100 nm aralığında boyuta sahip maddelere nanoparçacık denir. Nano boyuttaki maddeler makro boyutundaki maddelere kıyasla daha farklı ve yeni özelliklere sahip olmaktadır[1]–[4]. Metrenin milyarda bir kez küçültülmesi sonucunda ortaya çıkan nano boyutundaki maddeler fiziksel, kimyasal, optik ve morfolojik özellikleri bakımından farklı özellik gösterirler[5]–[7]. Nano parçacığın yüzey/hacim oranı değiştirildiğinde özelliklerinde değişimler meydana gelmektedir. Bu yüzden nanoparçacıkları elde ederken partikül boyutunun kontrol edilmesi oldukça önem arz etmektedir[8], [9].

Nanopartiküller farklı bileşim, şekil ve boyutlarda bulunabilirler. Gümüş nanopartikülleri nanoküreler, nanoprizmalar, nanobarlar, nanoteller, nanoküppler, piramitler, nanopirinç ve nanoçiçekler şeklinde bulunabilmektedir. Farklı boyut ve şekillerdeki gümüş nanoparçacıklarının TEM ve SEM görüntüleri Şekil 2.1’de görülmektedir.



Şekil 2.1 Farklı şekillerdeki gümüş nanoparçacıkların TEM görüntüleri: (A) nanoküreler, (B) nanoprizmalar, (C) nanobarlar ve (D) nanoteller. (E) nanoküpler, (F) piramitler, (G) nanopirinç ve (H) nanoçiçeklerin SEM görüntüleri[10].

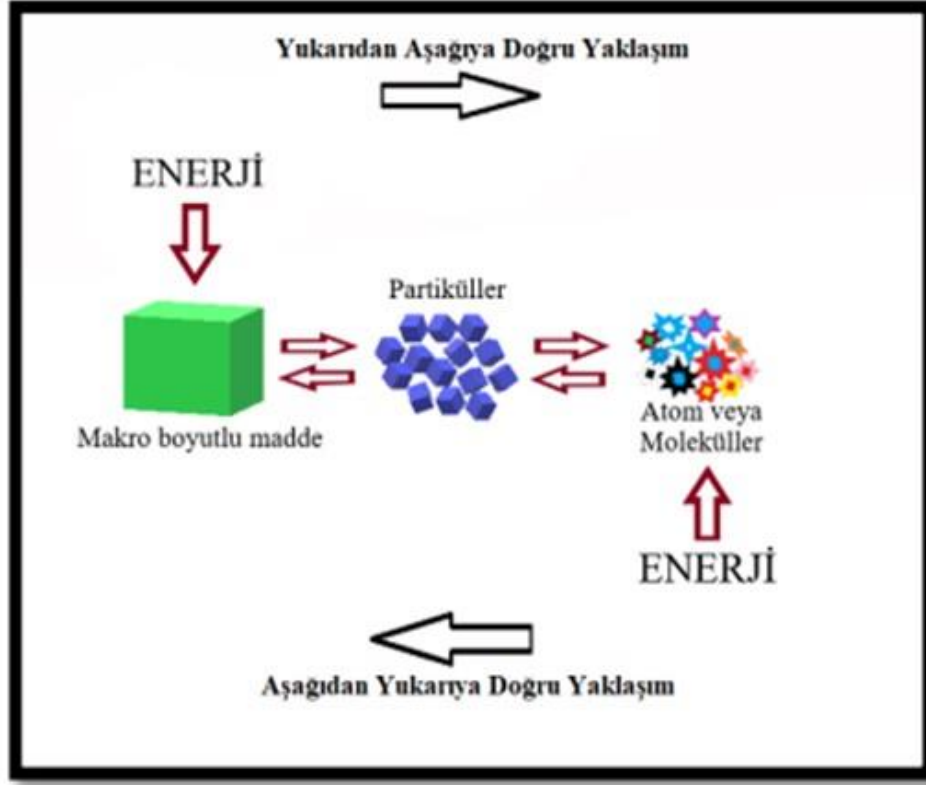
Şekil 2.1’de görüldüğü gibi şeklinin ve boyutunun farklı olması nanoparçacığa farklı özellikler kazandırmaktadır. Bilindiği üzere metal nanoparçacıkların boyutu ve şeklinin farklı olması oluşan yüzey plazmonlarının değişmesi, farklı dalgalı boylarında absorpsiyon yapması gibi bir çok özelliği değiştirmektedir. Ayrıca nanoparçacık cinsi ve bileşimide bu gibi optik özellikleri değiştirmektedir [10].

Hazırlanan nanoparçacıkların yeni özelliklere sahip olması nedeniyle tıp, biyomühendislik, elektronik, tekstil savunma sanayi gibi pek çok kullanım alanları bulunmaktadır. Kozmetikler, kremler, koruyucular, biyosensörler, kendi kendini temizleyen eşyalar, antibakteriyel bandajlar nanomalzemelerin geliştirilmesi sonucu elde edilen ürünlerdir[11]–[14].

2.1.1 Nanomalzemelerin Üretim Yöntemleri

Nanomalzemelerin özelliklerinin ortaya çıkmasında nanoparçacığın bileşimi, cinsi, boyutu, şekili, yüzey/hacim oranı etkin rol oynamaktadır. Nanomalzemelerin özellikleri göz önüne alınarak çeşitli nanomalzeme üretim yöntemleri geliştirilmiştir. Büyük moleküller parçalanıp nano boyutlara indirgenebileceği gibi, atom ve molekül

gibi çok küçük yapılarda bir araya getirilerek nanoparçacıklar oluşturulabilir. Nanomalzeme sentez yaklaşım yöntemleri 2 farklı şekilde gruplandırılmaktadır. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2 Nanomalzeme sentez yaklaşımı[15] .

Şekil 2.2’de görülen nanomalzeme sentezleme yöntemleri makro yapıların; nano boyuta getirildiği yukarıdan aşağıya doğru (top down) yöntemi ve atom ya da moleküllerin bir araya gelirilerek nano yapıların oluşturulduğu aşağıdan yukarıya (bottom up) yöntemi olmak üzere iki grupta incelenir. Ayrıca klasik sentez yöntemlerine ek olarak son yıllarda yeşil sentez yöntemi ile yapılan önemli çalışmalara da yer verilmektedir[16]–[18] .

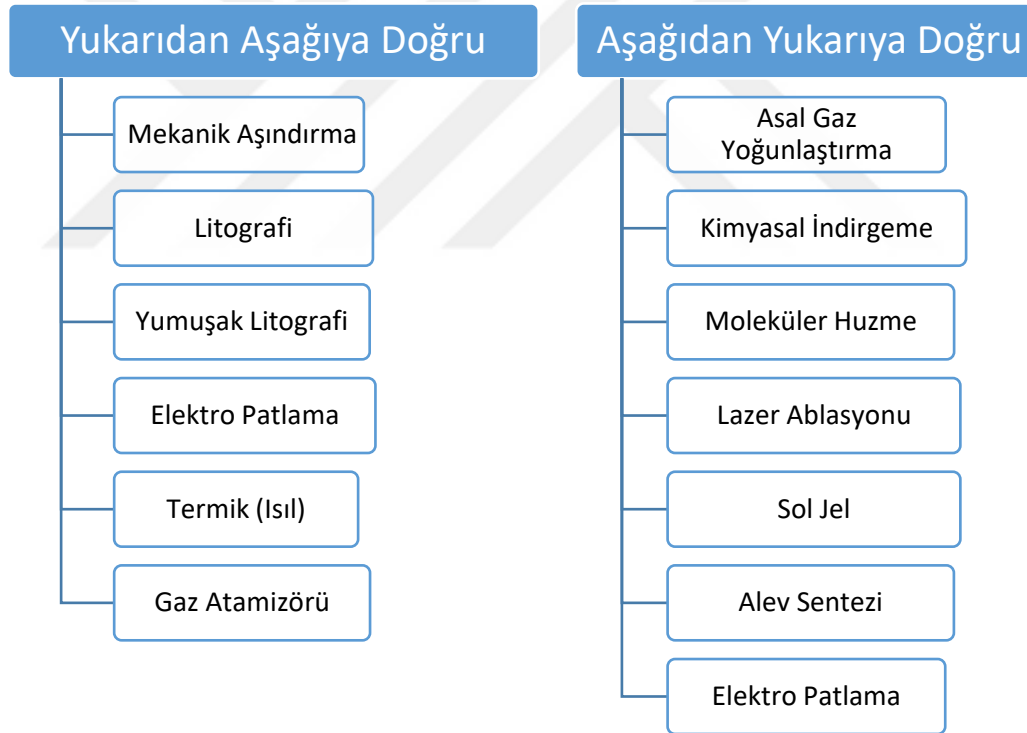
2.1.2 Yukarıdan Aşağıya (Top Down) Üretim Yöntemleri

Yukarıdan aşağıya üretim yöntemi fiziksel üretim yöntemi olarak da adlandırılmaktadır. Dışarıdan uygulanan mekanik ve kimyasal işlemler ile büyük boyutlu malzemeler nano yapıları malzemelere dönüştürülebilir. Bu işlem sırasında çok yüksek miktarda enerji uygulanması, nanomalzemenin ucuz bir şekilde ve fazla

miktarda elde edilememesi bu yöntemin dezavantajlarını ortaya çıkarmaktadır. Yukarıdan aşağıya üretim yöntemleri; mekanik aşındırma, litografi, yumuşak litografi, elektro patlama, termik (ısı) yöntem, gaz atomizörü gibi üretim yöntemlerini içerir[19].

2.1.3 Aşağıdan Yukarıya (Bottom Up) Üretim Yöntemleri

Atom ve moleküllerin bir araya gelerek nano boyuttaki yapıları oluşturduğu nanomalzeme üretim yöntemidir. Kimyasal yöntem olarak da bilinen aşağıdan yukarıya yöntemi ucuz ve kontrol edilebilir bir yöntem olması bakımından oldukça avantajlıdır. Asal gaz yoğunlaştırma, kimyasal indirgeme, moleküler huzme, lazer ablasyonu, sol jel, alev sentezi, kimyasal buhar yoğunlaştırma, atom tabaka çökmesi, yaş kimyasal sentez, elektro patlama aşağıdan yukarıya doğru nanomalzeme sentez yöntemlerini oluşturmaktadır[20].



Şekil 2.3 Nanomalzeme üretim yöntemleri.

Şekil 2.3’deki üretim yöntemleri aynı zamanda biyolojik yöntemler, fiziksel yöntemler ve kimyasal yöntemler olarak da farklı bir şekilde sınıflandırılabilir[17].

2.1.4 Nanomalzemelerin Karakterizasyonu

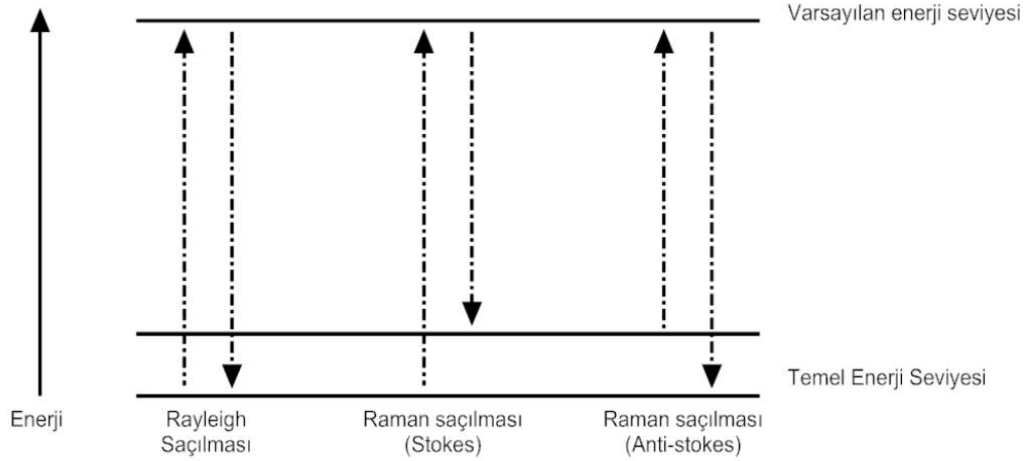
Nanomalzemenlerin üretim aşaması kadar elde edilen nanoparçacığın özelliklerinin ortaya çıkarılması açısından karakterizasyonu da oldukça önemlidir. Nanomalzemelerin incelenen karakterizasyon parametreleri arasında boyut, şekil, yüzey alanı, yüzey yükü, gözeneklilik, çözünürlük, kimyasal bileşimi gibi özellikleri yer alır. Nanomalzemelerin karakterizasyonunda optik, manyetik, elektriksel, fiziksel, kimyasal ve morfolojik özellikler gibi farklı alanlardaki özelliklerin ortaya çıkarılması maddeyi tanımak ve çalışma alanlarını belirlemek için oldukça önemlidir. Karakterizasyon işlemleri için en çok kullanılan araçlar: Morfoloji ve yüzey analizlerinde kullanılan Taramalı elektron mikroskobu (SEM); boyut, şekil, morfoloji, iç yapı gibi analizler için geçirimli elektron mikroskobu (TEM); şekil ve yüzey morfoloji analizinde, atomik kuvvet mikroskobu (AFM); kristal yapı ve faz analizi, ortalama kristalit boyutu analizinde, X-Işını Kırınımı (XRD) ya da Enerji Dispersif X-Işınları (EDX) ve kimyasal kompozisyon analizinde Fourier dönüşüm infrared spektroskopisi (FT-IR) yer almaktadır [19], [21], [22].

Nanomalzeme karakterizasyon teknikleri 4 grupta ele alınabilir. Birinci grup mikroskopi tabanlı karakterizasyon olarak bilinen taramalı elektron mikroskobu, geçirimli elektron mikroskobu, atomik kuvvet mikroskobu ve taramalı tünelleme mikroskobundan oluşur. İkincisi X-ışını ilişkili karakterizasyon teknikleridir. Bu grupta X-ışını kırınımı ve X-ışını fotoelektron spektroskopisi bulunur. Üçüncü grupta ise spektroskopi tabanlı teknikler olan UV-VIS spektrofotometre, Raman spektroskopisi, FTIR spektroskopisi yer almaktadır. Bu 3 grupta yer almayan teknikler diğer teknikler olarak sınıflandırılabilir. Ayrıca nanomalzeme karakterizasyon tekniklerini incelenecek özellik baz alınarak da gruplandırmak mümkündür. Nanoparçacığın boyut ve şekil analizlerinde Taramalı elektron mikroskobu (SEM) ve Zeta-Sizer kullanılır[8], [23] [24] .

2.2 Raman Spektroskopisi

Moleküller üzerine ışık gönderildiğinde moleküle çarpan ışık etkileşmeden geçebilir, soğurulabilir ya da saçılabilir. Saçılan ışığın enerjisinin büyük bir kısmında herhangi bir değişim gözlenmezken çok az kısmının enerjisi ise değişim gösterebilir. Enerjisindeki değişime bağlı olarak ışığın frekansı da aynı oranda değişim gösterir. Gelen ışığın enerjisinin saçılan ışığın enerjisine eşit olduğu saçılma türüne Rayleigh

saçılması adı verilir. Gelen ışığın küçük bir kısmı ise saçılan ışığın enerjisine yani frekansına eşit değildir. Enerjideki farklılığın nedeni enerjinin moleküllerin titreşimine kullanılmış olmasıdır. Milyonda bir gerçekleşen bu elastik olmayan saçılmalara Raman saçılması adı verilir. Raman saçılması Stokes ve Anti Stokes saçılması olarak iki grupta incelenir. Raman ve Rayleigh saçılmalarına ait enerji diyagramı Şekil 2.4 de verilmektedir.

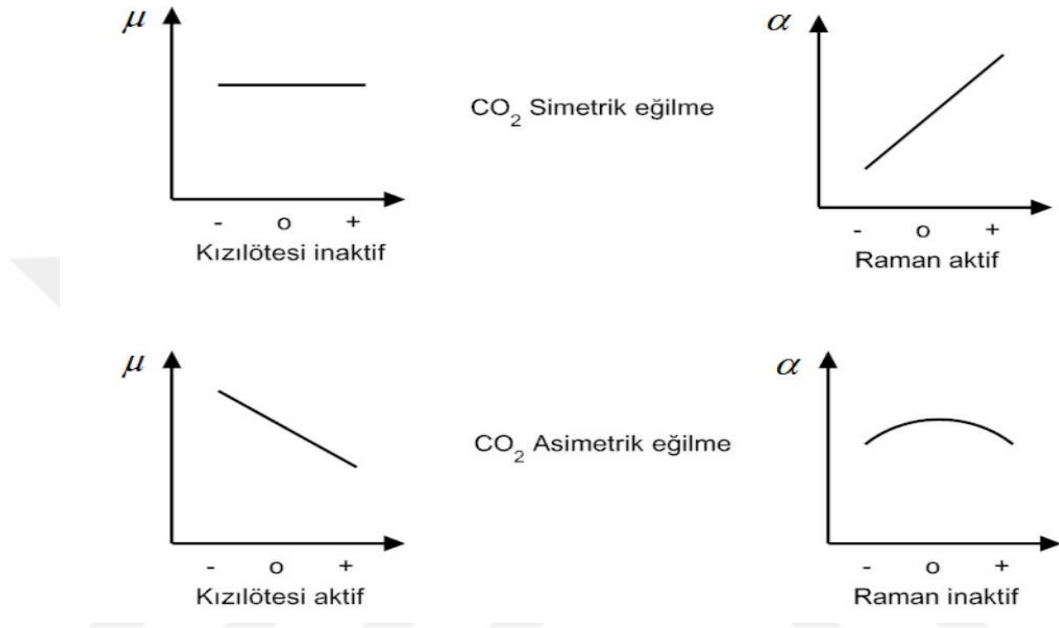


Şekil 2.4 Rayleigh saçılması ve Stokes ve Anti-Stokes türü Raman saçılması olaylarının molekül enerji diyagramı [25] .

Şekil 2.4’de görüldüğü gibi Rayleigh saçılmasında herhangi bir enerji değişimi söz konusu olmaz iken Raman saçılmasının türleri olan Stokes ve Anti-Stokes saçılmalarında net enerji değişimi olmaktadır

Elastik olmayan Raman saçılması ilk kez Hintli bilim insanı C.V Raman tarafından keşfedilmiştir. Raman kendi adıyla bilinen bu saçılma türü ile ilgili yaptığı çalışmalardan dolayı 1930 yılında Nobel fizik ödülünü almıştır. Yayılan ışığın frekansının uyarıcı ışığın frekansından daha küçük olduğu saçılmalara Stokes Saçılması denir. Yayılan ışığın frekansının uyarıcı ışığın frekansında daha büyük olduğu saçılmalara ise Anti-Stokes saçılması adı verilir. Stokes kaymaları pozitif değer alırken Anti-Stokes kaymaları negatif değer alır. Stokes sinyalleri Anti-Stokes sinyallerinden daha şiddetlidir. Bu nedenle spektrumlarda Stokes kısmı kullanılmaktadır. Anti-Stokes saçılmasının oluşma ihtimali çok daha düşüktür. Floresans girişimi yapan saçılmalar için ise daha düşük enerjili oldukları için Anti-Stokes kaymalarının kullanılması daha yararlıdır [26]–[29] .

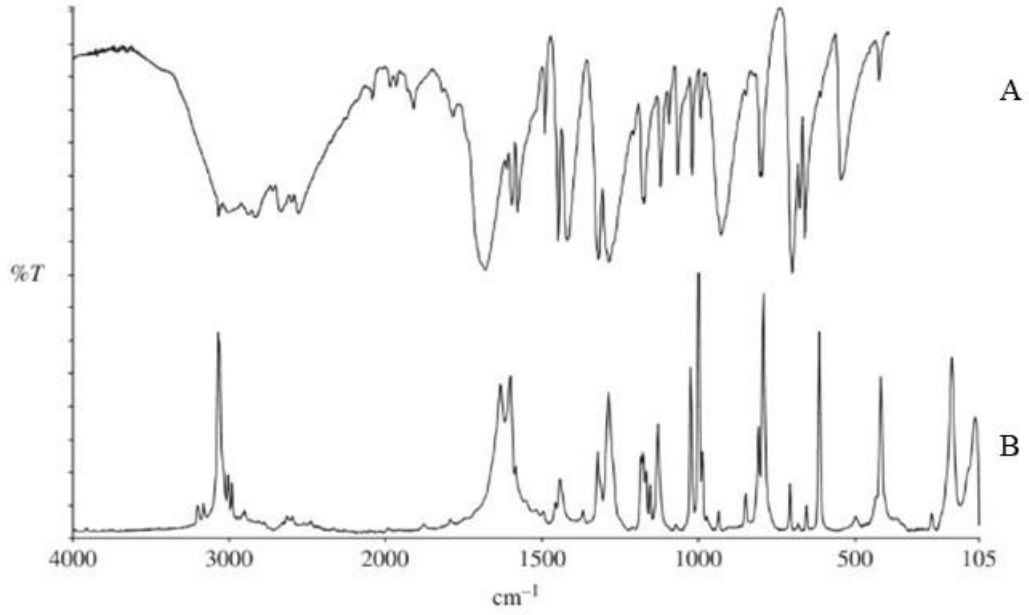
Raman ve IR spektroskopilerinin her ikisi de titreşimsel spektroskopisi çeşidi olsa da çalışma prensipleri ve aktiviteleri birinden farklıdır ve birbirini tamamlayan tekniklerdir. Bir molekül Raman aktif iken IR inaktif ya da IR aktif olan bir molekül Raman inaktif olabilir. Bu farklılığa örnek olarak CO₂ molekülünün Raman ve IR aktiviteleri şekil 2.5'te karşılaştırılmıştır.



Şekil 2.5 CO₂ molekülünün IR ve Raman aktivitelerinin karşılaştırılması [30].

Şekil 2.5'te de görüldüğü üzere molekülün Raman ya da IR aktif olabilmesi o molekülün simetrisi ile ilişkilidir. Simetrik moleküller Raman aktivitesi gösterirken simetrik olmayan moleküller IR aktiftirler.

Raman ve IR birinin tamamlayıcısı titreşimsel spektroskopi yöntemleri olmasından dolayı bir molekülün Raman ve IR spektrumunu oluşturan pikler aynı veya farklı frekansta olabileceği gibi aynı frekansta yer alan piklerin şiddetinde de farklılık olabilir. Şekil 2.6'da benzoik asidin IR ve Raman spektrumlarının karşılaştırılması verilmektedir.

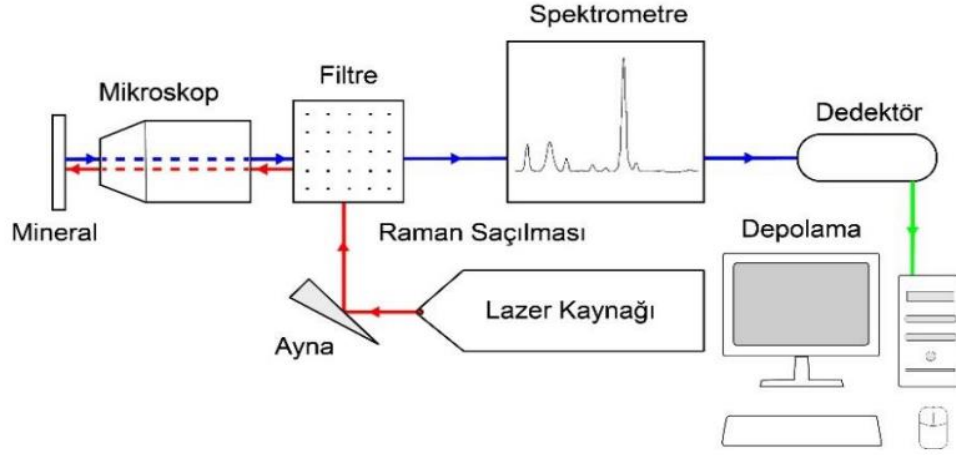


Şekil 2.6 Benzoik asidin A) IR veB) Raman spektrumlarının karşılaştırması[31].

IR spektroskopisi ışığın absorpsiyonuna dayanır. Molekülün dipol momentinde değişim veya bununla ilgili bir yük değişikliğinin gerçekleşmesi gerekir. Raman spektroskopisi ise ışığın saçılması esasına dayanır. Bir moleküldeki bağın etrafındaki elektronların dağılımındaki anlık bozulma ve sonra bağın bozulma öncesi ilk haline geri dönmesi sırasında ışın emisyonu ile ilişkilidir. Elektron dağılımı bozulan molekül, geçici olarak polarizlenir; bir anlık indüklenmiş dipol oluşur. Raman saçılması olarak kabul edilebilmesi için bir molekülün etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi yani geçici dipol momentinin oluşması gerekmektedir. Polarlanabilme sırasında değişim frekansı ile molekülün titreşim frekansının uyumlu olması gerekir[29], [32], [33], [34].

2.2.1 Raman Spektrometre Bileşenleri

Raman spektrometre ışın kaynağı, örnek sistemi, dalga boyu seçici ve dedektör olmak üzere dört ana bileşenden oluşmaktadır. Şekil 2.7’de Raman spektroskopisinin şematize edilmiş şekli görülmektedir.



Şekil 2.7 Raman spektrometresinin ana bileşenleri[35] .

Raman spektroskopisinde, ölçülebilir yeterlilikte şiddete sahip Raman saçılması oluşturulması için gücü yüksek ışın kaynağı olan lazer genellikle tercih edilmektedir. Lazer kısaltılması zorlanmış emisyon ile ışık çoğaltmasından “Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation” açılımının baş harflerinden yararlanılarak türetilmiştir. Lazerler kullanım alanlarına göre farklı dalga boylarında bulunabilir. Dalga boyuna bağlı olarak lazerler UV, görünür bölge ve IR lazerler olmak üzere 3 gruptan oluşur.

Ar ve Kr iyon lazeri 488-636 nm dalga boyu aralığında ışıma yapmaktadır. Ar ve Kr iyon lazerlerinde elektriksel pompalama işlemi ile atomlar iyonlaştırılır, oluşan iyonlar uyarılır ve yüksek akım yoğunlukları kullanılmaktadır. Bu nedenle Ar ve Kr iyon lazerlerinde su ile soğutma ve dayanıklı tüp malzemesi kullanılması gerekmektedir. Gaz lazerlerinden biri de 632.8 nm dalga boyunda sürekli lazer ışıması yapan He-Ne lazeridir. Tüp içerisine yerleştirilen elektrotlar yardımıyla elektriksel olarak bir optik pompalama gerçekleştirilmektedir. He gazının kullanılmasının nedeni optik pompalama verimini artırmaktır. Kızılötesi bölgede lazer türlerine InAs lazeri InSb ve CO₂ lazeri örnek olarak verilmektedir. CO₂ lazeri en güçlü lazerdir ve yaygın kullanıma sahiptir. Ultraviyole bölgede kullanılan çok güçlü lazer ışıması yapan lazerler ise XeF, KrF ve ArF lazerleridir[30], [31], [35].

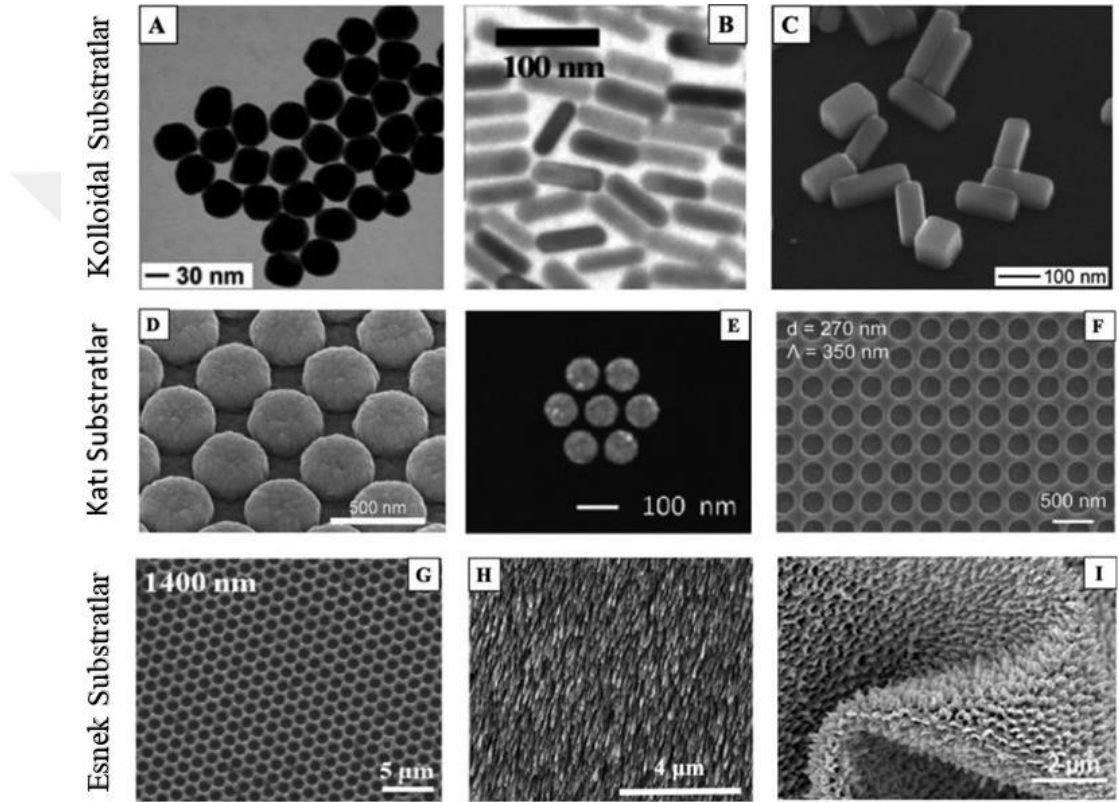
2.2.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS)

Raman saçılması sonucu elde edilen sinyallerin şiddetinin düşük olması Raman spektroskopisi için dezavantaj oluşturmakta ve kullanımını sınırlandırmaktadır. Raman sinyalinin şiddetini arttırabilmek için YZRS tekniği geliştirilmiştir. YZRS tekniğinde gümüş (Ag), altın (Au) gibi metalik bir yüzey oluşturularak ya da bunların çözeltileri kullanılarak Raman sinyalinin şiddeti arttırılabilmektedir. Au, Ag, bakır (Cu) gibi plazmonik nanoyapılar sayesinde zayıf olan Raman saçılmasının şiddetinin arttırılması YZRS olarak tanımlanmaktadır[25], [36], [37]. Fleischman ve arkadaşları Ag yüzeyine damlattıkları piridin molekülünün Raman sinyalinin çok yüksek görüldüğünü farketmesiyle ilk defa YZRS ile ilgili gelişim süreci başlamıştır[38]. Metal yüzey plazmonları kullanılan metalin cinsine boyutuna, şekline ve oluşturduğu dielektrik çevreye göre değişkenlik gösterir[39]. Metal yüzeyi ya da nanopartiküllerin ışık ile uyarılması sonucu yüzey plazmonları uyarıldığı için hedef molekülün etrafındaki elektromanyetik enerji arttırılmakta ve bunun sonucunda Raman saçılmasının şiddeti artmaktadır. Yüzeyde zenginleştirmenin gerçekleştirilebilmesi için molekülün metal yüzeye absorplanmış olması ya da etkileşimin sağlanabileceği kadar yakın olması gerekir.

YZRS tekniğinin oluşturulmasında iki ana mekanizmaya yer verilmektedir. Bu mekanizmalarda birisi elektromanyetik zenginleştirme diğeri ise kimyasal zenginleştirmedir. Elektromanyetik zenginleştirme uygun morfolojideki metal yüzeylerin yüzey plazmonlarının elektromanyetik alan ile zenginleştirilmesiyle oluşur. Zenginleştirme yüzey plazmonları sayesinde metalik nanoyapılar etrafında lokalize olmuş elektromanyetik alan mekanizmasından kaynaklanır. Raman saçılmasına uğrayan ışın yoğun elektromanyetik alan ile karşılaştığında indüklenmiş dipol moment büyüklüğünün artmasından dolayı Raman saçılmasının şiddeti de artar. Kimyasal zenginleştirmede metal ve moleküller arasında yük transferi gerçekleştirilir. Metal yüzeye adsorpsiyon sonucu molekülün elektronik yapısında meydana gelen değişimler sonucu kimyasal zenginleştirme gerçekleştirilir. Metal yapı üzerine absorbe edilen analit molekülü ile metal nanoyapılar arasındaki elektronik geçişler sayesinde gerçekleşir. Elektromanyetik zenginleştirmenin etkisi kimyasal zenginleştirmenin etkisinden daha büyüktür. Zenginleştirme faktörü genellikle 10^4 - 10^8 arasında iken tek bir molekülün tayininde zenginleştirme faktörü 10^{14} de ulaşabilmektedir[40], [41].

2.2.3 YZRS Substratları

Yüzey zenginleştirme amacıyla kullanılan yapılar YZRS substratı olarak adlandırılır. YZRS substratları temelde katı, kolloidal ve esnek substratlar olarak gruplandırılabilir. Şekil 2.8’de farklı substrat çeşitlerine ait SEM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 2.8 Farklı YZRS substrat türlerinin SEM görüntüleri. (A) Küresel altın nanopartiküller, (B) altın nanoçubuklar, (C) gümüş nanobarlar, (D) gümüş plazmonik nanokubbe dizisi, (E) altın nanokümesi, (F) altın nanodelikler, (G) gümüş nanoboşluklar, (H) gümüş nanosütunlu film ve (I) gümüş nano sütunlar [42].

Şekil 2.8’de görüldüğü gibi altın ve gümüşten elde edilmiş şekil ve boyutu birbirinden farklı olan katı, sıvı ve esnek YZRS substratlarına ait örnekler verilmektedir. Katı substratlar olarak Au, Ag, Cu, Alüminyum (Al) gibi metaller kullanılmaktadır. Bu metaller UV bölgesinde plazmonik özellik göstermektedir. Günümüzde Ag ve Au gibi

soy ve yarısoy metaller düşük oksidasyon ve yüksek zenginleştirme faktörleri nedeniyle yaygın olarak tercih edilmektedir. Al ve Cu metallerinin ucuz olması gibi avantajlarının yanında yüksek oksidasyon ve düşük zenginleştirme faktörüne sahip olma gibi dezavantajları vardır. YZRS substratlarının ikinci grubunu ise kolloidal süspansiyonlar oluşturmaktadır. Kolloidal süspansiyonların YZRS zenginleştirme faktörünün yüksek olması ve kolay hazırlanması gibi avantajları vardır. Kullanılan nanopartiküllerin yüzey yükü ile molekülün yüzey yükü yüzeyler arası etkileşimden dolayı çok önemlidir. Kolloidal nanopartikül ile etkileşen analiz edilen molekülün yükü zıt olduğunda YZRS zenginleştirme faktöründe artma görülmektedir. NP agresyonu olduğunda sıcak nokta oluşumunun artmasıyla YZRS zenginleştirme faktörü artmaktadır. Fakat çok büyük yığınlar elektron bulutunun bozulması sonucu sönümleme yapmakta ve YZRS aktivitesini azaltmaktadır. Diğer substrat çeşidi ise esnek substratlardır. Kağıt ve polimerden elde edilen esnek substratlar ise mekanik olarak esnektir ve maliyetleri düşüktür. Bu nedenle esnek YZRS substratları, düşük maliyetli sensörler olarak tıbbi ve endüstriyel alanlarda kullanılmaktadır. Esnek substratların plazmonik özellikleri nanoparçacıkların şekil ve boyutunun değiştirilerek ayarlanmasının yanı sıra mekanik olarak bükülmesi ve gerilmesi sonucu da ayarlanabilir[42].

YZRS teknolojisinin geliştirilmesinde ve uygulanmasında YZRS substratlarının hazırlanmasının önemi büyüktür. Son yapılan çalışmalarda YZRS substratları mikroakışkan çiplere entegre edilerek biyokimyasal analizlerde kullanılmasını sağlayan mikroakışkan YZRS çipleri geliştirilmiştir. Sensör algılama, biyolojik moleküllerin tanı ve tayini, sahtelik önleyici barkodlarda çoklu molekül tayini için sensör üretimi gibi geniş kullanım alanlarına sahiptir.

Lokalize yüzey plazmon rezonansının neden olduğu elektromanyetik alanın yoğunlaştığı lokalize bölgelere sıcak noktalar denir[37]. Sıcak noktalar YZRS aktivitesini arttırarak YZRS sinyalinde artışa neden olur. Sıcak noktaların gelişimi üç grupta incelenebilir. Birinci grup sıcak noktalar tek bir geometri nanoyapılara sahip metal nanopartiküllerden oluşmaktadır. Çubuk altın nanopartiküller, yıldız altın nanopartiküller, küre altın nanopartiküller birinci grupta yer almaktadır. İkinci grup YZRS sıcak noktaları nanoparçacık dimerleri, nanodesenli yüzeylerde nanoboşluklar gibi birleşmiş nanoyapılardan veya nanoparçacık dizilerinden oluşmaktadır. Elde

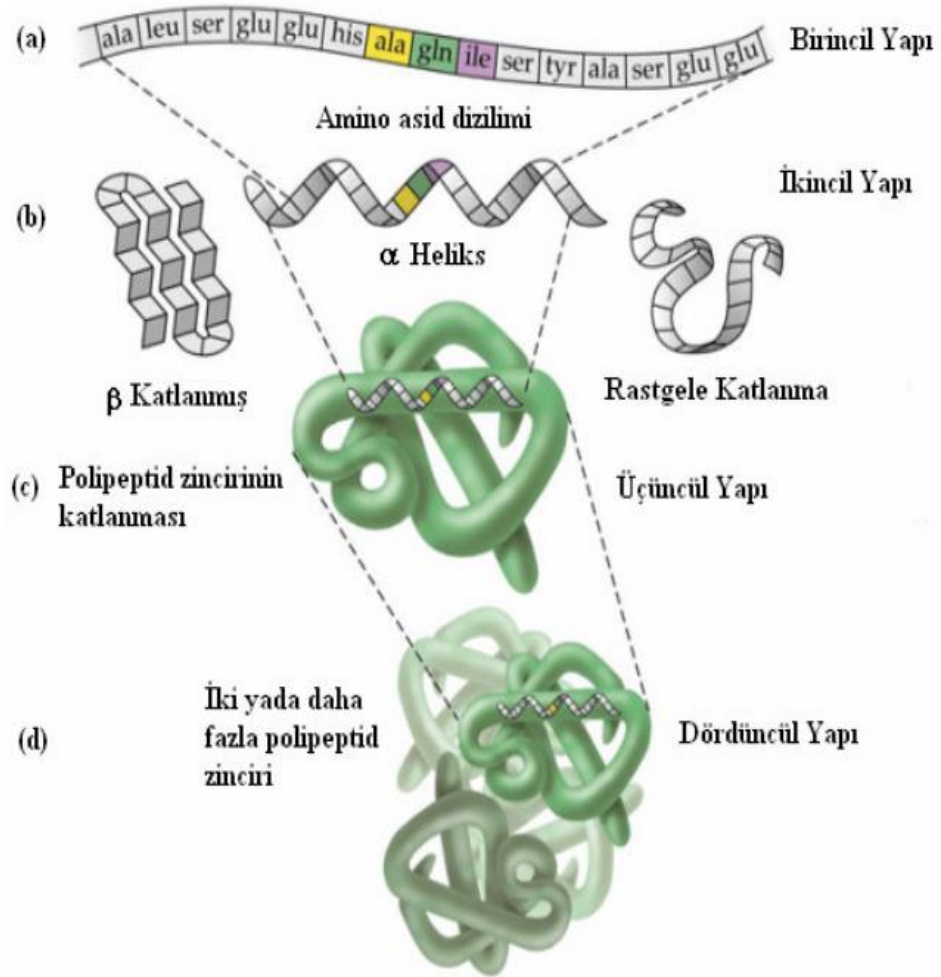
edilen YZRS sinyal yoğunluğu, birinci nesilden 2-4 kat daha büyük olabilir. Nano-sütun dizileri, SHINERS dizileri ve nanoküre litografi (NSL) dizilerinin tümü üçüncü grup YZRS substratlarına örnektir[39], [43]–[45] .

2.3 Proteinler

Proteinler 20 çeşit aminoasitten meydana gelmiş biyolojik polimerlerdir. Canlı organizmalarda farklı görev ve işlemlerde yer alırlar. Hormonların yapısı, taşıma ve depolama, mekanik destek, sinir uyarımı ve iletimi enzimatik katalizleme gibi farklı biyolojik görevleri vardır. Proteinlerin molekül ağırlıkları 10000 ila birkaç milyon dalton arasındadır. Proteinlerin yapı ve görevlerinin farklı olmasının nedeni aminoasit dizilimlerinin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Proteini meydana getiren amino asitler arasındaki bağa peptit bağı denir.

2.3.1 Protein Yapıları

Proteinlerin yapısı dört seviye de incelenir; birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapı (Şekil 2.9)[46], [47].



Şekil 2.9 Proteinlerin birincil, ikincil, üçüncül ve dördüncül yapılarının gösterimi[48].

Her bir protein Şekil 2.9’da görüldüğü gibi temel amino asit dizilimini gösteren primer yapı ile başlar bunu sırası ile ikincil üçüncül ve dördüncül yapılar takip ederek bilinen protein yapısı meydana gelmektedir (Şekil 2.9).

Primer (Birincil) yapı; bir proteindeki doğrusal amino asitlerin dizilişini ifade eder ve proteinin omurgasını oluşturur. Bu yapı DNA’daki baz dizilişi tarafından şifrelenir.

Sekonder (İkincil) yapı; Aminoasitlerin temel bileşenleri olan amin ve karboksil grupları arasındaki hidrojen bağlarından oluşan yapılardır. Sekonder yapıda α -heliks veya β -levha yapıları oluşur.

Tersiyer (Üçüncül) yapı; doğrusal yapıda birbirinden uzak noktalardaki amino asitler arasındaki sterik etkileşimlerden kaynaklanır. Amino asit dizisinin katlanmış üç boyutlu yapısını ifade eder. Proteinin aktif bölgesini oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik yoktur. Zayıf etkileşimler bu yapının oluşumunda rol oynar. Disülfid bağı tersiyer yapıyı daha kararlı hale getirir.

Kuaterner (Dördüncül) yapı; Bazı proteinler birden fazla polipeptid zincirine sahiptir. Birden fazla polipeptid zincirine sahip olan proteinlerde kuaterner yapıya rastlanır[47], [49].

2.3.2 Protein Denatürasyonu

Proteinlerin sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılarının bozulmasına ve aktivasyonun kaybolmasına denatürasyon denir. Protein denatürasyonuna neden olan etkenler kısaca şu şekildedir.

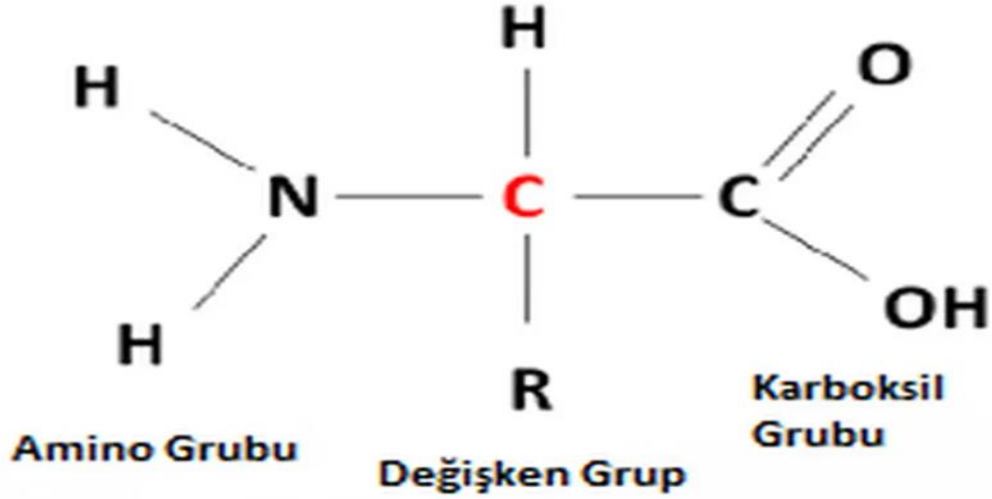
Sıcaklık: Proteinler 50-60 °C'den yüksek sıcaklıklarda denatüre olmaktadır.

pH: Ortamın kuvvetli asidik ya da kuvvetli bazik olması proteinlerin denatüre olmasına sebep olmaktadır. Genel olarak proteinlerde pH 4'ün altında ve pH 10'un üzerinde denatürasyon görülmektedir.

Organik çözücüler: Proteinler alkol, aseton ve eter gibi organik çözücülerle etkileştirildiklerinde denatüre olmaktadır.

Ağır metaller: Arsenik, gümüş, alüminyum, civa, çinko, kadmiyum, krom, kurşun, altın ve nikel gibi metaller ağır metal olarak bilinir. Ağır metallerin biyolojik olarak bir önemleri olmadığı gibi ve bu metallerin toksik etkileri söz konusudur[50]–[52].

Proteinlerin monomerleri aminoasitlerdir. Aminoasitler yapısında karboksil grubu ($-\text{COOH}$), amino grubu ($-\text{NH}_2$), ve yan grup ($-\text{R}$) grup taşır. Aminoasitlerin birbirine bağlanması sonucu bir kovalent bağ olan peptid bağı oluşur. Şekil 2.10'de aminoasitlerin yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2.10 Aminoasitlerin genel yapısı[53].

Şekil 2.10'da temel amino asit yapısında verilen değişken grubun farklı olmasından kaynaklanan 20 çeşit aminoasitin varlığı bilinmektedir. Bu aminoasitlerin ışık absorplama özelliklerinden yararlanılarak proteinlerin tayini için spektrofotometrik yöntemler kullanılabilir. Fakat aminoasitler görünür bölgede ışığı absorplamaz ve bütün aminoasitler 220 nm'den düşük dalga boylarında absorpsiyon verirler. Bunun yanı sıra aminoasit çeşidi olan tirozin ise ışığı 280 nm'de absorplamaktadır. Proteinlerin birçoğu tirozin aminoasiti içerdiğinden 280 nm'de ölçüm ile proteinlerin analizi gerçekleştirilmektedir [54], [55] [44].

Aminoasitler yapısal olarak asidik ya da bazik yapıda bulunabilirler. Asidik aminoasitlerin pH'ları 7'den küçük iken bazik aminoasitlerin pH değerleri 7'den büyüktür. Proteinler ortamın pH değerine göre farklı yüklere sahip olabilir. Proteinlerin yüklerini belirleyen, proteinlere özgü olarak farklılık gösteren ve proteinin nötr halde bulunduğu pH değerine izoelektrik nokta (pI) denir. Asidik özellik gösteren amino asitlerin pI değeri düşük iken bazik özellik gösteren aminoasitlerin ise pI değeri yüksektir. Proteinler pI'ya bağlı olarak negatif yüklü, pozitif yüklü ya da nötr halde bulunabilirler. Proteinlerin yükü elektrik alandaki hareketlerini etkiler. Proteinler İzoelektrik pH'nın üzerinde negatif yüklüdür, elektrik alanında hareketleri anoda doğrudur. İzoelektrik pH'ı nın altında proteinin yükü pozitif olup elektrik alanda hareketi katoda doğrudur [52].

2.3.4 Proteinlerin Saflaştırılması

Protein saflaştırılmasında kullanılan pek çok yöntem vardır. Saflaştırma verimin yüksek olması için proteine uygun saflaştırma yöntemi seçilmesi gerekir. Saflaştırma işlemi sonucunda elde edilen protein seyreltik halde bulunduğundan saflaştırma işlemi sonucunda örneğe deriştirme işlemi uygulanır. Protein saflaştırması için uygulanan yöntemler aşağıda verilmiştir[54], [55].

1. Kromatografik Yöntemler

- a. Jel Filtrasyonu
- b. İyon değıştirici kromatografisi
- c. Affinite kromatografisi

2. Elektroforetik Yöntemler

- a. Elektroforez
- b. İzoelektrik fokuslama

3. Santrifügasyon Yöntemleri

- a. Densiti gradient (zonal) santrifügasyon
- b. Differansiyel santrifügasyon

4. Dializ ve Ultrafiltrasyon

2.5 YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini

YZRS biyolojik ve biyolojik olmayan moleküllerin nitel ve nicel analizlerinde yaygın olarak kullanılabilmesi nedeniyle yaygın bir çalışma alanına sahiptir. Günlük hayatımızda tükettiğimiz gıdaların güvenilirliği için YZRS yaygın olarak kullanılmaktadır. Gıda analizlerinde biyomoleküllerin katı maddelerin, enzim ve bulaşan madde miktarlarının belirlenebilmesi için YZRS temelli çalışmalar yapılmıştır. Yapılan bir çalışmada YZRS substratı olarak kullanılmak üzere koloidal özellikte çubuk şeklinde altın nanopartiküller (Au-NRs) ve küresel şekilli gümüş nanopartiküller (AgNPs) sentezlenmiştir. Koloidal haldeki nanopartiküllerin süspansiyonları ve altın kaplı cam yüzeyler üzerine nanopartiküllerin toplanması sonucunda üç farklı özellikte YZRS temelli platformlar oluşturulmuştur. Bu platformlar Au-NRs, AgNPs ve Au-AgNPs olarak adlandırılmıştır. Raman aktif işaretçi boya molekülleri kullanılarak askorbik asit tayini, kafein, yapay

tatlandırıcıların kantitatif tayini ve E.coli sayısının belirlenmesi için YZRS temelli platformlar oluşturulmuştur[69].

Aynı zamanda YZRS'nin en yaygın kullanım alanlarından bir tanesi protein analizleridir. Proteinlerin hızlı ve hassas analizi, hastalıkların teşhisi ve ilaç etkinliklerinin araştırılması, tedavi sürecinin izlenmesi ve biyomedikal çalışmalarda yeni protein biyobelirteçlerinin keşfi için kritik öneme sahiptir. Proteinlerin tespiti için kütle spektroskopisi, immuneassay gibi pek çok analitik yöntemler kullanılmaktadır. Ancak, bu yöntemler yavaş, pahalı ve karmaşıktır. Proteinlerin hızlı, hassas ve düşük derişimlerde bile tayini için spektroskopik yöntemlerin kullanımı önemli bir araştırma konusudur[56], [57] .

YZRS'ye dayalı protein analizlerinde kullanılan yöntemler etiketli (spesifik) ve etiketsiz (spesifik olmayan) olarak iki grupta incelenmektedir. Etiketli yöntemde proteinlerin etkileşim sağlayacağı hedefleyici ajanlar olan aptamerler veya antikorlar kullanılmaktadır. Etiket olarak kullanılacak hedefleme ajanları nanometalik parçacıkların yüzeyine kovalent olarak bağlanmaktadır. Hedefleme ajanı ve proteinler arasında bağlanma gerçekleştiğinde spektrumdaki değişiklik moleküllerin varlığını ifade etmektedir. Etiketsiz yöntemlerde moleküller doğrudan substrat ile etkileştirilerek molekülün titreşim düzeylerindeki enerjileri parmak izi yöntemi ile analiz edilmektedir. Bu titreşim enerjilerine ait sinyalleri arttırmak için kullanılan proteinlerin etiketsiz yöntemlerle analizi, düşük maliyet, minimum numune hazırlama süresi ve kimyasal etiketlemenin olası yan etkilerinin olmaması gibi avantajlar sunmaktadır. Literatürde etiketli ve etiketsiz yöntemle ait pek çok çalışma yer almaktadır [58]–[61].

YZRS 'ye bağlı protein tanı ve tayini ile ilgili literatürde geniş kapsamda araştırma bulunmaktadır. Protein ekspresyon seviyelerindeki ve protein yapısındaki değişiklikler YZRS ile protein miktarındaki değişimlerden belirlenerek çeşitli hastalıkların teşhisinde ve tedavi sürecinin izlenmesinde kullanılabilmektedir[62].

Bir çalışmada da A β (1-42) oligomerlerinin ve Tau protteinlerinin tespiti Alzheimer Hastalığının teşhisinde önemli yer tutmaktadır. Bu proteinlerin tayini polyA aptamer-AuNP'LER (Paapt-AuNP'ler) konjulatları kullanılarak çok kısa sürede YZRS ile gerçekleştirilmektedir[64]. Alzheimer Hastalığı gibi YZRS kanser hastalıklarının

teşhisinde ve tedavisinde de kullanılmaktadır. Yapılan bir çalışmada 50 nm boyutundaki küresel AuNP'ler ovaryum kanser ilaç direncinin araştırılmasında YZRS substratı olarak kullanılmıştır. Cis duyarlı A2780 ve A2780 cis dirençli hücre hatlarının spektrumları incelendiğinde %84 doğruluk oranı ile ayırt edilebildiği görülmüştür[65] .

Yapılan başka bir çalışmada ise Prostat spesifik antijeni (PSA) tespitinde aptasensör olarak AgNP'ler ve silikon nanoteller kullanılarak substrat oluşturulmuştur. Gümüş nanoteller SiNW'ler varlığında amid bağlarından kaynaklanan YZRS titreşim modları incelenerek PSA proteinin tespiti gerçekleştirilmiştir [66].

Etiketsiz yöntemlerin yanı sıra etiketli yöntemlerde analizlerde kullanılmaktadır. Nanoetiketler kullanılarak kanserli hücrelerdeki trozin fosforilasyonu YZRS kullanılarak incelenmiştir. Fosfotirozini spesifik olarak ayırt edebilen YZRS nanotagları fosfotirozini diğer fosfat içeren türlerden ayırt etmede kullanılmaktadır. Etiketli yöntemler proteinlerin bağlanma bölgeleri ilaç keşfi ve geliştirilmesinde de önemlidir. Yapılan çalışmalarda peptit karışımlarının karmaşıklığı çalışmaları güçleştirmektedir. Protein bölgelerinin bağlanma yerlerinin tespit edilmesi için alkin etiketli Raman taraması kullanılabilir. Alkin ile etiketlenen küçük moleküller proteinlerle kovalent bağ oluşturur. Alkin etiketli peptitler gümüş nanopartikülleri kullanılarak YZRS ile tespit edilmiş ve MS/MS'ye gönderilerek bağlanma yerleri tespit edilmiştir. Yapılan çalışmada sistein proteaz katepsin B'deki inhibitör bağlanma bölgesi belirlenmiştir[67].

Etiketli YZRS tespiti antikor gibi ajanlar kullanılması gerektiği için pahalı bir yöntemdir. Yapılan bir çalışmalarda protein tespitinde antikor kullanımı yerine polidopamin baskılı dış katmandan oluşan moleküler olarak dengelenmiş polimerler (MIP) yapay reseptörler olarak kullanılmıştır. Midyeden ilham alınarak yapılan modelde hedef protein ile polimer arasındaki reaksiyon YZRS aktif substratın akışının bloke edilmesi sonucu gerçekleşir[68] .

YZRS aynı zamanda sağlık problemlerinin oluşumunu engellemek amacıyla protein sentez mekanizmasının aydınlatılması ve protein sentezinin durulması gibi amaçlarla da kullanılmaktadır. Sitotoksin bir protein olan abrin en zehirli bitki proteinlerinden biridir. Protein sentez mekanizmasını geri dönüşümsüz olarak etkileyen abrin

proteinin insan için öldürücü miktarı 0.1–1 µg/kg olarak bilinmektedir. 70-80 nm AuNS'ler YZRS substratları olarak tiyolatlı polietilen glikol (mPEG-SH) ve hücreye nüfuz eden peptit (TAT) ile modifiye edilmiş ve etiketsiz Raman geliştirme substratları olarak kullanılmıştır. Abrin kaynaklı hücre hasarlarını tespit etmek için farklı zamanlarda (0 saat, 2 saat, 4 saat, 8 saat, 12 saat ve 24 saat) Raman spektrumları alınmıştır. Farklı zamanlardaki spektral farklılıkları kullanılarak hücre içindeki maddelerin miktarlarındaki değişim tespit edilmiştir[68].



BÖLÜM 3

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1 Cihazlar

İletim-Derleme Düzenegi (PI)

Saf Su Cihazı (Millipore)

pH metre (WTW)

Terazi (A&D Company Limited)

Sonikatör (Wise Clean)

Vorteks (DZG Science)

Santrifüj (Nuve NF 400)

Atomik Kuvvet Mikroskoku (Park System XE-100E)

Raman Spektrometre (Renishaw İnvia)

UV/Görünür Bölge Spektrofotometre (Termo Scientific- Evolution 201)

Zetasizer (Malvern Nano ZS)

3.2 Kimyasallar

Sülfat Lateks Parçacıklar (İn Vitrogen)

Gümüş nitrat (AgNO_3) (Sigma-Aldrich)

Potasyum dikromat K_2CrO_4 (Sigma-Aldrich)

Sülfürik asit H_2SO_4 (Tekkim)

Sodyum sitrat dihidrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (Merck)

Kloroform CHCl_3 (Isolab)

Diklorometan CH_2Cl_2 (Sigma-Aldrich)

Toluen C_7H_8 (Sigma-Aldrich)

4-aminotiyofenol (4-ATP) (Sigma-Aldrich)

Avidin (Sigma-Aldrich)

Sığır Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)

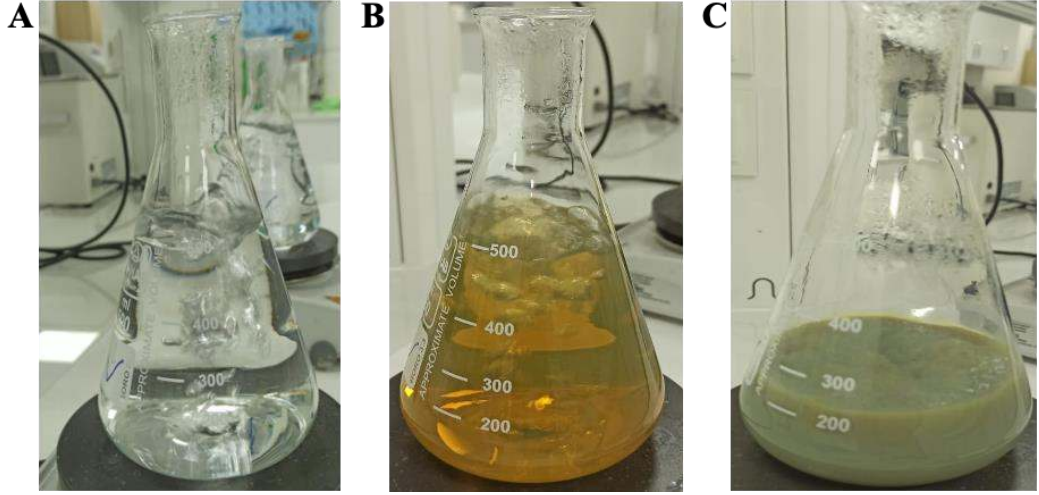
Hemoglobin (Sigma-Aldrich)

Sitokrom c (Sigma-Aldrich)

Lizozim (Sigma-Aldrich)

3.3 AgNPs'nin Sentezlenmesi

AgNPs sitrat indirgenme yöntemiyle sentezlendi[70]. Bu yöntemle göre 90 mg AgNO_3 üzerine 500 mL saf su ilave edilerek AgNO_3 katısı çözüldü. Çözelti 500 rpm hızla 300°C de manyetik karıştırıcıda bir balık yardımıyla karıştırılarak ısıtıldı. Kaynamaya başlayan AgNO_3 çözeltisi üzerine damla damla 10 mL sodyum sitrat çözeltisi (%1) eklendi. Süspansiyonun hacmi yarıya düşene kadar yaklaşık 1 saat 15 dakika boyunca karışım kaynatıldı ve sonrasında oda koşullarında soğumaya bırakıldı. Elde edilen AgNPs süspansiyonu 22 μm boyutundaki fitreler ile filtre edilerek içerisindeki safsızlıklar uzaklaştırıldı. Böylece yaklaşık olarak 50 nm boyutunda küresel şekle sahip AgNPs sentezlendi. Sentezlenen AgNPs süspansiyonunun sentez aşamalarına ait fotoğrafları Şekil 3.1'de verilmektedir.



Şekil 3.1 AgNO_3 çözeltisinden AgNPs'in sentez aşaması A) AgNO_3 çözeltisinin kaynama esnasındaki fotoğrafı, B) Sodyum sitrat dihidrat ilavesi sonrasındaki fotoğraf ve C) Elde edilen AgNPs süspansiyonu fotoğrafı.

3.4 Cam Lamaların Hazırlanması

Kromik asit çözeltisi hazırlamak için potasyum dikromat üzerine yavaş yavaş 1 L sülfürik asit çözeltisi ilave edildi. Hazırlanan kromik asit çözeltisi içerisinde 1 gün süresince cam lamalar bekletildi. Bu çözeltide bekletilen lamalar saf su ile yıkandı. Suyun cam üzerinde yayılmasına dikkat edilerek seçilen hidrofilik lamalar saf su içerisinde saklandı.

3.5 100X AgNPs Hazırlanması

AgNPs süspansiyonundan 50 mL alınarak 4100 rpm'de 99'dk boyunca santrifüjlendi. Santrifüjleme sonucu üst kısımdaki süpernatant 49,5 mL alınarak atıldı ve böylece 0,5 mL 100X AgNPs süspansiyonu elde edildi.

3.6 Farklı Derişimlerde Protein Çözeltilerinin Hazırlanması

Ticari olarak temin edilen proteinler 1 mg/mL derişimde sulu çözeltiler şeklinde hazırlanarak -20'de stoklandı. Stok çözelti kullanılarak seyreltme işlemi sonucunda sırasıyla 100, 10, 1,0 ve 0,1 $\mu\text{g/mL}$ farklı derişimlerde 1 mL protein çözeltileri hazırlandı. Seyreltme işlemi sırasında kullanılan saf suyun pH değeri 7,5'tir.

3.7 Lateks ile AgNPs'nin Karıştırılması

Bu çalışmada 6 farklı büyüklüğe sahip nanoçukurcuk yüzeyi elde etmek için 6 farklı büyüklükte lateks (0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 μm) kullanıldı. Buzdolabından alınan

lateks kullanılmadan önce vortekslendi. 4 μL lateks ile 36 μL AgNPs süspansiyonu karıştırıldı. Bu işlem her bir lateks için tekrarlanarak 6 farklı karışım hazırlandı.

3.8 İletim Derleme Yöntemi İle Yüzey Hazırlanması

İletim derleme (convective assembly) cihazı bir bilgisayar düzeneği ile kontrol edilir. İletim derleme cihazında stage olarak da adlandırılan hareketli yüzey, motor, adaptör, hareketli cam ve sabit cam bulunur. Nanoyüzey elde etmek için cihazın optimizasyonu yapılarak stage hızı 0,5 $\mu\text{m/s}$ olarak belirlendi ve iki cam yüzey arasındaki açı 23°'lik açı olacak şekilde ayarlandı. İletim derleme cihazının fotoğrafı ve AgNPs-lateks karışımının cam slayt üzerinde yürütülme fotoğrafı Şekil 3.2'de görülmektedir.



Şekil 3.2 İletim derleme cihazının fotoğrafı ve AgNPs-lateks karışımının cam slayt üzerinde yürütülme fotoğrafı.

Şekil 3.2'de görüldüğü gibi 9:1 oranında hazırlanan 40 μL AgNPs-lateks karışımı iletim derleme cihazındaki açısı ayarlanan lam yüzeyine damlatıldı ve 6 farklı büyüklüğe sahip homojen nanoyüzeyler elde edildi.

3.9 Nanoçukurcukların Oluşturulması

İletim derleme yöntemi ile yüzeye biriktirilen AgNPs-lateks karışımının YZRS tekniği ile yapılacak olan protein analizlerinde kullanılabilmesi için lateks parçacıkların ortamdan uzaklaştırılarak AgNPs'den oluşan nanoçukurcukların lam üzerinde kalması gerekir. Bu amaç doğrultusunda lateks parçacıklarını ortamdan uzaklaştırmak için kloroform, diklorometan, toluen gibi organik çözücüler ile nanoyüzeyler yıkandı.

3.10 Hazırlanan Nanoçukurcukların YZRS Aktivitesinin Belirlenmesi

6 farklı büyüklüğe sahip nanoçukurcuk yüzeylerinin YZRS aktivitelerini belirlemek için 4-ATP kullanılarak maksimum YZRS aktivitesi belirlendi. Bu amaç doğrultusunda her bir nanoçukurcuk yüzey 1 mM 4-ATP çözeltisi içerisinde 1 saat inkübe edildi. Daha sonra su ve alkol ile yıkandı ve kuruyan her bir yüzeyin 785 nm dalga boyuna sahip Raman spektrometresi ile (Lazer gücü: 0,3 mW (%1), objektif: 50x, maruz kalma süresi: 1 s) YZRS ölçümleri yapıldı. Kuruyan yüzeyler üzerindeki rasgele on noktadan ölçüm gerçekleştirilerek tekrarlanabilirlik spektumları elde edildi.

3.11 Hazırlanan Nanoçukurcukların Üzerinde YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini

Sigma-Aldrich firmasından temin edilen proteinlerin 1 mg/mL derişimli sulu çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan bu stok proteinler -20'de stoklandı. Proteinlerin fizikokimyasal özelliklerinin tespit edilmesi için hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri Zetasizer cihazı kullanılarak ölçüldü. 100,0;10,0;1,0 ve 0,1µg/mL derişimindeki proteinlerden 5 µL alınarak en yüksek aktiviteye sahip nanoyüzeyler üzerine damlatılarak kurumaya bırakıldı. Daha sonra kuruyan yüzeyler üzerinden proteinlerin YZRS spektrumları, 785 nm dalga boyuna sahip Raman spektrometresi ile (Lazer gücü: 0,3 mW (%1), objektif: 50X, maruz kalma süresi: 1 s) elde edildi. Kuruyan yüzeyler üzerindeki rasgele on noktadan ölçüm gerçekleştirilerek tekrarlanabilirlik spektumları elde edildi. Bu tez çalışmasında kullanılan proteinlerin listesi Tablo 3.1'de verilmektedir.

Tablo 3.1 Kullanılan proteinlerin listesi

Proteinler
Avidin
BSA
Lizozim
Hemoglobin
Sitokrom-C

BÖLÜM 4

BULGULAR ve TARTIŞMA

4.1 Gümüş Nanoçukurcukların Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bu tez kapsamında YZRS'ye dayalı protein tayini için kimyasal indirgeme yöntemi ile gümüş nanoparçacıklar (AgNPs) sentezlendi ve sentezlenen AgNPs UV/görünür bölge spektrofotometresi ve Zetasizer cihazı ile karakterize edildi. Sentezlenen AgNPs'nin UV/görünür bölge spektrofotometresi (Thermo Scientific –Evolution 201) ile 300-800 nm dalgaboyu aralığında ölçümü gerçekleştirildi. Çözelti halinde bulunan AgNO₃ renksiz iken nanoboyuta indirgendiğinde dalga boyu görünür bölgeye kayması sonucu renkli bir süspansiyon elde edildi ve renkli süspansiyonun maksimum absorpsiyon dalga boyunun 420 nm olduğu belirlendi. Ayrıca AgNPs Zetasizer cihazı ile elde edilen büyüklük dağılım grafiğine göre ortalama büyüklükleri hidrodinamik (nanoparçacığın bir sıvı içerisindeki çapı) çaptan dolayı yaklaşık 78 nm olarak belirlendi.

Karakterizasyonu yapılan AgNPs süspansiyonu ile lateks karıştırılmadan önce YZRS'de kullanılan substratın homojen olması önemli olduğu gibi nanoparçacıklar arasındaki mesafenin korunması önemlidir. Bu nedenle yüzey plazmonları arasındaki etkileşim olması için partiküller arasındaki mesafeyi ayarlamak amacıyla AgNPs süspansiyonunun derişimi artırılmalıdır [70]. Ayşe ÖZBAY'ın yapmış olduğu bir çalışmaya göre bu etkileşimin en iyi olduğu AgNPs derişimi 100X'tir. Bu tez çalışmasında derişimi 100X olan AgNPs süspansiyonu ile lateksler karıştırarak nanoyüzeyler elde edildi.

Karakterizasyonu yapılan AgNPs süspansiyonu ile lateks karıştırıldı ve böylece 6 farklı büyüklükteki lateksler ile 6 farklı karışım hazırlandı. Her bir karışım için iletim derleme yöntemi ile nanoyüzeyler elde etmek için kullanılacak camlar hidrofilik hale getirildi. Çünkü cam lamalar genelde hidrofobik halde bulunurlar. Deneyde AgNPs ve lateksten oluşan karışımların iletim derleme yönteminde homojen dağılması için camların hidrofilik yapıda olması gerekir. Hidrofobik yapıda olan cam lamalar kromik

asit içerisinde bekletilerek hidrofilik hale getirildi. Hidrofilik hale getirilen cam lam yüzeylerine Şekil 3.2'deki gibi AgNPs-lateks karışımı damlatılarak iletim derleme cihazından nanoyüzeyler elde edildi. Elde edilen her bir nanoyüzeyi temsil etmek amacıyla AgNPs ve 1,6 μm 'lik lateks karışımının yürütme sonrası oluşan nanoyüzey fotoğrafı örnek olarak Şekil 4.1'de görülmektedir.

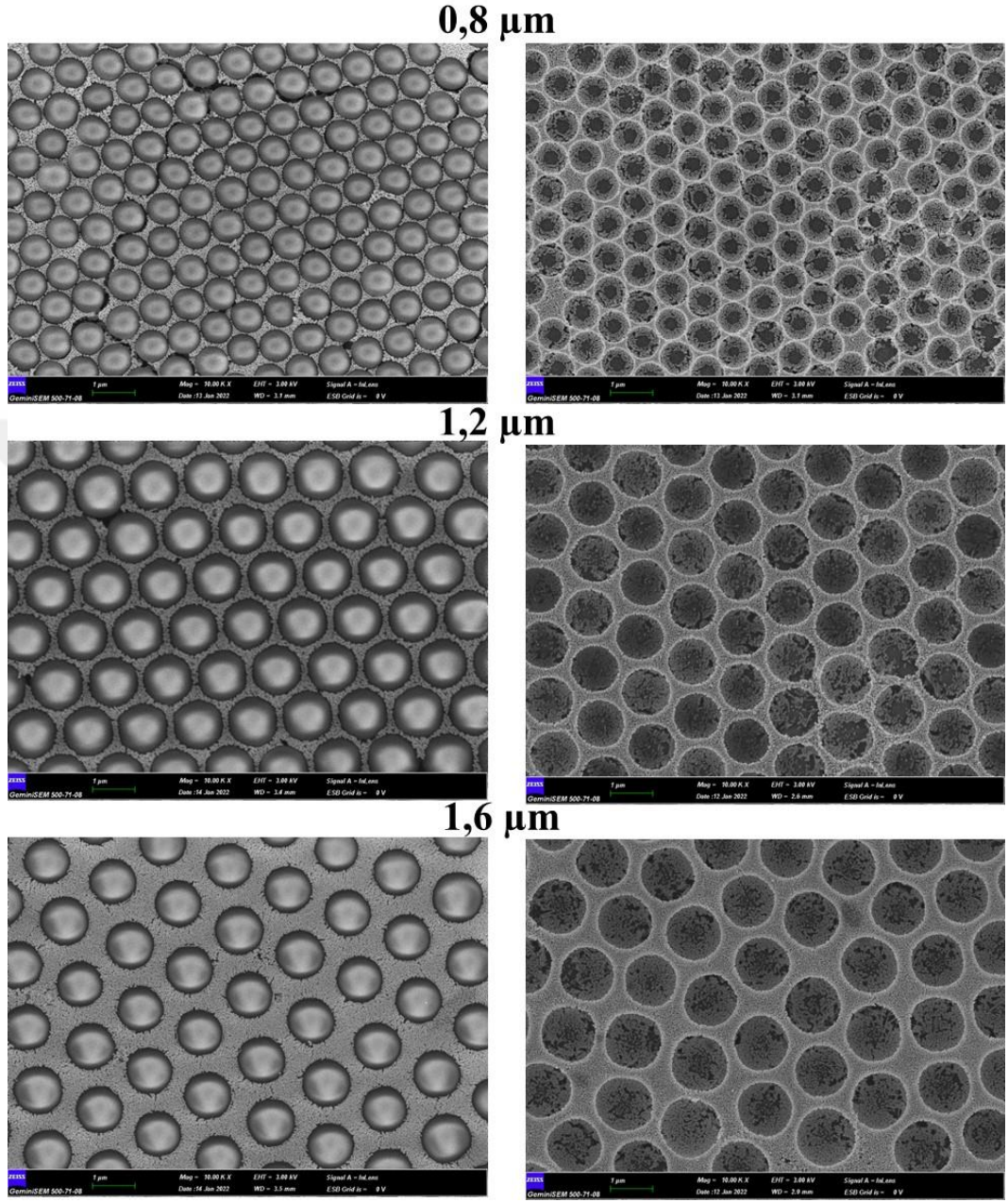


Şekil 4.1 AgNPs ve 1,6 μm 'lik lateks karışımının yürütme sonrası oluşan nanoyüzey fotoğrafı.

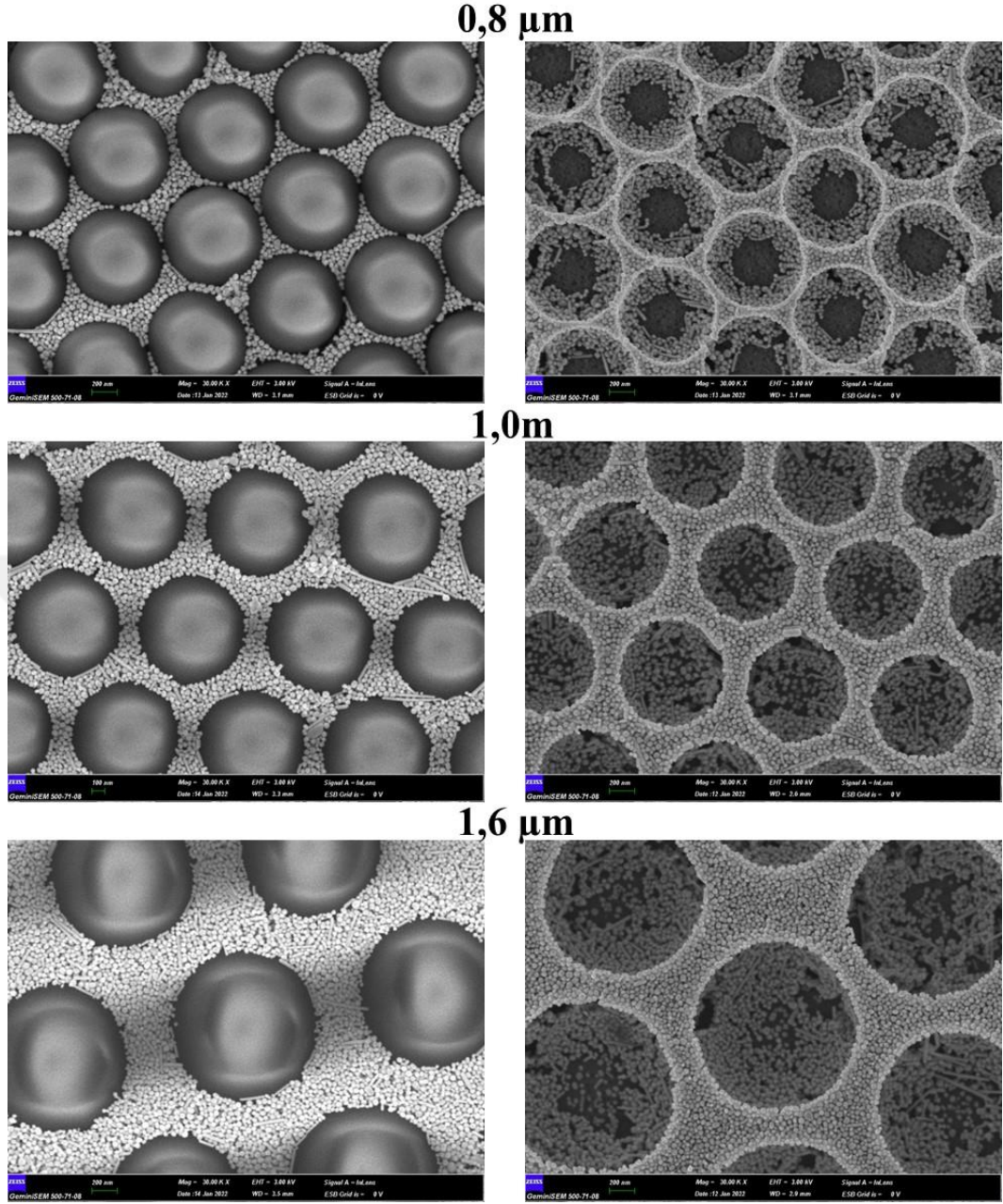
Şekil 4.1'de görüldüğü gibi homojen bir nanoyüzey elde edilmiştir. Homojen yüzey elde etmek için ortam sıcaklığının ve nemin kontrolü önemli parametrelerdir. Ortam sıcaklığı yüksek olursa lateks parçacıkları hızlı bir şekilde kururken nem fazla ise lateks parçacıklarının geç kurumamasına neden olur ve bu yüzden homojen bir nanoyüzey oluşmaz. Ayrıca iletim derleme cihazının stage hızı, iki cam parçacığı arasındaki açı, cam yüzeyin hidrofilik ve temiz olması düzgün bir dağılım elde edebilmek için diğer önemli parametrelerdendir. Bu çalışma kapsamında materyal metot kısmındaki optimum şartlar sağlanarak homojen yüzeyler elde edildi. Elde edilen nanoyüzeylerden nanoçukurcukların oluşturulması için ortamdan latekslerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Bu amaç için bu tez kapsamında hazırlanan AgNPs ve lateks karışımından elde edilen nanoyüzeyler kloroform, diklorometan ve toluen çözeltileri ile ayrı ayrı yıkandı ve bu çözücülerden en iyi lateks uzaklaştırma işlemi kloroform çözeltisi ile gerçekleştirildi.

Nanoyüzeylerin homojenliğini karakterize etmek için 6 farklı büyüklüğe sahip yüzeylerin yıkama öncesi ve sonrasında SEM ve AFM cihazları ile yüzey topografileri incelendi. İlk olarak farklı büyüklükteki AgNPs-lateks karışımından oluşan nanoyüzeylerin kloroform ile yıkama öncesi ve yıkama sonrası SEM görüntüleri alındı. Bütün yüzeyleri temsilen 0,8; 1,0; 1,2; ve 1,6 μm büyüklüğündeki lateks

parçacıkları ile hazırlanmış olan nanoyüzeylerin, AgNPs-lateks yıkama öncesi (sağ) ve yıkama sonrası nanoyüzeylerin SEM görüntüleri Şekil 4.2 ve 4.3'te verilmektedir.



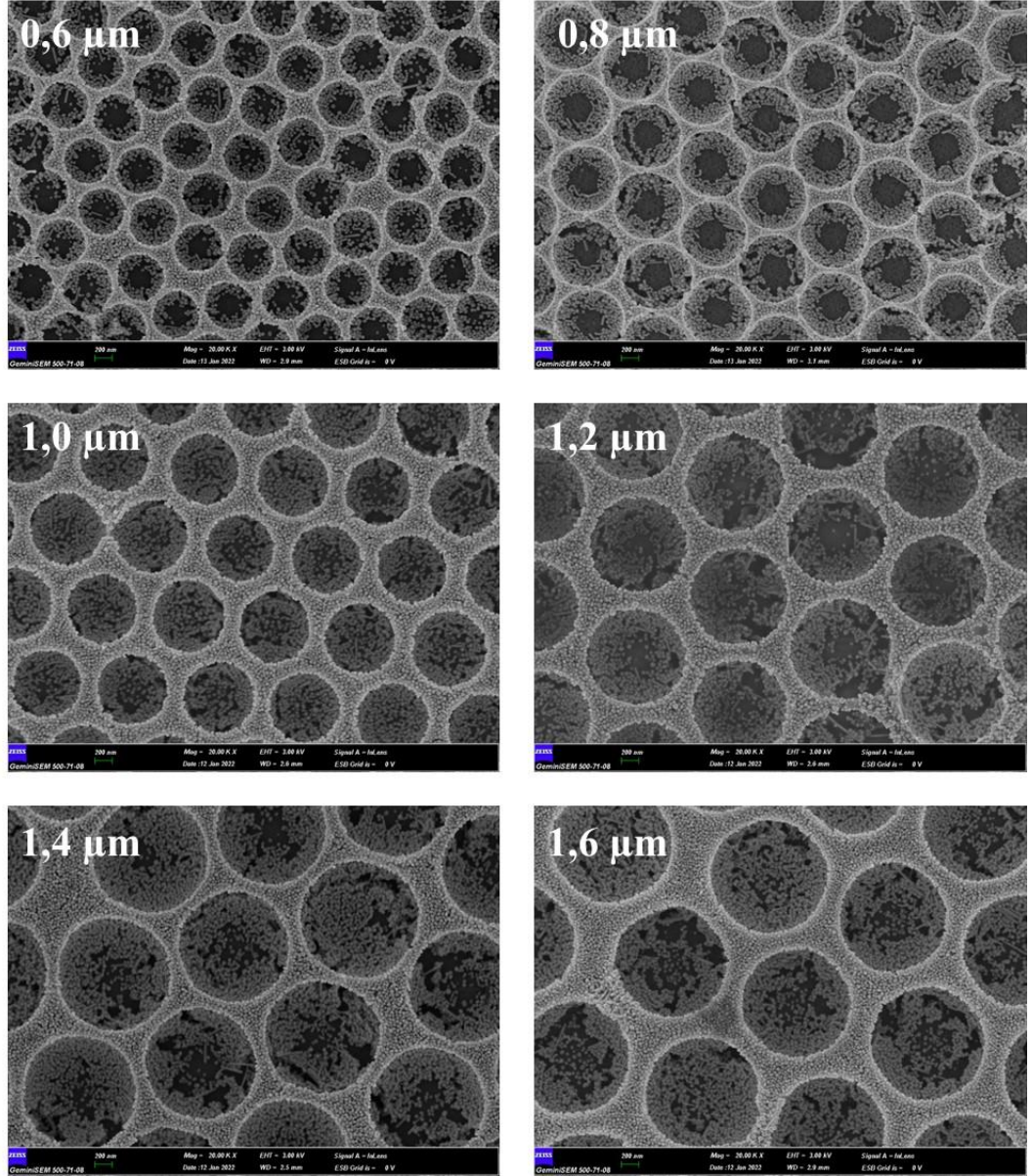
Şekil 4.2 AgNPs-lateks nanoyüzeylerinin yıkama öncesi (sol) ve yıkama sonrası (sağ) SEM görüntüleri (10000X büyütme).



Şekil 4.3 AgNPs-lateks nanoyüzeylerinin yıkama öncesi (sol) ve yıkama sonrası (sağ) SEM görüntüleri (30000X büyütme).

Şekil 4.2’de 10000X ve Şekil 4.3’te 30000X büyütme ile elde edilen veriler incelendiğinde sol taraftaki görüntülerde AgNPs’in lateks etrafında düzenli ve homojen olarak dağıldığı ve istenen hegzagonal yapının oluştuğu görülmektedir. Sağ taraftaki görüntüler incelendiğinde ise organik çözücü ile yıkama işlemi sonucunda ortamdaki latekslerin uzaklaştığı ve lateksin bulunduğu bölgelerden uzaklaştırılması sonucu nanoçukurcuklar oluştuğu görülmektedir. Ayrıca kullanılan lateks büyüklüğüne bağlı olarak oluşan nanoçukurcuklarında büyüdüğü görülmektedir.

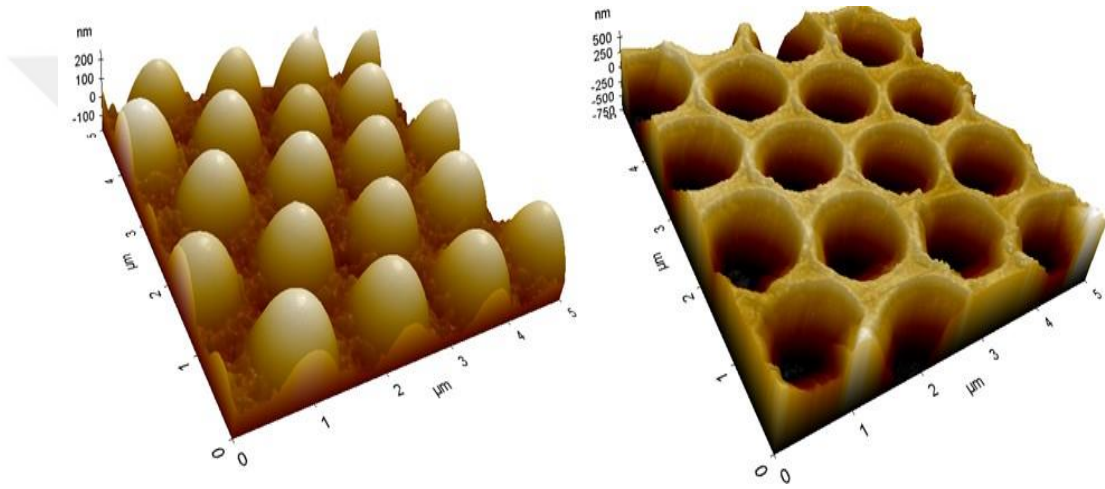
Kullanılan lateks büyüklüğüne bağlı olarak nanoçukurcukların büyüklüğü değiştiği gibi lateksler arasındaki mesafede doğru orantılı olarak artmaktadır. Lateks arasındaki mesafe arttığında daha fazla nanoparçacığın bu mesafeye düzenli olarak yerleştiği görülmektedir. Lateks büyüklüğüne göre değişen mesafeleri daha iyi gözlemlemek amacıyla farklı büyüklükteki latekslerden elde edilmiş nanoçukurcukların SEM görüntüleri Şekil 4.4. de görülmektedir.



Şekil 4.4 Farklı büyüklükteki latekslerden elde edilmiş nanoçukurcukların SEM görüntüleri (20000X).

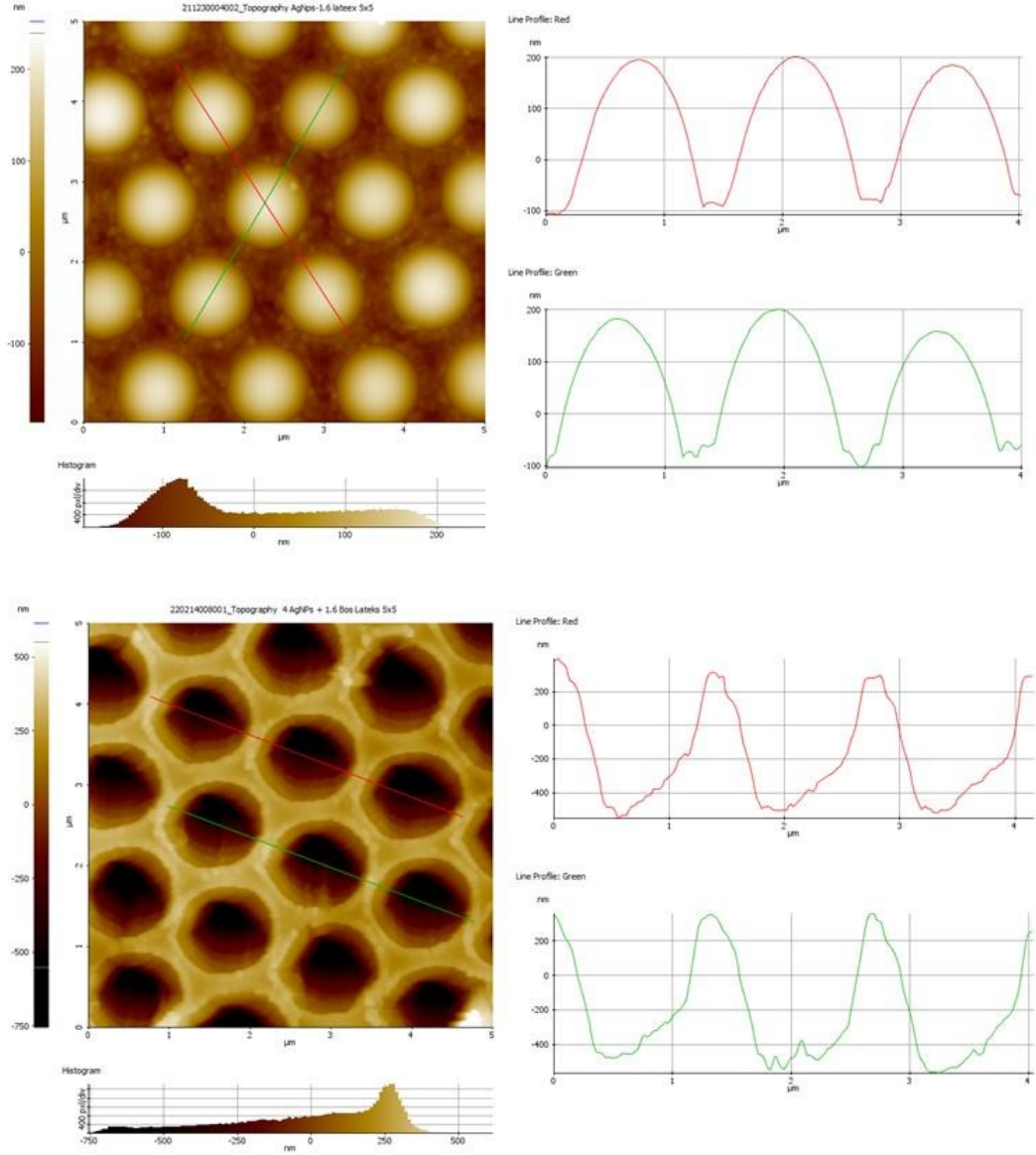
Şekil 4.4 incelendiğinde lateks büyüklüğü arttıkça lateks parçacıkları arasındaki mesafenin arttığı ve bu lateks boşlukları arasını dolduran AgNPs'nin kapladıkları alanın daha fazla olduğu görülmektedir.

Elde edilen yüzeylerdeki nanoparçacıkların 2 boyutlu SEM verilerini desteklemek amacıyla yıkama öncesi ve yıkama sonrası yüzeylerin 3 boyutlu AFM ile karakterizasyon analizleri yapıldı. Bütün AFM görüntüleri non-contact mood ile 0,5 Hz tarama hızı ile elde edildi. Bütün yüzeylerden alınan verileri temsilen Şekil 4.5'te AgNP-lateksten oluşan yüzeyin ve lateksin organik çözücü ile uzaklaştırılması sonucu elde edilen yüzeyin AFM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.5 AgNPs-1,6 µm lateks parçacıkların (solda), AgNPs nanoçukurçukların (sağda), 3D AFM görüntüleri.

Şekil 4.5'te görüldüğü gibi 3D görüntüleri elde edilen AgNPs-1,6 µm lateks karışımının yükseklik analizi ve bu karışımdan lateksin uzaklaştırılması sonucu elde edilen nanoçukurçukların derinlik analizi software programı ile belirlendi. Şekil4.5'te organik çözücü ile yıkanmadan önce lateksler yüzeyde tümsek oluştururken yıkama işlemi sonrasında ortamdaki ayrılan lateks parçacıklarının yerleri nanoçukurçuklar oluşturmaktadır. Ayrıca Şekil 4.6'da yıkama öncesi yüzeylerdeki latekslerin yükseklik ve yıkama sonrası oluşan nanoçukurlukların 2D derinlik analizi verilmektedir.

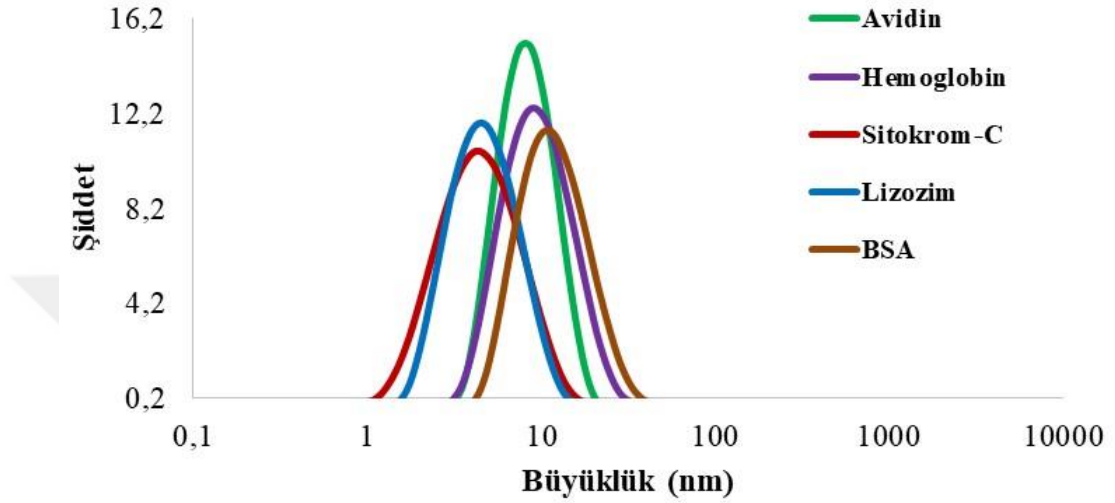


Şekil 4.6 Yıkama öncesi yüzeylerdeki latekslerin yükseklik ve yıkama sonrası oluşan nanoçukurcukların 2D derinlik analizi.

Şekil 4.6’da elde edilen verilere göre $1,6 \mu\text{m}$ büyüklüğünde lateks parçacıkları ile oluşturulan lateks-AgNPs karışımından oluşan yüzeyin tomografisi incelendiğinde lateks büyüklüğüne bağlı olarak tümsek olduğu görülmektedir, yıkama sonrası lateks uzaklaştırması sonucu elde edilen yüzeyde ise uzaklaşan lateksin yerini nanoçukurcuklar oluşturmaktadır. Elde edilen AFM ve SEM görüntülerine bakıldığında nanoçukurcukların genişlik ve derinliğinin lateks büyüklüğü ile değiştiği gözlemlendi. Böylece elde edilen tüm yüzeylerin optik karakterizasyonları yapıldı ve istenilen sonuçlar elde edildi.

4.2 Hazırlanan Nanoçukurcukların YZRS'ye Dayalı Etiketsiz Protein Tespitinde Kullanılması

Bu tez kapsamında proteinlerin YZRS dayalı tespiti için ilk olarak proteinlerin fizikokimyasal (büyüklük ve zeta potansiyel) özellikleri zetasizer ile belirlendi. Zetasizer cihazı ile tüm proteinlerin hidrodinamik çapları ölçüldü (Şekil 4.7).



Şekil 4.7 Proteinlerin hidrodinamik çap grafiği.

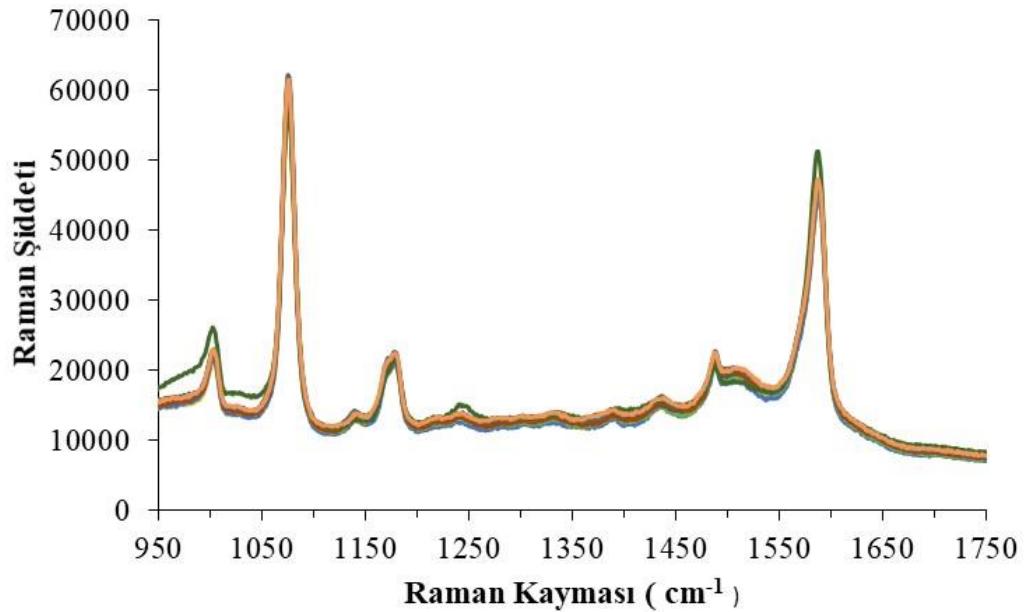
Şekil 4.7'de görüldüğü gibi ölçüm sonrası her bir proteinin hidrodinamik çapı birbirinden farklıdır. En büyük hidrodinamik çapa sahip olan BSA iken en küçük hidrodinamik çapa sahip olan Sitokrom-C'dir. Ayrıca proteinlerin büyüklüğünü etkileyen önemli parametrelerden bir tanesi molekül ağırlığıdır. Farklı molekül ağırlığına sahip proteinlerin şekilde görüldüğü gibi protein büyüklüğü farklıdır. Ayrıca diğer fizikokimyasal özellikleri ile zetasizer sonuçları Tablo 4.1'de birlikte verilmektedir.

Tablo 4.1. Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri.

Protein Adı	Molekül Ağırlığı(kDa)	İzoelektrik nokta (pI)	Hidrodinamik Çap (nm)	Zeta Potansiyeli(mV)
Avidin	66,0-67,0	10,0	8,7	19,1
BSA	66,0	4,7-4,9	10,2	-24,8
Sitokrom C	12,4	10,4-10,8	4,9	23,1
Hemoglobin	64,5	6,8	8,2	-7,6
Lizozim	12,6	11,3	5,0	33,1

Tablo 4.1 dikkatli bir şekilde incelendiğinde zeta potansiyellerinin izoelektrik nokta ile doğrusal bir değişim gösterdiği görülmektedir. İsoelektrik noktaları düşük olan proteinler negatif zeta potansiyeline, izoelektrik noktaları yüksek olan proteinlerin zeta potansiyelleri pozitif değere sahiptir. İsoelektrik noktaları yüksek olan proteinler yani pozitif zeta potansiyeli sahip olanlar avidin, sitokrom-C ve lizozimdir. Düşük izoelektrik noktasına sahip olan yani zeta potansiyeli negatif olan proteinler ise BSA ve hemoglobindir. Hidrodinamik çapların molekül ağırlıkları ile doğru orantılı olduğu görülmektedir.

YZRS deneylerinde önemli parametrelerden bir tanesi tekrarlanabilirlik olduğundan dolayı maksimum YZRS aktivitesine sahip olan yüzeylerin tekrarlanabilirliğini incelemek için yüzey üzerinden 10 farklı noktadan Raman ölçümleri yapıldı. Elde edilen spektrumlar YZRS tekrarlanabilirlik grafiği olarak Şekil 4.8’de verilmektedir.

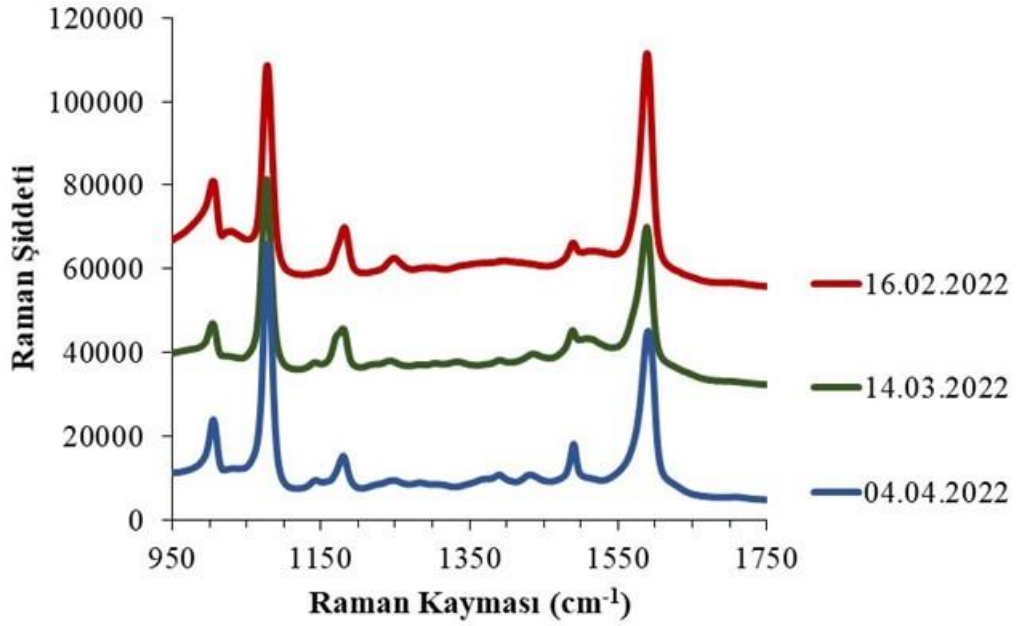


Şekil 4.8 Aynı yüzey üzerinde 10 farklı bölgeden alınan YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliği.

Şekil 4.8’de AgNPs-1,0 µm lateks karışımı ile hazırlanan yüzeyin herhangi bir bölgeden alınmış 10 spektrumu görülmektedir. Spektrumlara bakıldığında hazırlanan yüzeyin neredeyse her bölgesinden alınan spektrumların birbirine benzer olduğu görülmektedir. Ayrıca rastgele seçilen 10 noktadan alınan YZRS spektrumlarının

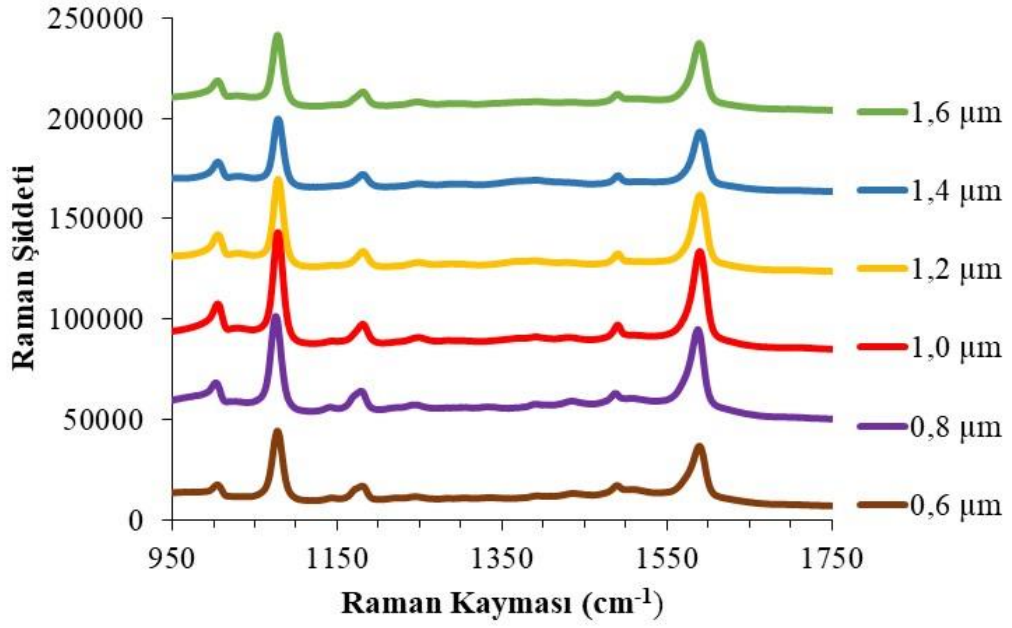
varyasyon katsayısı yaklaşık 4 olarak hesaplandı. Bu sonuç bize elde ettiğimiz yüzeylerin oldukça homojen ve tekrarlanabilir olduğunu göstermektedir.

Ayrıca 1,0 μm büyüklükteki lateks parçacıklarıyla farklı zamanlarda sentezlenen AgNPs ile farklı zamanlarda yüzeyler hazırlandı. Şekil 4.9’da farklı zamanlarda hazırlanarak 4-ATP ile inkübe edilmiş yüzeylerin YZRS spektrumları alınarak tekrarlanabilirliği test edildi.



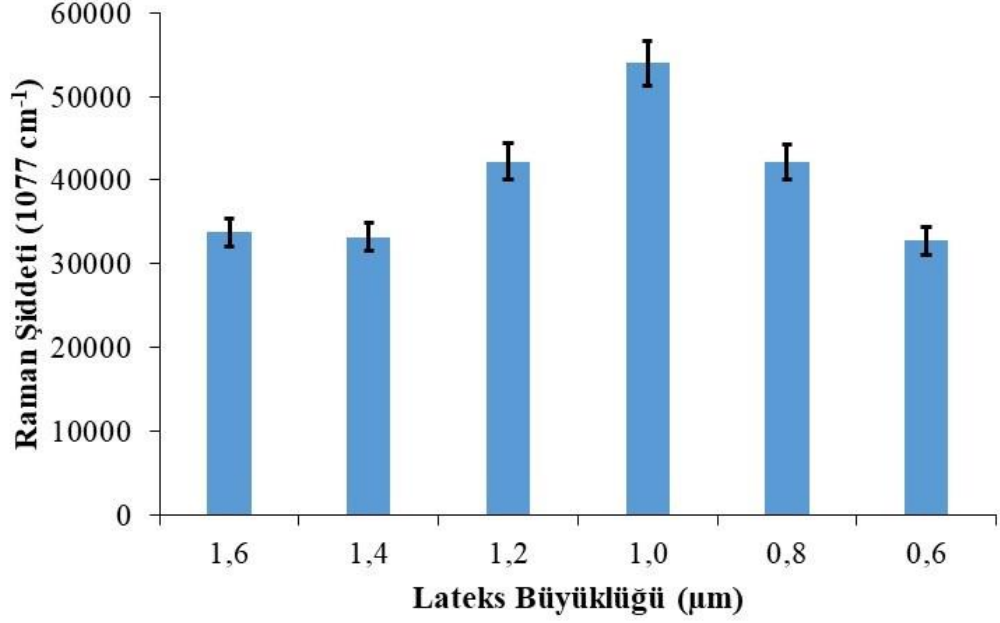
Şekil 4.9 Farklı zamanlarda hazırlanmış yüzeylerden elde edilen YZRS spektrumları. Şekil 4.9’da görüldüğü gibi farklı zamanlarda sentezlenen AgNPs kullanılarak AgNPs-1,0 μm lateks karışımı ile 3 farklı tarihte hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu spektrumların birbirine olan benzerliklerinden anlaşılmaktadır. Bu sonuçlara göre hazırlanan yüzeylerin aktivitelerinin yüzey üzerindeki herhangi bir noktadan ya da farklı zamanda hazırlanmasından bağımsız olarak tekrarlanabilir olduğu gözlemlenmiştir.

Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri incelendikten sonra protein tayininde kullanılacak en yüksek aktiviteye sahip nanoyüzeyi belirlemek için farklı büyüklükteki lateksler ile elde edilen nanoçukurcuk yüzeylerinin 4-ATP inkübasyonu sonrası alınan YZRS spektrumları karşılaştırıldı. (Şekil 4.10)



Şekil 4.10 Farklı büyüklükteki lateksler ile elde edilen nanoçukurcuk yüzeylerinin 4-ATP inkübasyonu sonrası alınan YZRS spektrumları.

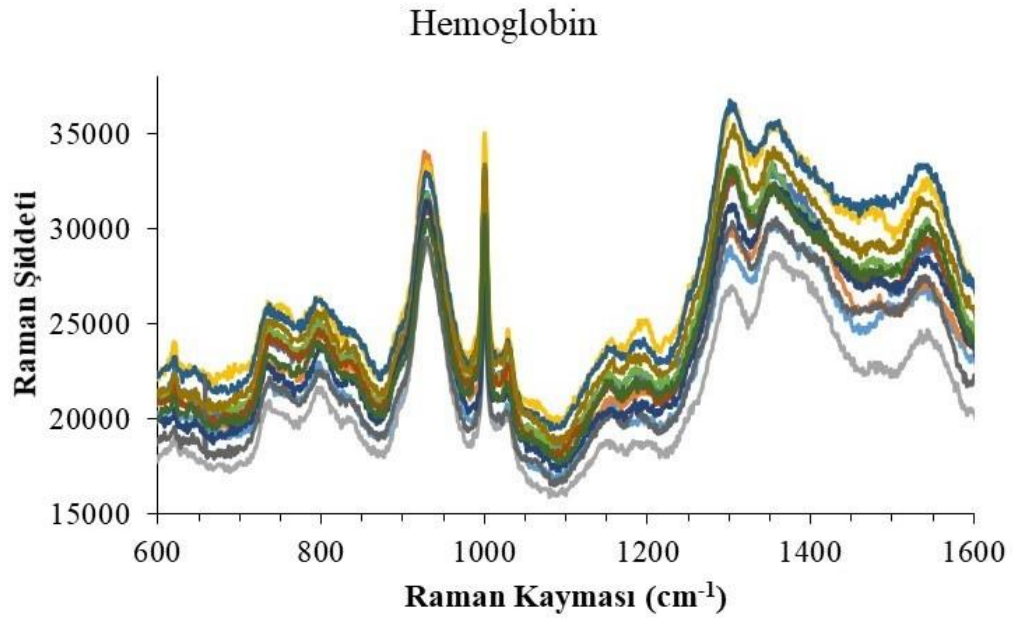
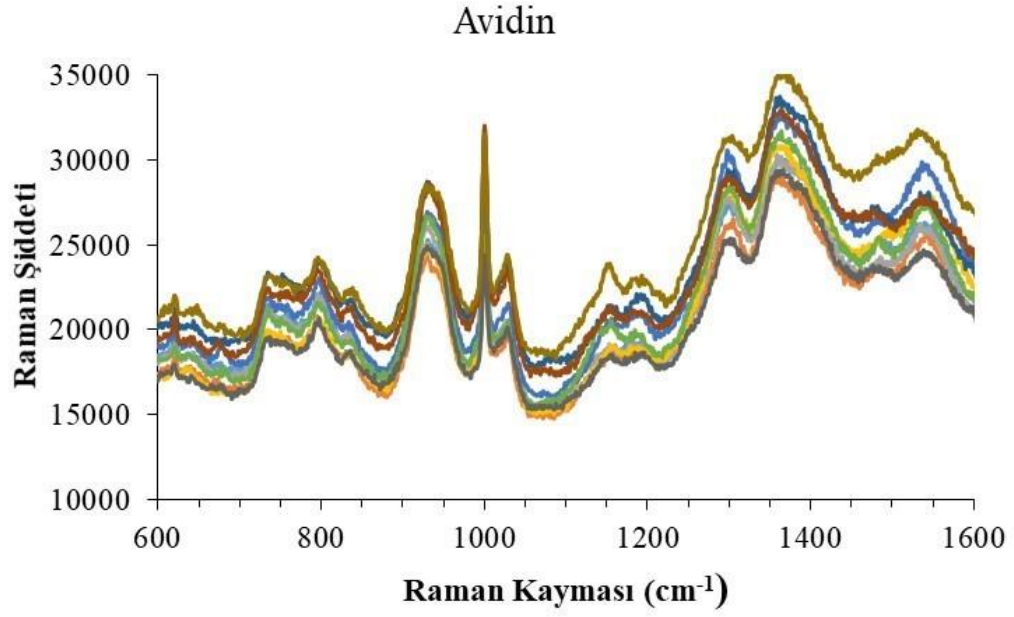
Şekil 4.10'da görüldüğü gibi lateks büyüklüğü değiştikçe oluşan yüzeyin Raman aktivitesi değişmektedir. Raman aktivitesinin farklı olmasının nedeni AgNPs'nin plazmonik özellik göstermesi ve E-alan şiddetinin değişiminin farklı olması yüzey aktivitelerini değiştirmektedir.



Şekil 4.11 YZRS spektrumlarından elde edilen 1077 cm⁻¹'deki pik şiddetlerinin değişim grafiği

Şekil 4.11'de görüldüğü gibi lateks büyüklüğü değiştikçe oluşan AgNPs aktivasyonun değiştiği görülmektedir. Raman şiddetinin farklı olmasının nedeni AgNP'lerin plazmonik özellik göstermesi ve E-alan şiddeti değişiminin farklı olmasından kaynaklanmaktadır. Lateks büyüklüğünün küçük olmasından dolayı çok fazla AgNPs bir araya gelerek agregasyon oluşturmakta bu yüzden de oluşan plazmonların birbirini sönmlemesi sonucunda zayıf E-alan yoğunluğu oluşturmaktadır. 1,0 μm büyüklüğünde lateks kullanıldığında ise E-alan yoğunluğunun da arttığı maksimum E-alan şiddetinin elde edildiği görülmektedir. 1,0 μm'den büyük lateksler kullanıldığında ise AgNPs arasındaki mesafe giderek artmakta ve plazmonik yapılar arasındaki etkileşim azaldığından E-alan şiddetinde azalma meydana gelmektedir. Sonuç olarak 1,0 μm büyüklüğü sahip lateksler ile hazırlanan yüzeylerin en yüksek YZRS aktivitesine sahip olduğu belirlenmiştir.

Tekrarlanabilirliği iyi ve aktivitesi en yüksek olan bu yüzeyler proteinlerin tespiti için YZRS substratı olarak kullanılmıştır. Protein analizlerinde de ilk olarak YZRS substratının tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Her bir protein için hazırlanan yüzeylere protein damlatıldıktan sonra yüzeyler üzerinden 10 farklı noktadan YZRS ölçümleri alınmıştır. Bu ölçümlerin tamamını temsilen Avidin ve Hemogloblin proteinlerinin YZRS tekrarlanabilirlik spektrumları Şekil 4.12'de görülmektedir.

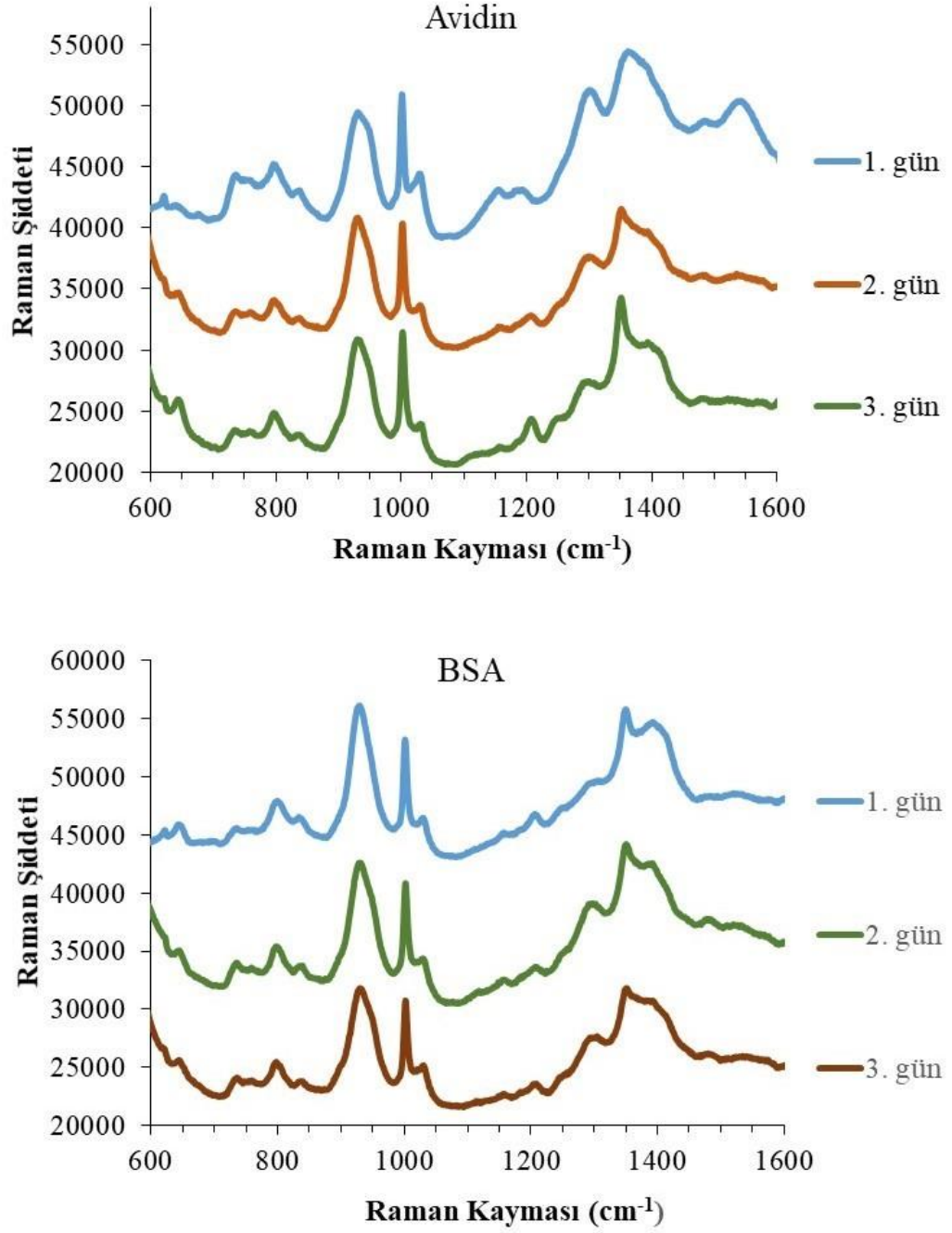


Şekil 4.8 Avidin ve Hemoglobin proteinlerinin YZRS tekrarlanabilirlik spektrumları.

Şekil 4.12’de AgNPs-1,0 µm lateks karışımı hazırlanan yüzeyin herhangi bir bölgeden alınmış 10 spektrumu görülmektedir. Spektrumlara bakıldığında hazırlanan yüzeyin neredeyse her bölgesinden alınan spektrumların birbirine benzer olduğu görülmektedir.

Ayrıca 1,0 µm büyüklükteki lateks parçacıklarıyla farklı zamanlarda sentezlenen AgNPs ile hazırlanan farklı yüzeyler üzerinde tüm proteinleri temsilen Avidin ve BSA proteinlerinin her biri için 10 farklı noktadan alınan spektrumların ortalaması alındı.

Şekil 4.13'te farklı zamanlarda Avidin ve BSA ile edilmiş farklı yüzeylerin YZRS spektrumları alınarak tekrarlanabilirliği test edildi.

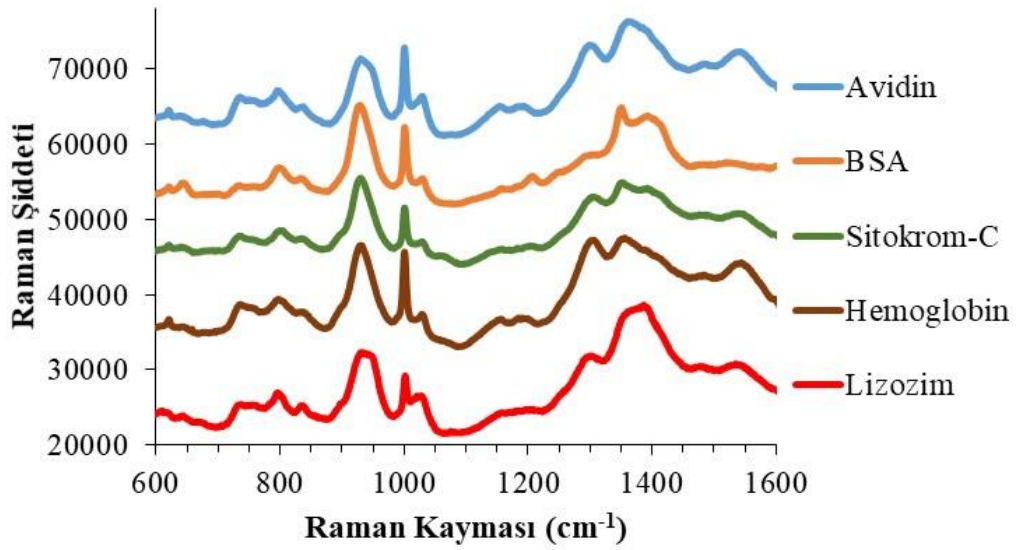


Şekil 4.13 3 Farklı yüzey üzerinde Avidin ve BSA proteinlerinden elde edilen YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliği.

Şekil 4.13'te Avidin ve Hemoglobin proteinlerine ait elde edilen YZRS spektrumlarına bakıldığında farklı zamanlardaki tekrarlanabilirliğin iyi olduğu görülmektedir.

Sonuçlara bakıldığında analitlerden bağımsız olarak, tez kapsamında hazırlanan YZRS substratlarının tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu gözlemlenmektedir.

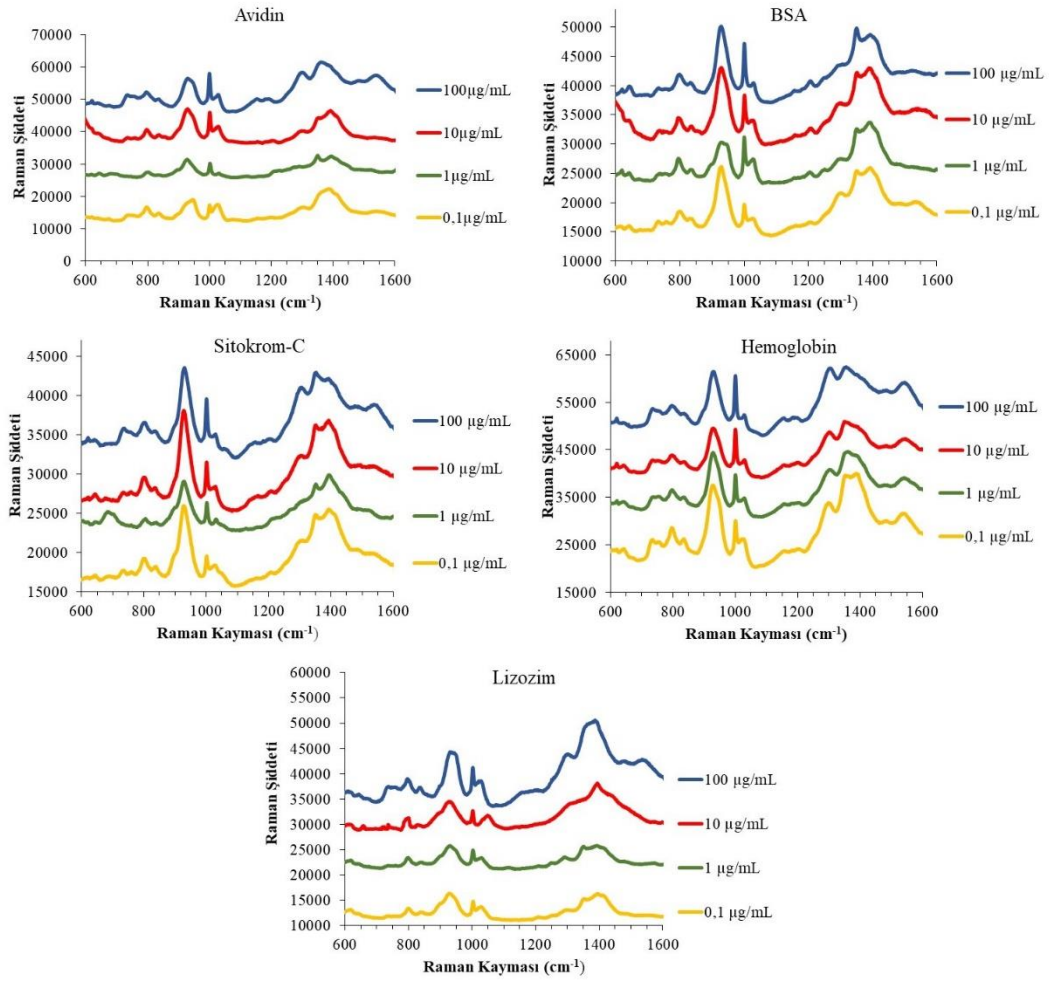
Daha sonra 100 µg/mL derişimine sahip her bir proteinin (Avidin, BSA, Sitokrom-C, Hemoglobin ve Lizozim) YZRS substratı üzerine damlatılarak on farklı spektrum alınmış ve bu spektrumların ortalaması alınarak her bir proteine ait YZRS spektrumlarının karşılaştırılması Şekil 4.14'te görülmektedir.



Şekil 4.14 Her bir proteine ait YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

Şekil 4.14'te görüldüğü gibi belirtilen proteinlerin YZRS spektrumlarına bakıldığında her bir spektrum kendine spesifik olduğu görülmektedir. Aynı piklerin bulunduğu Raman kaymalarına bakıldığında ise Raman şiddetlerinin birbirinden farklı olduğu spektrumlarda açık bir şekilde görülmektedir.

Son olarak bu tez kapsamında hazırlanan substratlar ile bütün proteinlerin tayin edilebilecek en düşük derişim limiti belirlendi. Bu amaç için bütün proteinlerin 100, 10, 1,0, 0,1 µg/mL olacak 4 farklı derişimi hazırlandı ve her biri substrat yüzeyine damlatılarak yine on farklı noktadan spektrum alındı ve bu spektrumların ortalamaları hesaplanarak farklı derişimlerde hazırlanan her bir proteine ait YZRS spektrumları elde edildi (Şekil 4.15)



Şekil 4.15 Farklı derişimlerde hazırlanan her bir proteine ait YZRS spektrumları.

Şekil 4.15 incelendiğinde YZRS substratı üzerine damlatılan her bir proteinin derişimi azaldıkça spektrum şiddetinin azaldığı görülmektedir. Spektrumlardan da görüldüğü üzere her bir proteinin 0,1 $\mu\text{g/mL}$ derişimine kadar tespit edilebildiği görülmektedir. Buda bizlere bu tez kapsamında hazırladığımız YZRS substratının oldukça yüksek bir zenginleştirme faktörüne sahip bir yüzey olduğunu göstermektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Bu tez kapsamında da YZRS' ye dayalı protein tayini yapmak için basit, ucuz ve hassas bir yöntem geliştirdik. YZRS de önemli olan ilk basamak YZRS aktif substratlar geliştirmektir. Daha sonra geliştirilen bu substratların aktiviteleri belirlenmeli ve son olarak da etiketli ya da etiketsiz seçilen YZRS tekniğine göre analitin tayin edilmesi gibi aşamaları bulunmaktadır.

İlk olarak tez kapsamında YZRS aktif yüzeyleri hazırlamak için kullanılan AgNPs süspansiyonu sentezlendi ve AgNPs Zetasizer ve UV/görünür bölge spektrofotometresi ile karakterize edildi. Daha sonra AgNPs homojen bir YZRS yüzeyi elde etmek için deriştirilerek 100X'lik bir süspansiyon elde edildi. Bu süspansiyon farklı büyüklüklerdeki lateks parçacıkları ile karıştırılarak 6 farklı karışım elde edildi.

Hazırlanan 6 farklı büyüklükteki lateks ile elde edilen 6 farklı AgNPs-lateks karışım iletim derleme yöntemi ile cam lam yüzeyi üzerinde biriktirildi. Çünkü oluşan plazmonik etkinin birbirini sönümleme yapmaması ve düzenli agregasyon oluşturarak zenginleştirme faktörünü artırması için nanoparçacıkların uygun mesafede bulunması gerekmektedir. Daha sonra biriktirilen nanoyüzeyler kloroform ile yıkanarak lateks parçacıkları ortamdan uzaklaştırıldı ve böylece nanoçukurcuklardan oluşan bir YZRS substratı elde edildi. Lateks parçacıklarının farklı boyutlarda kullanılmasından dolayı oluşan nanoçukurcukların da farklı büyüklükte olduğunu ve yıkama sonrası ortamdan tamamen uzaklaştığını gözlemlemek amacı ile hem yıkanmayan hem de yıkanan nanoyüzeyler SEM ve AFM ile optik karakterizasyonları gerçekleştirildi.

SEM ve AFM görüntüleri incelendiğinde yıkamadan önce latekslerin farklı büyüklüklerde tümsekler oluşturduğu ve karışımındaki AgNPs bu latekslerin etrafında düzenli bir şekilde dizildiği gözlemlenirken yıkama sonrası latekslerin ortamdan tamamen uzaklaştığını oluşturduğu nanoçukurcukların görüntülenmesi ile belirlendi. Ayrıca her bir lateksin büyüklüğüne göre etrafında dizilmiş olan AgNPs alanının doğru

orantılı bir şekilde artışı da gözlemlenmiştir. Bu sonuç bize düzenli agregasyonların olduğunu göstermektedir. Karakterizasyon sonuçlarına göre 0,6; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6 μm büyüklüğündeki nanoçukurcuklardan oluşan 6 farklı YZRS substratı elde edildi.

Daha sonra elde edilen nanoçukurcukların YZRS aktivitelerini belirlemek için Raman aktif molekül olan 4-ATP ile YZRS substratları inkübe edildi ve Raman ölçüm sonuçlarına göre en yüksek aktivite ve tekrarlanabilirliğe sahip olan YZRS substratının 1,0 μm büyüklüğündeki lateks parçacıklarından elde edilen nanoçukurcukların oluşturduğu nanoyüzey olduğu belirlendi. Ayrıca en yüksek aktiviteye sahip YZRS substratının varyasyon katsayısı 4 olarak hesaplandı.

En yüksek aktiviteye sahip olan YZRS substratı Avidin, BSA, Sitokrom-C, Hemoglobin ve Lizozim proteinlerinin tayini için kullanılmadan önce proteinlerin fizikokimyasal özellikleri incelendi. Daha sonra her bir proteinin YZRS substratı üzerinde Raman ölçümleri gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlara göre proteinler başarılı bir şekilde tayin edildi. Her proteinin tekrarlanabilirliğinin oldukça yüksek olduğu sonucuna ulaşıldı. Son olarak her bir proteinin YZRS substratı üzerinde tespit edilebilecek en düşük derişim sınırı belirlendi ve elde edilen sonuçlar proteinlerin 0,1 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar tespit edilebileceğini gösterdi.

Elde edilen sonuçlara bakıldığında bu tez kapsamında yeni bir YZSR substratı elde edildi ve bu substrat proteinlerin tayininde başarılı bir şekilde kullanılarak tezde hedeflenen başarıya ulaşıldığı açıkça görülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] S. M. Shafi, “Nanomedicine and use of nanotechnology in drug delivery systems: A novel approach”, *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.*, c. 2, sy 3, ss. 926-930, 2011.
- [2] S. Sharma ve F. Khatoon, “Preparation And Characterization Of Chitosan-Silver Nano Composite Films And Their Antibacterial Activity”, *J. Adv. Sci. Res.*, c. 11, sy 04, ss. 225-231, 2020.
- [3] A.-G. Niculescu, C. Chircov, A. C. Bîrcă, ve A. M. Grumezescu, “Nanomaterials Synthesis through Microfluidic Methods: An Updated Overview”, *Nanomaterials*, c. 11, sy 4, Art. sy 4, Nis. 2021, doi: 10.3390/nano11040864.
- [4] S. E. McNeil, “Nanotechnology for the biologist”, *J. Leukoc. Biol.*, c. 78, sy 3, ss. 585-594, Eyl. 2005, doi: 10.1189/jlb.0205074.
- [5] Y. Chen vd., “Phase engineering of nanomaterials”, *Nat. Rev. Chem.*, c. 4, sy 5, ss. 243-256, 2020.
- [6] S. G. Penn, L. He, ve M. J. Natan, “Nanoparticles for bioanalysis”, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, c. 7, sy 5, ss. 609-615, 2003.
- [7] P. Biswas ve C.-Y. Wu, “Nanoparticles and the Environment”, *J. Air Waste Manag. Assoc.*, c. 55, sy 6, ss. 708-746, Haz. 2005, doi: 10.1080/10473289.2005.10464656.
- [8] Ş. Erkoç, “Nanobilim ve nanoteknoloji”, 2007.
- [9] E. Ü. Tunca, “Nanoteknolojinin Temeli Nanopartiküller ve Nanopartiküllerin Fitoremediasyonu”, *Ordu Üniversitesi Bilim Ve Teknol. Derg.*, c. 5, sy 2, Art. sy 2, Şub. 2016.
- [10] A. Loiseau, V. Asila, G. Boitel-Aullen, M. Lam, M. Salmain, ve S. Boujday, “Silver-based plasmonic nanoparticles for and their use in biosensing”, *Biosensors*, c. 9, sy 2, s. 78, 2019.
- [11] Z. Tüylek, “Küçük şeylerin hikâyesi: Nanomalzeme”, *Nevşehir Bilim Ve Teknol. Derg.*, c. 5, sy 2, ss. 130-141, 2016.
- [12] M. M. Miller, G. A. Prinz, S.-F. Cheng, ve S. Bounnak, “Detection of a micron-sized magnetic sphere using a ring-shaped anisotropic magnetoresistance-based sensor: A model for a magnetoresistance-based biosensor”, *Appl. Phys. Lett.*, c. 81, sy 12, ss. 2211-2213, 2002.
- [13] S. Sharifi, S. Behzadi, S. Laurent, M. L. Forrest, P. Stroeve, ve M. Mahmoudi, “Toxicity of nanomaterials”, *Chem. Soc. Rev.*, c. 41, sy 6, ss. 2323-2343, 2012.
- [14] Y. Yu, M. Guo, M. Yuan, W. Liu, ve J. Hu, “Nickel nanoparticle-modified electrode for ultra-sensitive electrochemical detection of insulin”, *Biosens. Bioelectron.*, c. 77, ss. 215-219, 2016.
- [15] E. Ediz, “Phaseolus vulgaris l.’den gümüş nanopartiküllerin biyosentezi ve antifungal etkinliklerinin incelenmesi”, Master’s Thesis, Ankara: Ankara Üniversitesi: Fen Bilimleri Enstitüsü: Biyoloji Anabilim Dalı.
- [16] N. Abid vd., “Synthesis of nanomaterials using various top-down and bottom-up approaches, influencing factors, advantages, and disadvantages: A review”, *Adv. Colloid Interface Sci.*, c. 300, s. 102597, 2022.

- [17] L. A. Kolahalam, I. K. Viswanath, B. S. Diwakar, B. Govindh, V. Reddy, ve Y. L. N. Murthy, "Review on nanomaterials: Synthesis and applications", *Mater. Today Proc.*, c. 18, ss. 2182-2190, 2019.
- [18] F. A. Khan, "Synthesis of Nanomaterials: Methods & Technology", içinde *Applications of Nanomaterials in Human Health*, F. A. Khan, Ed., Singapore: Springer, 2020, ss. 15-21. doi: 10.1007/978-981-15-4802-4_2.
- [19] Z. Vaseghi ve A. Nematollahzadeh, "Nanomaterials: types, synthesis, and characterization", *Green Synth. Nanomater. Bioenergy Appl.*, ss. 23-82, 2020.
- [20] N. Baig, I. Kammakakam, ve W. Falath, "Nanomaterials: A review of synthesis methods, properties, recent progress, and challenges", *Mater. Adv.*, c. 2, sy 6, ss. 1821-1871, 2021.
- [21] M. Kaliva ve M. Vamvakaki, "Nanomaterials characterization", içinde *Polymer science and nanotechnology*, Elsevier, 2020, ss. 401-433.
- [22] T. Mudalige, H. Qu, D. Van Haute, S. M. Ansar, A. Paredes, ve T. Ingle, "Characterization of nanomaterials: Tools and challenges", *Nanomater. Food Appl.*, ss. 313-353, 2019.
- [23] D. Brabazon ve A. Raffer, "Advanced characterization techniques for nanostructures", içinde *Emerging nanotechnologies for manufacturing*, Elsevier, 2015, ss. 53-85.
- [24] M. Kaliva ve M. Vamvakaki, "Chapter 17 - Nanomaterials characterization", içinde *Polymer Science and Nanotechnology*, R. Narain, Ed., Elsevier, 2020, ss. 401-433. doi: 10.1016/B978-0-12-816806-6.00017-0.
- [25] B. Güven, "Gıda uygulamalarına yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini temel alan biyoanaliz yöntemlerinin geliştirilmesi", *Lisans Gıda Müh. Anabilim Dalı Hacet. Üniversitesi*, 2011.
- [26] V. Sikirzhyski, A. Sikirzhyskaya, ve I. K. Lednev, "Multidimensional Raman spectroscopic signatures as a tool for forensic identification of body fluid traces: a review", *Appl. Spectrosc.*, c. 65, sy 11, ss. 1223-1232, 2011.
- [27] E. B. Hanlon vd., "Prospects for in vivo Raman spectroscopy", *Phys. Med. Biol.*, c. 45, sy 2, s. R1, 2000.
- [28] R. R. Jones, D. C. Hooper, L. Zhang, D. Wolverson, ve V. K. Valev, "Raman Techniques: Fundamentals and Frontiers", *Nanoscale Res. Lett.*, c. 14, sy 1, s. 231, Tem. 2019, doi: 10.1186/s11671-019-3039-2.
- [29] J. R. Ferraro, *Introductory Raman Spectroscopy*. Elsevier, 2003.
- [30] M. Şöföroğlu, "Yüzeyde güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi tekniği kullanılarak hedef DNA dizi tayini", 2013.
- [31] E. Smith ve G. Dent, *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. John Wiley & Sons, 2019.
- [32] A. Gözütok, "1, 4-diaminobütan molekülünün titreşim spektrumlarının teorik olarak incelenmesi", Master's Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2009.
- [33] K. Ilaslan, I. H. Boyaci, ve A. Topcu, "Rapid analysis of glucose, fructose and sucrose contents of commercial soft drinks using Raman spectroscopy", *Food Control*, c. 48, ss. 56-61, Şub. 2015, doi: 10.1016/j.foodcont.2014.01.001.
- [34] J. J. Shea, "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry", *IEEE Electr. Insul. Mag.*, c. 14, sy 6, ss. 42-42, Kas. 1998, doi: 10.1109/MEI.1998.730821.

- [35] M. A. Akçe ve Y. K. Kadioğlu, “Raman spektroskopisinin ilkeleri ve mineral tanımlamalarında kullanılması”, *Nevşehir Bilim Ve Teknol. Derg.*, c. 9, sy 2, ss. 99-115, 2020.
- [36] M. Çulha, “Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasının Biyolojik Bilimlerde Uygulamaları”.
- [37] R. A. Halvorson ve P. J. Vikesland, “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) for Environmental Analyses”, *Environ. Sci. Technol.*, c. 44, sy 20, ss. 7749-7755, Eki. 2010, doi: 10.1021/es101228z.
- [38] M. Fleischmann, P. J. Hendra, ve A. J. McQuillan, “Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode”, *Chem. Phys. Lett.*, c. 26, sy 2, ss. 163-166, 1974.
- [39] J. Guo, F. Zeng, J. Guo, ve X. Ma, “Preparation and application of microfluidic SERS substrate: Challenges and future perspectives”, *J. Mater. Sci. Technol.*, c. 37, ss. 96-103, 2020.
- [40] A. Şimşek, “Grafen alan etkili transistörlerde litografik kalıntıların SERS yöntemiyle incelenmesi”, PhD Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2014.
- [41] B. Dietzek, D. Cialla, M. Schmitt, ve J. Popp, “Introduction to the fundamentals of Raman spectroscopy”, *Confocal Raman Microsc.*, ss. 47-68, 2018.
- [42] M. Kahraman, E. R. Mullen, A. Korkmaz, ve S. Wachsmann-Hogiu, “Fundamentals and applications of SERS-based bioanalytical sensing. Nanophotonics 2017; 6 (5): 831–852”.
- [43] A. Nilghaz, S. Mahdi Mousavi, A. Amiri, J. Tian, R. Cao, ve X. Wang, “Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates for Food Safety and Quality Analysis”, *J. Agric. Food Chem.*, c. 70, sy 18, ss. 5463-5476, May. 2022, doi: 10.1021/acs.jafc.2c00089.
- [44] G. Yaman, “Alaşım nanokubbelerin hazırlanması ve karakterizasyonu”, masterThesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2018.
- [45] G. Onay, “Grafen Tabanlı Plazmonik Sensörler ve Uygulamaları”, 2019.
- [46] C. Zhou, P. Meysman, B. Cule, K. Laukens, ve B. Goethals, “Mining spatially cohesive itemsets in protein molecular structures”, içinde *Proceedings of the 12th International Workshop on Data Mining in Bioinformatics*, 2013, ss. 42-50.
- [47] S. İhsan, “Using Deep Learning (CNN, RNN, LSTM, GRU) methods for the prediction of Protein Secondary Structure”, *Acta Infologica*, c. 6, sy 1, ss. 43-52, 2022.
- [48] S. Acar, “Peptid protein kovalent konjugasyonu”, 2006.
- [49] E. Çakmak ve İ. H. Selvi, “Derin öğrenme (CNN, RNN, LSTM, GRU) kullanarak protein ikincil yapı tahmini”, *Acta Infologica*, c. 6, sy 1, ss. 43-52, 2022.
- [50] K. N. Kılınç ve G. Dönmez, “Mikroorganizmalarda Ağır Metal Stresine Yanıtın Proteom Analizi ile Araştırılması”, *Elektron. Mikrobiyoloji Derg. TR*, c. 6, ss. 27-33, 2008.
- [51] C. Yerli, T. Çakmakçı, U. Şahin, ve Ş. Tüfenkçi, “Ağır metallerin toprak, bitki, su ve insan sağlığına etkileri”, *Türk Doğa Ve Fen Derg.*, c. 9, sy Özel Sayı, ss. 103-114, 2020.
- [52] M. Kahraman, “Proteinlerin yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılmasıyla tayini için yeni yöntemlerin geliştirilmesi”, PhD Thesis, Fen Bilimleri Enstitüsü, 2011.
- [53] “Protein Nedir? Amino Asitler ve Proteinler, Canlılar İçin Neden Önemlidir? - Evrim Ağacı”. <https://evrimagaci.org/protein-nedir-amino-asitler-ve-proteinler-canlilar-icin-neden-onemlidir-11316> (erişim 07 Ağustos 2023).

- [54] U. Çelikoğlu, “Protein G Saflaştırılması İçin Biyokromatografi Materyali Geliştirilmesi”, PhD Thesis, Anadolu University (Turkey), 2018.
- [55] P. Kumar ve S. M. Sharma, “An overview of purification methods for proteins”, *Ijar*, c. 1, sy 12, ss. 450-459, 2015.
- [56] A. G. Bozkurt, “Yüzeyde güçlendirilmiş raman spektroskopisi (sers) temelli platformların geliştirilmesi ve biyoanalizlerde kullanımı”, 2018.
- [57] A. Herzog, “Of genomics, cyborgs and nanotechnology: a look into the future of medicine”, *Conn. Med.*, c. 66, sy 1, ss. 53-54, Oca. 2002.
- [58] Y. Dağlıoğlu ve M. C. Yavuz, “Nanotechnology in dentistry and their applications”, *J. Ege Univ. Sch. Dent.*, c. 41, sy 2, ss. 149-160, 2020, doi: 10.5505/eudfd.2020.48278.
- [59] S. Pang, T. P. Labuza, ve L. He, “Development of a single aptamer-based surface enhanced Raman scattering method for rapid detection of multiple pesticides”, *Analyst*, c. 139, sy 8, ss. 1895-1901, Mar. 2014, doi: 10.1039/C3AN02263C.
- [60] C. D. L. de Albuquerque ve Z. D. Schultz, “Super-resolution Surface-Enhanced Raman Scattering Imaging of Single Particles in Cells”, *Anal. Chem.*, c. 92, sy 13, ss. 9389-9398, Tem. 2020, doi: 10.1021/acs.analchem.0c01864.
- [61] L. Fabris, M. Schierhorn, M. Moskovits, ve G. C. Bazan, “Aptatag-Based Multiplexed Assay for Protein Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy”, *Small*, c. 6, sy 14, ss. 1550-1557, 2010, doi: 10.1002/sml.201000262.
- [62] C. V. Pagba, S. M. Lane, H. Cho, ve S. Wachsmann-Hogiu, “Direct detection of aptamer-thrombin binding via surface-enhanced Raman spectroscopy”, *J. Biomed. Opt.*, c. 15, sy 4, s. 047006, Tem. 2010, doi: 10.1117/1.3465594.
- [63] N. Feliu, M. Hassan, E. Garcia Rico, D. Cui, W. Parak, ve R. Alvarez-Puebla, “SERS quantification and characterization of proteins and other biomolecules”, *Langmuir*, c. 33, sy 38, ss. 9711-9730, 2017.
- [64] X. Zhang vd., “Robust and universal SERS sensing platform for multiplexed detection of Alzheimer’s disease core biomarkers using PAapt-AuNPs conjugates”, *Acs Sens.*, c. 4, sy 8, ss. 2140-2149, 2019.
- [65] O. AYDİN, “Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) ile Ovaryum Kanseri İlaç Direncinin İncelenmesi”, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilim. Enstitüsü Fen Bilim. Derg.*, c. 37, sy 3, ss. 404-411, 2021.
- [66] A. Ouhibi, A. Raouafi, N. Lorrain, M. Guendouz, N. Raouafi, ve A. Moadhen, “Functionalized SERS substrate based on silicon nanowires for rapid detection of prostate specific antigen”, *Sens. Actuators B Chem.*, c. 330, s. 129352, 2021.
- [67] Z. Guo, J. Zhao, H. He, ve Z. Liu, “Molecularly Imprinted and Cladded Nanotags Enable Specific SERS Bioimaging of Tyrosine Phosphorylation”, *Chem. Asian J.*, c. 17, sy 23, s. e202200844, 2022.
- [68] M. Arabi vd., “Label-free SERS detection of Raman-Inactive protein biomarkers by Raman reporter indicator: Toward ultrasensitivity and universality”, *Biosens. Bioelectron.*, c. 174, s. 112825, 2021.
- [69] J. Zhang, X. Ma, ve Z. Wang, “Real-time and in-situ monitoring of Abrin induced cell apoptosis by using SERS spectroscopy”, *Talanta*, c. 195, ss. 8-16, 2019.
- [70] P. C. Lee ve D. Meisel, “Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols”, *J. Phys. Chem.*, c. 86, sy 17, ss. 3391-3395, 1982.
- [71] Ayşe ÖZBAY, “Plazmonik Özellikleri Ayarlanabilir Nanokubbelerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu”, Gaziantep Üniversitesi, 2017.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Hatice ONAT

EĞİTİM

Derece	Alan	Üniversite	Yıl
Y. Lisans	Analitik Kimya	Gaziantep Üniversitesi	2023
Lisans	Kimya Bölümü	Anadolu Üniversitesi	2014