

MAYIS 2018

Yüksek Lisans - Kimya Bölümü

ADİLE TOSUN

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

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

**KİMYA BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

ADİLE TOSUN

MAYIS 2018

**Plazmonik Nanokubbeler Üzerinde Yüzeyde
Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Protein Tayini**

Gaziantep Üniversitesi

Kimya Bölümü

Yüksek Lisans Tezi

Danışman

Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN

Adile TOSUN

Mayıs 2018



© 2018 [Adile TOSUN]

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

Tezin Adı: Plazmonik Nanokubbeler Üzerinde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman
Saçılmasına Dayalı Protein Tayini

Öğrencinin, Adı Soyadı: Adile TOSUN

Tez Savunma Tarihi: 02/05/2018

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ
Enstitü ABD Başkanı

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



Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN
Tez Danışmanı

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

Jüri Üyeleri:

Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN

Doç. Dr. Tuğba TAŞKIN TOK

Dr. Öğr. Üyesi Tuba DENKÇEKEN

İmzası



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

Adile TOSUN

ABSTRACT

PROTEIN DETECTION ON PLASMONIC NANODOMES BASED ON SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING

TOSUN, Adile

M.Sc. in Chemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet KAHRAMAN

May 2018

49 pages

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a powerful technique used today for the detection and characterization of chemical and biological molecules and structures. Rapid, sensitive and accurate detection of proteins is significant in both clinical and industrial applications. In this thesis, SERS-based protein detection on plasmonic nanodomes is investigated. For this purpose, plasmonic silver nanodomes (AgNDs) are first obtained. To prepare AgNDs, 1600 nm latex particles are first deposited uniformly on a glass slide using convective-assembly method. Polydimethylsiloxane (PDMS) is poured onto prepared latex particles film and polymerized by temperature. The polymerized PDMS is removed from the surface of the film to obtain nanovoids on the PDMS. The obtained PDMS nanovoids are used as molds to prepare AgNDs. The PDMS nanovoids are filled with Ag by electrochemical coating to obtain AgNDs. The obtained AgNDs are characterized by Scanning Electron Microscopy (SEM) and Atomic Force Microscopy (AFM). The prepared AgNDs are used as SERS substrates for the protein detection. Model proteins are used to test the performance of AgNDs in protein detection. For this purpose, SERS spectra are obtained by dropping the proteins at different concentrations on AgNDs. It is determined that the reproducibility of the obtained SERS spectra is good. SERS spectra are obtained by dropping protein solutions in decreasing concentrations on AgNDs to determine the lowest detection concentration. The results demonstrate that, a detection limit down to 0.05 $\mu\text{g/mL}$ of proteins could be detected regardless of the protein type and size.

Keywords: Surface-enhanced Raman scattering, Detection, Plasmonics, Silver nanodomes, Proteins

ÖZET

PLAZMONİK NANOKUBBELER ÜZERİNDE YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA DAYALI PROTEİN TAYİNİ

TOSUN, Adile

Yüksek Lisans Tezi, Kimya Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN

Mayıs 2018

49 sayfa

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması (YZRS) günümüzde kimyasal ve biyolojik moleküllerin ve yapıların tespiti ve karakterizasyonu için kullanılan güçlü bir tekniktir. Proteinlerin hızlı, hassas ve doğru tespiti hem klinik uygulamalarda hem de endüstriyel uygulamalarda son derece önem arz etmektedir. Bu tezde plazmonik nanokubbeler üzerinde YZRS dayalı protein tespiti araştırıldı. Bu amaç için öncelikle plazmonik gümüş nanokubbeler (AgNDs) elde edildi. AgNDs hazırlamak için öncelikle 1600 nm büyüklüğünde latex parçacıkları iletim derleme yöntemi ile cam lam yüzeyine düzenli bir şekilde biriktirildi. Oluşan latex parçacıkları filminin üzerine polidimetilsiloksan (PDMS) dökülerek sıcaklıkla polimerleşmesi sağlandı. Polimerleşen PDMS film yüzeyinden sökülerek PDMS üzerinde nanoçukurcuklar elde edildi. Elde edilen PDMS nanoçukurcuklar AgNDs hazırlamak için kalıp olarak kullanıldı. PDMS nanoçukurcuklar elektrokimyasal kaplama ile Ag ile doldurularak AgNDs elde edildi. Elde edilen AgNDs Taramalı Elektron Mikroskopu (SEM) ve Atomik Kuvvet Mikroskopu (AFM) ile karakterize edildi. Hazırlanan AgNDs protein tayininde YZRS substratı olarak kullanıldı. AgNDs protein tespitinde kullanılabilirliğini test etmek için model proteinler kullanıldı. Bu amaç için farklı derişimlerdeki proteinler AgNDs üzerine damlatılarak YZRS spektrumları alındı. Elde edilen YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu belirlendi. En düşük tespit derişimi belirlemek için azalan derişimlerdeki protein çözeltilerini AgNDs üzerine damlatarak YZRS spektrumları alındı. Elde edilen sonuçlar, proteinlerin yükünden ve büyüklüğünden bağımsız 0.05 µg/mL'ye kadar proteinlerin tespitinin yapılabileceğini gösterdi.

Anahtar kelimeler: Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması, Tespit, Plazmonik, Gümüş nanokubbeler, Proteinler



Çok kıymetli aileme ve eşime

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım süresince bana yol gösteren, çalışma imkanları oluşturan sayın hocam Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN'a; deneysel çalışmalarım için sunduğu imkanlardan dolayı Gaziantep Üniversitesi'ne; elektrokimyasal kaplamada yardımcı olan sayın hocam Bingöl Üniversitesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Ramazan SOLMAZ'a; deneysel çalışmalarım süresince bana yardımcı olan arkadaşlarım Aysun KORKMAZ'a ve Tuğçe YİĞİT'e; çalışmanın Zetasizer ölçümlerinde yardımcı olan sayın hocam Doç. Dr. Mehmet DAŞDEMİR'e; elektrokimyasal kaplamada yardımcı olan arkadaşım Handan YÜKSEL'e; öğrencilik hayatımda kimya adına öğrendiğim bütün bilgiler için hocalarıma ve bu çalışmada maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (114Z414 no'lu proje) en içten dileklerimle sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT	v
ÖZET	vi
TEŞEKKÜR.....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLER LİSTESİ	xii
SEMBOLLER LİSTESİ.....	xiv
KISALTMALAR LİSTESİ.....	xv
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ VE AMAÇ	1
BÖLÜM 2.....	3
GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Raman Spektroskopisi	3
2.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS).....	5
2.3 YZRS Substratları	7
2.4 YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini.....	10
2.5 Proteinler.....	14
2.5.1 Amino Asitler	15
2.5.1.1 Amino Asitlerin Asit-Baz Özellikleri.....	16
2.5.1.2 Amino Asitlerin Işık Absorbsiyonu.....	16
2.5.2 Proteinlerin İzoelektrik pH'ları	17
2.5.3 Proteinlerin Saflaştırılması.....	17

2.5.3.1 Molekül Büyüklüğü Esas Alınarak Proteinlerin Ayrılması	17
2.5.3.2 Çözünürlüklerindeki Farklılıkları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması.....	17
2.5.3.3 Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması	18
2.5.3.4 Seçimli Adsorpsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması	18
2.5.3.5 Spesifik Ligandları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması (Afinite Kromatografisi)	18
2.5.4 Proteinlerin Molekül Ağırlıkları Tayini.....	18
2.5.5 Kullanılan Bazı Proteinlerin İşlevleri	19
BÖLÜM 3.....	20
MATERYALLER VE YÖNTEMLER	20
3.1 Cihazlar.....	20
3.2 Kimyasallar	20
3.3 Lateks Parçacıkların Cam Lam Üzerine Biriktirilmesi	21
3.4 PDMS Yüzeyinde Nanoçukurcukların Oluşturulması	23
3.5 Gümüş Nanokubbelerin (AgNDs) Hazırlanması	23
3.6 Hazırlanan Nanokubbelerin Üzerinde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Proteinlerin Tayini.....	29
BÖLÜM 4.....	31
BULGULAR ve TARTIŞMA	31
4.1 Gümüş Nanokubbelerin (AgNDs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu	31
4.2 Plazmonik Nanokubbeler Üzerinde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Protein Tayini.....	34
BÖLÜM 5.....	42
SONUÇ.....	42
KAYNAKLAR.....	44

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo 3.1 Kullanılan proteinlerin listesi.....29

Tablo 4.1 Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri.35



ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Rayleigh ve Raman saçılmalarını gösteren Jablonski enerji diyagramı [3].....	4
Şekil 2.2 Farklı şekillerdeki AgNP'lerin uyarılma verimleri (a), küre (b), küp (c) ve piramit (d) AgNP'lerin etrafında oluşan yüzey plazmonlarının simülasyonu. Küre, küp ve piramit NP'ler için hesaplanan $ E ^2$ değerleri sırasıyla 54, 745 ve 9770'dir [49].....	7
Şekil 2.3 Farklı YZRS substratlarının SEM görüntüleri. (A) Küresel altın nanopartikülleri [21], (B) altın nanoçubukları [65], (C) gümüş nanoçizgi [66], (D) gümüş plazmonik nanokubbeler [67], (E) altın nanokümeleri [68], (F) altın nano delikler [38], (G) gümüş nanoboşluklar [44], (H) gümüş nanosütun filmi [69] ve (I) gümüş nanosütunlar [70].....	9
Şekil 2.4 YZRS tabanlı protein algılama yaklaşımları. (A) YZRS bazlı proteinlerin saptanması için boya fonksiyonlu nanopartikül problemleri molekül ve protein-protein etkileşimleri [76], (B) moleküllerin antikora bağlanmasından sonra frekans kaymasına dayalı olarak yakalama ajanları [80], (C) etiketsiz protein algılama için zengin ve tekrarlanabilir YZRS spektrumları elde etmek için proteinlerin ve AgNP'lerin kontrollü agregasyonu için kullanılan iletim derleme yöntemi [81] ve (D) PAGE kullanarak proteinlerin ayrılmasını ve proteinlerin kolloidal AgNP'lar ile boyandıktan sonra YZRS ile tespit etme [82]	11
Şekil 2.5 Proteinlerin yapıları [97].....	15
Şekil 2.6 Aminoasitlerin genel yapısı.....	16
Şekil 3.1 Kurulmuş iletim derleme düzeneğinin fotoğrafı.	21
Şekil 3.2 İletim derleme düzeneğinin bileşenleri.....	21

Şekil 3.3 Latex parçacıkların iletim derleme düzeneği üzerindeki iki cam lam üzerine damlatılmasının fotoğrafı.....	22
Şekil 3.4 İletim derleme yöntemi ile cam lam üzerinde elde edilen lateks parçacıkları filmin fotoğrafı.	23
Şekil 3.5 Elektrokimyasal Ag kaplamalarda kullanılan üç elektrot sistemi.	25
Şekil 3.6 ITO elektrotun A1 banyosunda 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramı.	26
Şekil 3.7 ITO elektrotun A1 banyosunda -0,6 V'ta elde edilen kronoamperometri eğrisi.	27
Şekil 3.8 Değişik potansiyellerde (A) ve akımlarda (B) ITO üzerine elde edilmiş Ag filmleri.	28
Şekil 4.1 AgNDs'lerin hazırlanma basamaklarının şematik gösterimi	31
Şekil 4.2 Bir cam lam üzerinde biriktirilen lateks parçacıkların (1600 nm) (A), PDMS nanoçukurçukların (B), ve elde edilen AgNDs (C) SEM görüntüleri.....	32
Şekil 4.3 1600 nm lateks parçacıkların (A), PDMS nanoçukurçukların (B), ve oluşan AgNDs (C) 3D AFM görüntüleri.	33
Şekil 4.4 1600 nm büyüklüğündeki lateks parçacıklar kullanılarak elde AgNDs AFM görüntüleri A) 20x20µm, B) 5x5µm C) çizgi analizi.....	33
Şekil 4.5 Kullanılan model proteinlerin bazılarının hidrodinamik çapları.....	34
Şekil 4.6 HSA ve Avidin protein çözeltilerinin zeta potansiyel grafikleri.	34
Şekil 4.7 50x objektifle alınan ışın mikroskop görüntüleri A) AgNPs, B) AgNPs-BSA, C) AgNPs-Lizozim ve D) C ve D görüntüsünden alınan YZRS spektrumları.....	36
Şekil 4.8 AgNDs ve üzerine 5 µL hemoglobin (50µg/mL) damlatılan AgNDs.	37
Şekil 4.9 AgNDs üzerine damlatılan hemoglobin ve avidin proteinlerden elde edilen YZRS spektrumları (protein derişimleri 50µg/mL'dir).....	38
Şekil 4.10 AgNPs ile karıştırılan ve AgNDs üzerine damlatılan lizozim ve BSA proteinlerden elde edilen YZRS spektrumları.....	39
Şekil 4.11 AgNDs üzerine damlatılan proteinlerin azalan derişime bağlı olarak elde edilen YZRS spektrumları.....	41

SEMBOLLER LİSTESİ

Cr	Krom
CaF ₂	Kalsiyumflorür
KCl	Potasyumklorür
KNO ₃	Potasyum nitrat
CuSO ₄ .5H ₂ O	Bakır sülfat pentahidrat
NiSO ₄ .7H ₂ O	Nikel (II) sülfat hekzahidrat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O	Sodyum sitrat dihidrat
AgNO ₃	Gümüş nitrat
NH ₃	Amonyak
Ag	Gümüş
Ni	Nikel
-NH ₂	Amino grubu
-COOH	Karboksil grubu
Δ	Dalga boyundaki değişim
λ	Dalgaboyu

KISALTMALAR LİSTESİ

2D PAGE	İki Boyutlu Poliakrilamid Jel Elektroforez (Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
CE	Kapiler Elektroforez (Capillary Electrophoresis)
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans (Nuclear Magnetic Resonance)
IR	İnfrared
YZRS	Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması/Spektroskopisi
SERS	Surface-Enhanced Raman Scattering/Spectroscopy
EDX	Enerji Dispersif X-Işınları (Energy-Dispersive X-ray)
FT-Raman	Fourier Dönüşümlü Raman Spektrometreleri
MS	Kütle Spektroskopisi
SDS-PAGE	Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi
PI	İletim Derleme Düzeneği
NDs	Nanokubbe
AgNDs	Gümüş nanokubbeler
SEM	Taramalı Elektron Mikroskopi (Scanning Electron Microscope)
AFM	Atomik Güç Mikroskopi (Atomic Force Microscope)
PDMS	Poli-dimetilsiloksan
ITO	Indium Thin Oxide
PVD	Fiziksel Buhar Biriktirme
AgNP	Gümüş Nanoparçacık

MA	Moleküler Ağırlık
pI	İzoelektrik Nokta
BSA	Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
Hb	Hemoglobin
HSA	İnsan Serum Albumin (Human Serum Albumin)
Nm	Nanometre
mm	Milimetre
cm	Santimetre
m	Metre
mg	Miligram
µg	Mikrogram
mL	Mililitre
µL	Mikrolitre
s	Saniye
Hz	Hertz

BÖLÜM 1

GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde proteinlerin yapı ve işlevinin tayininin yanısıra minimum miktardaki proteinlerin varlığı ve diğer moleküller ile etkileşiminin tespiti önemli yer tutmaktadır. Birçok hastalığın teşhisinde yol gösterici olan proteinler; sadece klinik uygulamada değil ilaç, gıda ve temizlik ürünlerinde de karşımıza çıkmaktadır.

Protein tayininde uygulanan işlemlerde öncelikle proteinlerin ayrılması ve saflaştırılması için kromatografik yöntemlere başvurulur. İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforez (2D PAGE), Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC), Kapiler Elektroforez (CE) ile ayrışma ve saflaştırma işlemi sağlanır. Daha sonra enzim ile parçalanıp Kütle Spektroskopisi (MS) ile incelenir. Bu şekilde alınan parmak izi ile protein dizilimi ve 3 boyutlu yapısı tahmin edilir. Bunların yanısıra X-ışınları kristalografisi ve Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) spektroskopide protein yapısı belirlemede tercih edilmektedir [1].

Proteinlerin diğer moleküller ile etkileşimini açığa kavuşturmak için kemüliminesans ve floresans metotları kullanılmaktadır. Bu tekniklerin yanında Infrared (IR) tekniği de kullanılmaktadır. Özellikle moleküllerin kimyasal yapısı ile ilgili bilgi vermesi biyolojik molekül karakterizasyonunda kullanılabilmektedir. Fakat IR spektroskopisi suyun girişimi nedeniyle sorun çıkarmaktadır. Bu nedenle Raman spektroskopisinin kullanılması daha avantaj sağlamaktadır. Çünkü Raman spektroskopisi sudan çok az etkilenir. Ayrıca katı, sıvı, gaz farketmeksizin analiz edilebilmektedir. Numune hazırlamanın kolay oluşu ve sulu örneğin analiz edilebilir olması Raman spektroskopi tekniğini daha çok tercih edilmektedir. Fakat düşük dalga boylu lazer kullanıldığı takdirde saçılma ile floresans spektrumuda alınmaktadır. Proteinlerin polarizasyonu için yüksek enerjili lazer ışınları yapıların parçalanmasına neden olur. Bu sorun düşük enerjili uzun dalga boylu lazerler kullanılarak ortadan kaldırılmaktadır. Karşımıza çıkan ikinci sorun ise Raman saçılmasının zayıf olmasıdır. Günümüzde bu sorunu ortadan kaldırma ve Raman saçılımını zenginleştirmek için yeni bir teknik geliştirilmiştir. Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması (YZRS) kolloidal

nanoparçacıklar (altın, gümüş, bakır) yüzeyine veya bu metaller kullanılarak oluşturulan ince film yüzeylerine adsorplanmış örneklerden Raman spektrumlarını elde etmeye dayanır. Zenginleştirme yöntemi elektromanyetik ve kimyasal zenginleştirme olmak üzere iki şekilde karşımıza çıkmaktadır. Molekül ve nanoparçacık arasındaki yük transferinden kaynaklanan kimyasal zenginleştirme olarak adlandırılırken nanoparçacıkların kendi etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlarından kaynaklanan elektrokimyasal zenginleştirme olarak adlandırılır. Raman saçıcılar yoğun elektromanyetik alan ile etkileştikleri zaman indüklenmiş dipol moment büyüklüğü artar ve buna bağlı olarak elastik olmayan Raman saçılmasının şiddeti artar. Kimyasal zenginleştirmeye göre alınan saçılma şiddeti daha yüksek olduğu için elektromanyetik zenginleştirmeye dayalı çalışmalar daha çok ilgi görmüştür. YZRS'nin düşük derişimlerde tek moleküle kadar hassas sonuçlar vermesi günümüz çalışmalara ışık tutucu niteliktedir.

Bu tez çalışmasında plazmonik nanokubbeler üzerinde YZRS dayalı protein tespiti araştırıldı. Bu amaç için öncelikle gümüş nanokubbeler (AgNDs) elde edildi. AgNDs hazırlamak için öncelikle 1600 nm büyüklüğünde latex parçacıkları iletim derleme yöntemi ile cam lam yüzeyine düzenli bir şekilde biriktirildi. Oluşan latex parçacıkları filminin üzerine polidimetilsiloksan (PDMS) dökülerek sıcaklıkla polimerleşmesi sağlandı. Polimerleşen PDMS film yüzeyinden söklerek PDMS üzerinde nanocukurcuklar elde edildi. Elde edilen PDMS nanoçukurcuklar AgNDs hazırlamak için kalıp olarak kullanıldı. PDMS nanoçukurcuklar elektrokimyasal kaplama ile Ag ile doldurularak AgNDs elde edildi. Elde edilen AgNDs taramalı elektrok mikrokopu (SEM) ve atomik kuvvet mikroskopi (AFM) ile karakterize edildi. Hazırlanan AgNDs protein tayininde YZRS substratı olarak kullanıldı. AgNDs protein tespitinde kullanılabilirliğini test etmek için model proteinler kullanıldı.

BÖLÜM 2

GENEL BİLGİLER

2.1 Raman Spektroskopisi

Bazı moleküllere gönderilen ışının bir kısmını saçılmaya uğradığını ve dalga boyundaki kaymaların saçılmaya neden olan moleküllerin kimyasal yapısına bağlı olduğunu 1928’de Hintli fizikçi C.V. Raman açıklamış ve bu açıklaması ile 1931 yılında Nobel Fizik ödülüne layık görülmüştür.

Monokromatik ışık üretebilen bir lazer kaynağıyla numuneyi görünür bölge (400-800 nm) ya da yakın-IR ‘de (800 nm-2500 nm) ışınlama sonucu Raman spektrumları ölçülür. Saçılan ışının spektrumları ışınlama süresi boyunca genellikle 90° de ölçülür. Uyarma dalga boyu numunenin absorpsiyon dalga boyundan uzakta seçilir böylece floresans oluşması önlenir. Raman çizgilerinin şiddeti, kaynak şiddetin %0,001’i kadar fazladır. Bu nedenle dedekte edilmesi ve ölçülmesi IR titreşim bantlarından daha güçtür [2].

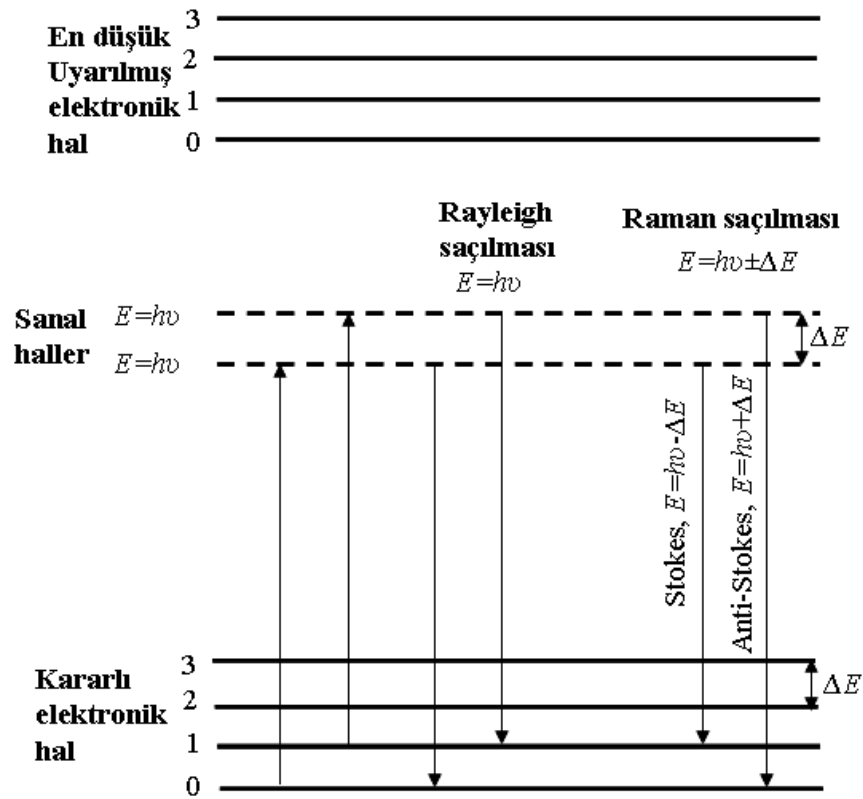
Kaynaktan numune üzerine düşen ışınlar, her doğrultuda saçılmaya uğrar. Gelen ışın, bir sanal enerji düzeyine uyarma sağlar ve sonra kaynak ışınına saçılan Raman fotonları moleküllerin titreşim hallerine bağlı olarak daha düşük ya da daha yüksek enerjili bir foton yayılır. Yayılan ışının frekansı uyaran ışınıkinden daha küçük ise, bu olaya “Stokes Saçılması” denir. Titreşimsel uyarılmış bir haldeki moleküllerde esnek olmayan bir süreçle ışın saçıp enerjisi olan bir Raman sinyali verebilir. Frekansı kaynak ışınıkinden daha yüksek olan saçılmış ışınlar Anti-Stokes saçılmadır. Temel titreşim enerji düzeyi uyarılmış titreşim düzeylerine göre, daha yüksek popülasyonlu olduğu için stokes hatları anti-stokes hatlarından daha şiddetlidir. Bu nedenle spektrumun sadece stokes kısmı kullanılmaktadır. Ayrıca floresans, anti-stokes bölgesine değil, stokes bölgesine önemli girişim getirir. Bu nedenle floresans gösteren numunelerde anti-stokes sinyalleri daha düşük şiddetlerine rağmen daha yararlı olduğu söylenebilir.

Enerjisi, uyaran fotonun enerjisi $h\nu_{\text{ex}}$ olan esnek saçılmalarda vardır ve bunlara "Rayleigh saçılması" denir. Rayleigh saçılmasının enerjisi ile kullanılan ışığın enerjisi aynıdır. Raman kayması dalga sayısı (veya Δ) olarak verilir. Raman kayması aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanır.

$$\text{Raman kayması (cm}^{-1}\text{)} = (1/\lambda_{\text{kullanılan ışın}}) - (1/\lambda_{\text{saçılan ışın}})$$

Saçılan ışının dalgaboyu kullanılan ışının dalga boyundan büyük olması stokes saçılmasıdır. Bu nedenle Raman kayması pozitif bir değer alır. Fakat anti-stokes saçılmasının dalga boyu daha küçük olduğundan Raman kayması negatif değer alır.

Raman ve Rayleigh saçılımlarının açıklanması nicel olarak aşağıdaki diyagram ile açıklanır.



Şekil 2.1 Rayleigh ve Raman saçılmalarını gösteren Jablonski enerji diyagramı [3].

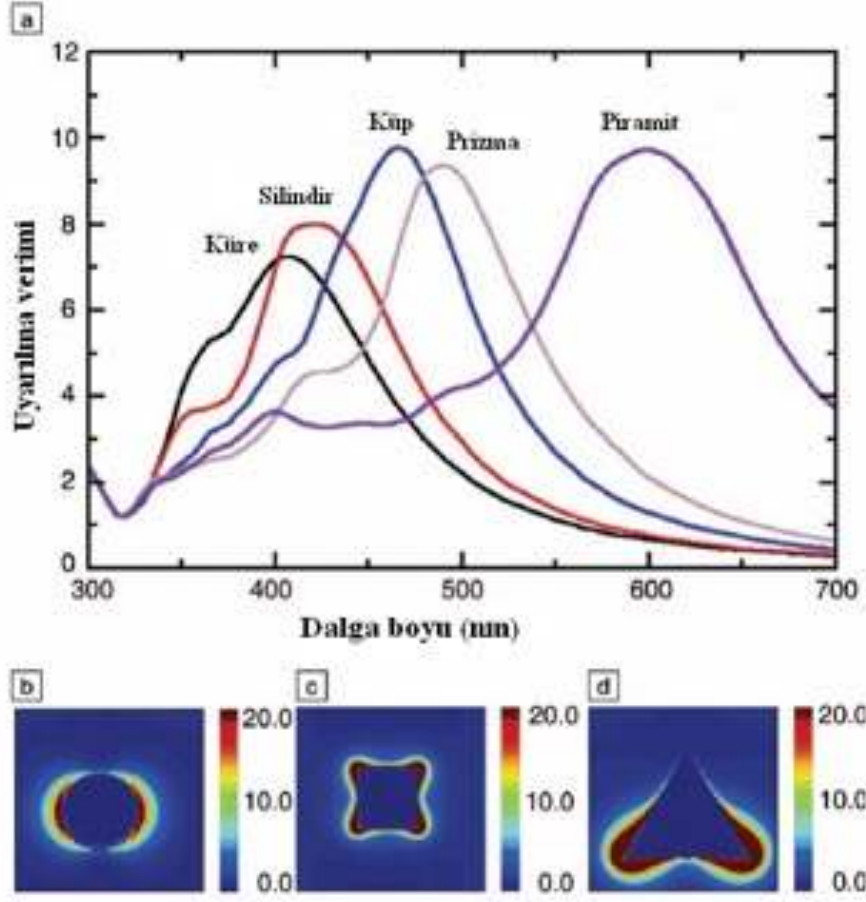
Baştaki ok, kaynaktan gelen bir fotonla etkileştiğinde, moleküldeki enerji değişimini gösterir. Enerjideki artış, foton enerjisine ($h\nu_{\text{ex}}$) eşittir. Burada kuvantlaşma olmadığına dikkat edilmelidir. Kaynaktan gelen ışının frekansına bağlı olarak molekülün enerjisi, temel hal ile diyagramın üst bölgesinde gösterilen birinci elektronik uyarılmış hal arasında sanal haller diye bilinen sonsuz sayıdaki değerden herhangi birini alabilir. İkinci ok ise; fotonla karşılaşan molekülün, elektronik temel

halin birinci titreşim düzeyinde bulunması durumunda ortaya çıkabilecek değişim tipini göstermektedir. Ortadaki iki ok, Rayleigh saçılımını oluşturan değişimleri gösterir. Rayleigh saçılımında enerji kaybı olmadığına dikkat edilmelidir. Sonuç olarak foton ve molekül arasındaki çarpışmaların "esnek" olduğu söylenir. Stokes ve Anti-stokes emisyonunu oluşturan enerji değişimi ise sağ tarafta verilmektedir. Bu enerjiler, birbirinden Rayleigh ışınından temel halin birinci titreşim düzeyinin enerjisi olan $\pm\Delta E$ ' ye karşı gelen frekanslar kadar farklıdır. Bağ IR aktifse, bağın absorpsiyon enerjisinin de ΔE kadar olacağına dikkat edilmelidir. Burdan Raman frekans kayması ve IR absorpsiyon pik frekansının özdeş olduğu belirlenir [3].

2.2 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS)

YZRS, bu moleküllerin tek molekül seviyesine kadar olan duyarlılıkları ile ilgili bilgileri ayrıntılı olarak elde etmek [4-7], için metalik nanoyapıların yakın çevresinde bulunan moleküllerin Raman sinyalinin zenginleştirilmesini kullanan güçlü bir tekniktir [8-10]. Raman sinyalinin zenginleştirilmesi elektromanyetik zenginleştirme [11,12] ve kimyasal zenginleştirme olmak üzere iki mekanizmaya dayanır [13,14]. Elektromanyetik zenginleştirme, soy metal nanoyapılarının yüzey plazmonlarının (Surface Plasmons-SP) uyarımından kaynaklanmaktadır. Bir Raman saçılım molekülü, metal yüzeyler üzerinde üretilen yoğun elektromanyetik alanlara maruz kaldığında, daha yüksek elektrik alan yoğunluğu, molekülün daha güçlü bir polarizasyona neden olur ve dolayısıyla yüksek indüklenen dipol momenti elde edilir. Bu doğrudan Raman dağınık ışığının yoğunluğuyla ilgilidir. Elektromanyetik zenginleştirme mekanizmanın (10^4 - 10^7 'nin zenginleştirme katkısı) ana bileşenidir [15]. Kimyasal zenginleştirme, plazmonik nanoyapılardaki metal ve adsorbe moleküller arasında yük aktarımından kaynaklanmaktadır. Kimyasal zenginleşmenin katkısı daha küçüktür (10 - 10^2 faktörü) ve büyüklüğü molekülün kimyasal yapısına bağlıdır [15-18]. Elektromanyetik zenginleştirmenin katkısı daha büyük olduğundan araştırmalar, tekrarlanabilirliği iyi ve yüksek zenginleştirme faktörüne sahip substratlar elde etmek için yeni plazmonik yapıların üzerine odaklanmaktadır. Plazmonik özellikler, plazmonik nanoyapıların büyüklüğünün [19-23], şeklinin, türünün [24-32], bileşiminin [33-35] ve boyutunun (2D ve 3D) [36-44] değiştirilmesi ile ayarlanabilir. Nanoyapıların plazmonik özellikler ayarlandığında, SP'lerin rezonans frekansı (veya dalga boyu) değişmektedir. Daha yüksek YZRS zenginleştirme faktörleri, nanoyapının SP'lerinin dalga boyu (λ_{SP}), uyarım dalga boyu (λ_{exc}) ile Raman

sinyalinin dalga boyu (λ_{RS}) arasında olduğunda elde edilebilmektedir. Teorik ve deneysel sonuçlar, λ_{SP} 'nin λ_{ex} ve λ_{RS} 'nin ortalamasına eşit olduğunda, yani $\lambda_{SP} = 1/2$ olduğunda ($\lambda_{exc} + \lambda_{RS}$) maksimum zenginleştirme gerçekleştiğini göstermiştir [15, 45–48]. Nanoyapıların plazmonik özelliklerinin ayarlanması aynı zamanda, monokromatik ışığa maruz bırakıldığında yüzey üzerinde oluşturulan elektromanyetik alanın büyüklüğünü değiştirmektedir. Plazmonik nanoyapılar üzerinde üretilen elektromanyetik alanın yoğunluğu ve dağılımı, plazmonik nanoyapılar üzerinde üretilen elektromanyetik alan yoğunluğunun dördüncü gücü ile doğru orantılı olan YZRS zenginleştirme faktörünü büyük ölçüde belirlemektedir [49, 50]. Bu nedenle, yoğun elektrik alanları sahip plazmonik yapıların geliştirilmesi üzerine çalışmalar giderek artmaktadır. Elektrodinamik hesaplamalar, çeşitli geometrilerin nano yapılarında ışık tarafından üretilen SP'lerin rezonans frekansı ve elektrik alan şiddetini tahmin etmede yardımcı olabilmektedir [49,51,52]. Örnek olarak, Şekil 2.2'de, zenginleştirme faktörünü hesaplamak için Discrete dipole approximation (DDA) yöntemi kullanılarak farklı şekillere sahip olan gümüş nanopartiküllerin (AgNP'lerin) plazmonik özelliklerinin elektrodinamik hesaplamalarını göstermektedir [49]. Şekil 2.2 b-d, λ_{max} 'a karşılık gelen dalga boyları için parçacıkların üçünde $|E|^2$ 'nin yükseltilerini ve en büyük $|E|^2$ 'ye yol açan kutuplaşmalar için yükseltileri göstermektedir.



Şekil 2.2 Farklı şekillerdeki AgNP'lerin uyarılma verimleri (a), küre (b), küp (c) ve piramit (d) AgNP'lerin etrafında oluşan yüzey plazmonlarının simülasyonu. Küre, küp ve piramit NP'ler için hesaplanan $|E|^2$ değerleri sırasıyla 54, 745 ve 9770'dir [49].

Moleküllerden yüksek YZRS zenginleşmesi elde etmek için, moleküllerin YZRS substratlarına kovalent olarak bağlı ya da birkaç nanometre aralığında yakınında olması gerekmektedir. Molekül ve substrat arasındaki mesafe azaldığında, daha büyük YZRS zenginleşmesi elde edilmektedir [53, 54].

2.3 YZRS Substratları

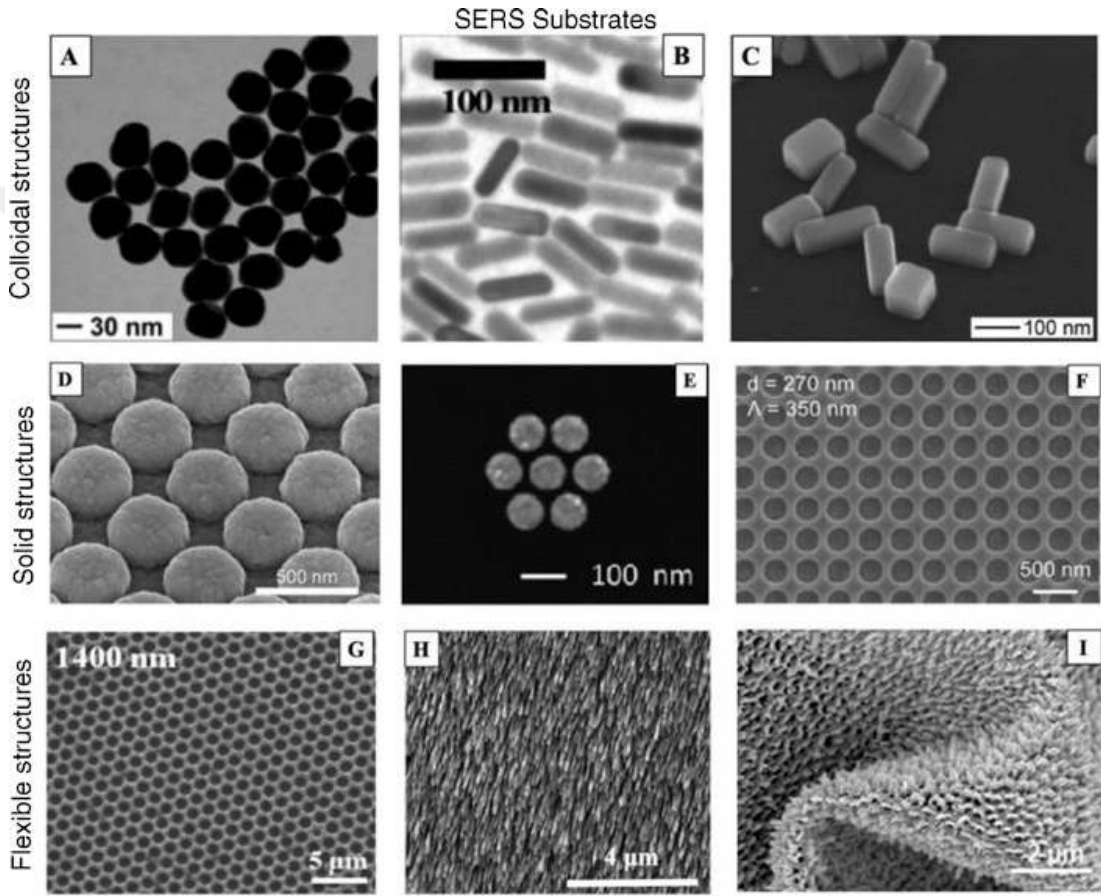
YZRS deneylerinde çoğunlukla kullanılan iki tip YZRS substratı vardır: koloidal süspansiyonlar (NP) ve katı substratlar. Koloidal süspansiyonlar hazırlığının kolaylığı ve nispeten yüksek YZRS zenginleştirme faktörüne sahip olması nedeniyle yaygındır. Moleküller ya da moleküler yapılar önemli bir YZRS zenginleşmesi için 1-4 nm aralığında soy metal nanoyapılarına ya da yakınlara bağlanmalıdır. Bu mesafenin, moleküller ve nanoyapılı yüzeyler arasındaki etkileşimlerin doğasından etkilenmesi nedeniyle, moleküllerin ve moleküler yapıların yük özellikleri, YZRS tabanlı Raman ölçümlerinin performansında önemli bir rol oynamaktadır. Koloidal soy metal NP'ları

kullanıldığında, NP'ların yüzey yükü ve molekül yükü dikkatli bir şekilde düşünülmelidir [55, 56]. Saptanan moleküller etkileşen kolloidal NP'ların zıt yüküne sahip olduklarında YZRS performansı daha güçlüdür. Bunun nedeni, NP'ların azaltılmış zeta potansiyelinin neden olduğu indüklenen agregasyona bağlı olmasıdır [56]. NP'lar toplandığında YZRS performansı da artar. Bu toplanmayı kontrol etmek, "sıcak-nokta" oluşumu ihtimalinin artması nedeniyle daha yüksek YZRS zenginleştirilmesi elde edilmektedir [57, 58]. Bununla birlikte, çok büyük yığıntılar oluştuğunda, yığıntı içindeki elektron bulutunun bozulması ve sönmesinden ötürü SP'lerin etkin oluşumunu azaltmaktadır ve buna bağlı olarak zayıf YZRS aktivitesi elde edilmektedir. 200-300 nm AgNP'dan oluşan küçük yığıntılar genel olarak en büyük zenginleştirme faktörlerine ulaşmaktadır [59]. Bir diğer önemli husus, görünür ve yakın kızılötesi (NIR) aralıkları daha erişilebilir hale getiren optik bileşenlerin ve dedektörlerin kullanılabilirliği ve maliyetiyle ilgilidir. Dalgaboyu seçiminde (yalnızca YZRS uygulamaları için) başka bir faktör de plazmon rezonans emilim bandının konumudur. Maksimum YZRS sinyali, lazer dalga boyu, plazmonik rezonansa kıyasla hafifçe mavi kaydırılmış olarak ayarlandığında elde edilmektedir [60]. Uygulamada, malzeme ve yapı değişiklikleri yoluyla plazmonik rezonansı ayarlamak daha kolay olmaktadır. Bu nedenle, sayısız ve çeşitli plazmonik nanoyapılar imal edilmiştir.

Al ve Cu da dahil olmak üzere çoğu metal UV bölgesinde plazmonik özellikler göstermektedir ve bu nedenle YZRS substratları olarak kullanılmaktadır [61, 62]. Cu ve Al bazlı nanoyapılar diğer metallerden daha ucuz olsa da oksidasyon ve nispeten düşük zenginleştirme faktörü sahip olmaları ciddi dezavantajlar sağlamaktadır. Günümüze kadar, Au ve Ag temelli plazmonik nanoyapılar, daha yüksek zenginleştirme faktörleri ve görünür ve NIR bölgelerinde plazmonik rezonansların bulunması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır [60]. Bununla birlikte, plazmonik rezonansın ayarlanabilirliği Ag için (300-1200 nm) Au (500-1200 nm) 'dan daha geniştir. Nanoyapılar üzerinde üretilen SP'lerin yoğunluğu / büyüklüğü, w , uyarım frekansı ve ϵ_r ve ϵ_i gerçekte ve sanal bileşenleri olan Q faktörü $Q = w (d\epsilon_r / dw) / 2 (\epsilon_i)^2$ ile doğru orantılıdır. Metal dielektrik fonksiyonu, her ikisi de ışığın uyarma dalga boyu ile değişmektedir. Ag, spektrum boyunca en büyük Q 'ya sahiptir ve bu nedenle en büyük zenginleştirme faktörünü Ag ile elde edilmektedir [63, 64]. Ag'in diğer bir avantajı, Au'a kıyasla daha düşük maliyetli olmasıdır. Ag, nispeten düşük maliyet,

geniş ayarlanabilirlik aralığı ve yüksek zenginleştirme faktörü nedeniyle analitik YZRS ölçümleri için mükemmel bir YZRS substratı olmaktadır.

Analitik YZRS'de kullanılan spesifik malzemelere ek olarak, büyüklük, şekil, boyut ve bileşim özellikleri de son derece önemlidir. Kısaca, YZRS substratları kolloidal, katı ve esnek yapılar olmak üzere üç ana gruba ayrılmaktadır. Şekil 2.3'te literatürde farklı yöntemler kullanılarak üretilen bazı YZRS substratların taramalı elektron mikroskobu (SEM) görüntüleri verilmektedir.



Şekil 2.3 Farklı YZRS substratlarının SEM görüntüleri. (A) Küresel altın nanopartikülleri [21], (B) altın nanoçubukları [65], (C) gümüş nanoçizgi [66], (D) gümüş plazmonik nanokubbeler [67], (E) altın nanokümeleri [68], (F) altın nano delikler [38], (G) gümüş nanoboşluklar [44], (H) gümüş nanosütun filmi [69] ve (I) gümüş nanosütunlar [70].

Kolloidal gümüş nanoparçacıkları kullanılarak tek bir molekülün tespit edilebileceği literatürde gösterilmiştir [71].

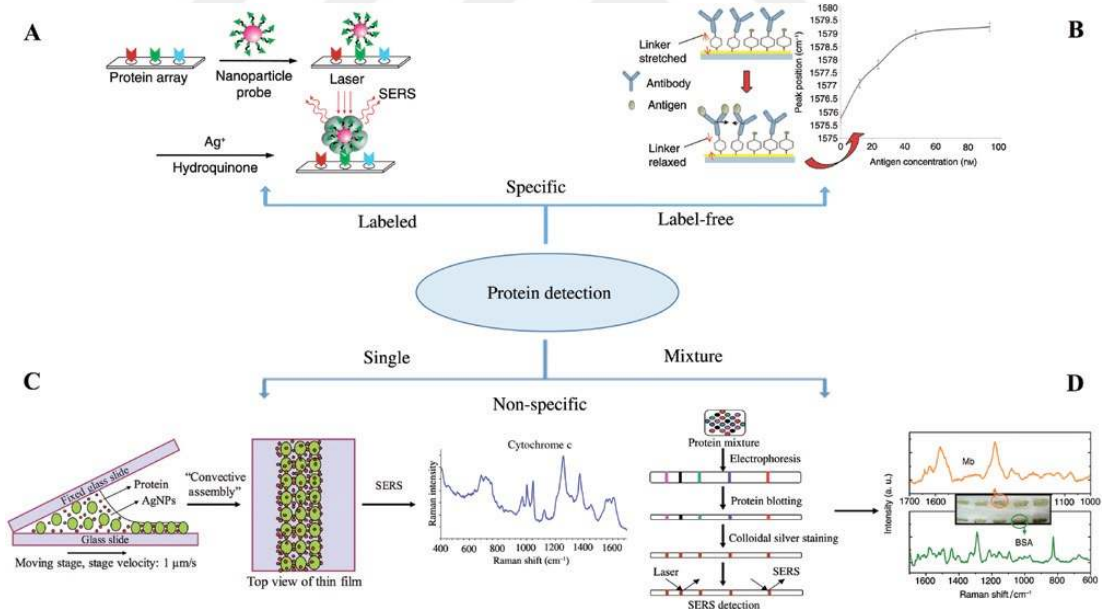
2.4 YZRS'ye Dayalı Proteinlerin Tayini

Proteinlerin doğru, hassas, hızlı tanınması ve karakterizasyonu hem klinik hem de endüstriyel uygulamalarda önemli yer tutmaktadır. Enzimler veya hormonlar olarak taşıyıcı mekanizmalara dahil olabilirler. Protein tayini ve tanısı genel olarak iki yaklaşım türüne dayanır. Birincisi floresans ölçümlerine dayalı antikor-antijen etkileşimini kullanan bir bağışıklık-bazlı (immünoassay) yöntemdir [72]. Bununla birlikte, boyaların geniş emisyon spektrumları çoklu analizi zorlu hale getirmektedir ve foto parçalanma nedeniyle tespit limitleri daha yüksektir [73]. Ayırıştırma ve saflaştırma için ikinci yaklaşım türü MS'dir [74,75]. MS tabanlı algılama hassas ve güvenilir olmasına rağmen, verileri yorumlamak için yüksek maliyet ve zamana ihtiyaç olması bu tekniğin dezavantajıdır.

YZRS kullanılarak biyolojik moleküllerin ve yapıların tanımlanması “parmak izi” özelliği ve suyun sinyal üzerindeki sınırlı etkisi nedeniyle daha caziptir. Dar bant genişliğine sahip tepe noktalarında, spektrumlar eşsiz parmak izleri oluşturarak daha büyük, farklı ve özgünlük sağlamaktadır. Suyun sınırlı etkisi, sudaki çözeltilerin ve minimum işlenmiş biyolojik örneklerin algılanmasında avantaj sağlamaktadır.

YZRS yöntemiyle proteinlerin tespiti spesifik veya non-spesifik olabilmektedir. Spesifik olarak proteinlerin tespit edilmesi için antikorlar veya aptamerler (nükleik asit çeşitidir) gibi hedefleyici ajanlar kullanılmaktadır. Spesifik olmayan tespit yönteminde ise proteinlerden parmak-izi olarak elde edilen spektrumlar kullanılmaktadır. Literürde rapor edilen protein tespit yöntemlerinin sınıflandırılması ve şematik olarak gösterilmesi Şekil 2.4'te verilmektedir. YZRS'de proteinlerin spesifik tespiti için hedefleme ajanları kullanılmaktadır. Raman etiket molekülleri ve hedefleme ajanları kullanıldığında bu yol spesifik ve etiketli olarak sınıflandırılmaktadır. Ancak sadece yakalama ajanları kullanıldığında bu yöntem, protein tespiti ve tanımlanması için spesifik ve etiketsiz olarak sınıflandırılmaktadır. Raman etiket molekülleri, YZRS bazlı ümmunolojik testlerde giderek popüler hale gelmektedir. Bu çalışmalarda Raman etiketli molekülleri (Raman aktif moleküller), metalik nanoparçacıklar yüzeyine hedefleme ajanlar ile birlikte kovalent bağ ile bağlanmaktadır. Proteinler ve hedefleme ajanları arasındaki bağlanma meydana geldiğinde, boyalardan elde edilen spektrumdaki bir değişiklik, belirli moleküllerin varlığını göstermektedir [80].

Literatürde boya fonksiyonlu nanoparçacıklar proteinlerin bağlanması için kullanılmış ve protein-küçük molekül ve protein-protein etkileşimlerini saptamak için YZRS yöntemi kullanılmıştır [76]. Prostat Spesifik Antijen'nin (PSA) tespiti için yeni bir YZRS tabanlı immünoassay yöntemi geliştirilmiştir. Bu çalışmada 30 nm AuNP'ler YZRS substratı olarak kullanılmış ve Raman etiketi kullanılarak biyoseçici hedefleme ajanı ise spesifik PSA tespiti yapılmıştır. Sonuçlar, PSA'nın sırasıyla insan serumu ve sığır serum albümininde yaklaşık $s \cong 1 \text{ pg / mL}$ ve yaklaşık $s \cong 4 \text{ pg / mL}$ 'ye kadar düşük tespit edilebileceğini göstermiştir [77]. Hepatit B virüsü (HBV) yüzey antijeninin saptanması için YZRS tabanlı bir immünoassay geliştirilmiştir. HBV hedefleme ajanı için spesifik bir antikör ile merkaptobenzoik asit (MBA-Raman etiketi) ile modifiye edilmiş AuNP'lar kullanılmıştır. [78]. Ag / SiO₂ çekirdek kabuğu Raman etiketleri hazırlanarak hepatoselüler karsinom tanısı için kullanılan bir tümör biyobelirteci olan insan α -fetoprotein'in hızlı, ucuz ve basit tespiti için YZRS'ye dayalı tespit yöntemi geliştirilmiştir [79]. Ayrıca yüzeyde zenginleştirilmiş rezonans Raman saçılması (YZRRS) da immünoassay temelli protein tespiti için kullanılmıştır.



Şekil 2.4 YZRS tabanlı protein algılama yaklaşımları. (A) YZRS bazlı proteinlerin saptanması için boya fonksiyonlu nanopartikül problemleri molekül ve protein-protein etkileşimleri [76], (B) moleküllerin antikora bağlanmasından sonra frekans kaymasına dayalı olarak yakalama ajanları [80], (C) etiketsiz protein algılama için zengin ve tekrarlanabilir YZRS spektrumları elde etmek için proteinlerin ve AgNP'ların kontrollü agregasyonu için kullanılan iletim derleme yöntemi [81] ve (D) PAGE kullanarak proteinlerin ayrılmasını ve proteinlerin koloidal AgNP'lar ile boyandıktan sonra YZRS ile tespit etme [82].

İlk kez bir mikrotitrasyon plakasının altında bir YZRS tabanlı immünoassay bildirilmiştir [83]. Bu çalışmada, bir Raman prob olarak fluorescein izotiyosiyanat kullanılmış ve ELISA yöntemi ile karşılaştırılmıştır. YZRS yöntemi ve ELISA, 0.2 ng / ml'lik benzer LOD'lar sağlamıştır. Sonuçlar, önerilen YZRS tabanlı immünoassayın yüksek hassasiyetli ve yüksek verimli bir immünoassay olarak büyük potansiyele sahip olduğunu göstermiştir. YZRS spektrumundaki pik kayması ayrıca spesifik etiketsiz protein tespiti için kullanılmıştır [80-85]. Bu yaklaşımı açıklayan raporlarda, ilgilenilen moleküllere kimyasal bağlanma üzerine yakalayan maddelerin Raman frekans kaymaları ölçülmüştür. Bu şekilde elde edilen tepe kaymaları, frekans kaymasının analit konsantrasyonu ile doğrudan doğruya orantılı olması nedeniyle bağlamanın kantitatif analizi için kullanılmıştır. Protein-protein ve protein-ligand etkileşimlerinin saptanması için YZRS temelli immunoassay'a dayanan yeni bir yöntem bildirilmiştir [86]. Bu tür çalışmalar, yüksek hassasiyetli ve yüksek verimli çip temelli protein ölçümleri için büyük potansiyele sahiptir.

Spesifik olmayan etiketsiz protein tespitinde, proteinlerin spektrumlarını kullanılmaktadır. Kolloidal NP'lar ve metalik nanoyapılar etiketsiz YZRS protein tespiti için substratlar olarak kullanılmıştır. Moleküller veya molekül yapılar, tatmin edici bir YZRS zenginleştirilmesi için yüzeylerde veya soy metal nanoyapıların yüzeyine yakın olmalıdır. Moleküllerin ve moleküler yapıların yük özellikleri, moleküllerin ve nanoyapılı yüzeylerin arasındaki mesafeyi belirledikleri için bu ölçümlerin gerçekleştirilmesi önemlidir. Kolloidal soy metal NP'lar kullanıldığında, NP'ların ve moleküllerin yüzey yük özellikleri dikkatlice düşünülmelidir [55, 56]. Kolloidal NP'ların zıt yüküne sahip olan moleküllerin YZRS aktivitesi, NP'larda azaltılmış zeta potansiyelinin neden olduğu indüklenen agregasyon nedeniyle daha üstündür [55]. Kontrollü agregasyon, AuNPs veya AgNPs gibi kolloidal NP'lar substrat olarak kullanıldığında YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirlik ve yoğunluğunu arttırmaya yardımcı olmaktadır. Proteinler, ortam pH'ına bağlı olarak değişen miktarlarda yük taşıyabilir, bu nedenle NP'ların yük özellikleri de dikkate alınmalıdır. Kolloidal NP'ları, özellikle AgNP'ları üstün plazmonik özelliklerinden dolayı kullanan etiketsiz protein tespiti için birkaç rapor bulunmaktadır. Bir heme grubu taşıyan proteinler YZRS ile özellikle iyi karakterize edilmiştir [55, 87]. Etiketsiz tespit için proteinlerden tekrarlanabilir ve duyarlı YZRS spektrumlarını elde etmenin bir yolu NP-protein karışımlarının kontrollü bir şekilde toplanmasını sağlamaktır.

Asitlenmiş sülfat, AgNP'lar ve proteinler arasındaki etkileşimleri indüklemek, duyarlı ve tekrarlanabilir etiketsiz tespit için bir birleştirme ajanı olarak kullanılmıştır [88]. Yapılan bu çalışmada, etiketsiz 50 ng/mL kadar düşük LOD'lu, basit, hassas ve tekrarlanabilir bir YZRS'ye dayalı bir yöntem geliştirilmiştir.

Katman-katman biraraya gelme tekniği de son derece hassas ve tekrarlanabilir protein tespiti için kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu durumda protein, etiketsiz algılama için iki tabaka NP arasında bir araya getirilmiştir [89]. Bir başka çalışmada, iletim derleme yöntemi ile (convective-assembly) etiketsiz protein tespiti yapılmıştır. Bu yöntemde, 0.5 µg / mL LOD'yi ortaya koymuştur [81]. Model proteinler için 0.05 µg / mL'ye kadar bir LOD'ye sahip proteinlerin etiketsiz tespiti için, hidrofobik bir yüzeyden AgNP'lar ve proteinler içeren süspansiyon haline getirilmiş karışım damlacıklarının bir araya toplanması üzerine yeni bir yöntem bildirilmiştir [90]. Hidrofobik yüzeylerde AgNP'ların ve proteinlerin kendiliğinden bir araya getirilmesine dayanan duyarlı (LOD 0.5 µg / ml) ve tekrarlanabilir etiketsiz proteinlerin basit bir numune hazırlama yöntemi de gösterilmiştir [91]. İki boyutlu katı metalik nanoyapılar, YZRS spektrumundaki yük özelliklerinin ve arka plan girişiminin etkisini ortadan kaldırmak için protein algılamasında kullanılmaktadır. Bununla birlikte, YZRS spektrumu sadece zayıf ve tekrarlanabilir spektrumlar sağlayan YZRS aktif metalik yapılara dokunan proteinlerden elde edilmektedir. Öte yandan, iyi tanımlanmış 3D metalik nanoyapılar büyük alanlarda tekrarlanabilir geniş zenginleştirme faktörleri sergilemekte ve bu nedenle arka plan girişimini ve yük özelliklerini ortadan kaldırarak proteinlerden zengin, güçlü ve tekrarlanabilir YZRS spektrumlarını elde etmek için kullanılmaktadır. Son zamanlarda, 3D plazmonik nanoyapılar, yumuşak litografi ve nanoküre litografi kombinasyonu kullanılarak oluşturulmuş ve bu yapılar daha sonra etiketsiz protein tespiti için kullanılmıştır [92]. Yapılan diğer bir çalışmada bir PDMS filminde altın konkav nanoküp dizileri hazırlanarak etiketsiz protein tespiti için kullanılmıştır [93]. YZRS, bir karışımdaki proteinlerin tespiti için de kullanılmıştır [94, 95]. Bu çalışmada, proteinlerin poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE) kullanılarak ayrılmış ve proteinler bir selüloz zarına aktarılmıştır (batı lekeleme-western blotting). Ayrılan proteinler kolloidal AgNP'lar ile muamale edildikten sonra YZRS spektrumları alınarak karışım içerisindeki proteinler tespit edilmiştir [82]. Proteinlerin ayrılması ve etiketsiz tespiti edilmesi için, iletim derleme yöntemi ile protein karışımlarının diferansiyel ayrımı sağlanmış ve YZRS spektrumları alınmıştır.

Yapılan bu çalışmada farklı bölgelerden alınan YZRS spektrumlarının ayrılan proteinlerin tespitinde kullanılabileceği gösterilmiştir [96].

2.5 Proteinler

Proteinler bütün canlı varlıkların en önemli ve hücrelerinde en bol bulunan organik bileşiklerdir. Bütün biyolojik olaylarda hayati görevleri vardır. Yapıları hakkında bilgi vermeden önce farklı biyolojik fonksiyonlarından en önemlilerini şöyle sıralayabiliriz:

1-Enzimatik katalizleme

2-Taşıma ve depolama

3-Mekanik hareket

4-Mekanik destek

5-Koruma

6-Sinir uyarılarının üretimi ve iletimi

7-Hormonlar

8-Büyüme ve farklılaşmanın kontrolü

Bir protein zinciri amino asitlerin birleşmesiyle meydana gelen polimerlerdir. Proteinler dört basamakta biyolojik fonksiyonlarını yerine getirirler. Bu dört basamak primer, sekonder, tersiyer ve kuaterner yapılar olarak isimlendirilir. Bunlar belirli bir yapıdan daha çok yapılanma çeşidini veya safhasını ifade eder.

Primer yapı; basitçe, bir proteindeki amino asitlerin sıralanışdır ve proteinin omurgasını oluşturur. Bu yapı DNA'daki baz dizilişi tarafından şifrelenir ve proteinin üç boyutlu aktif konformasyonunu belirleyen en önemli husustur

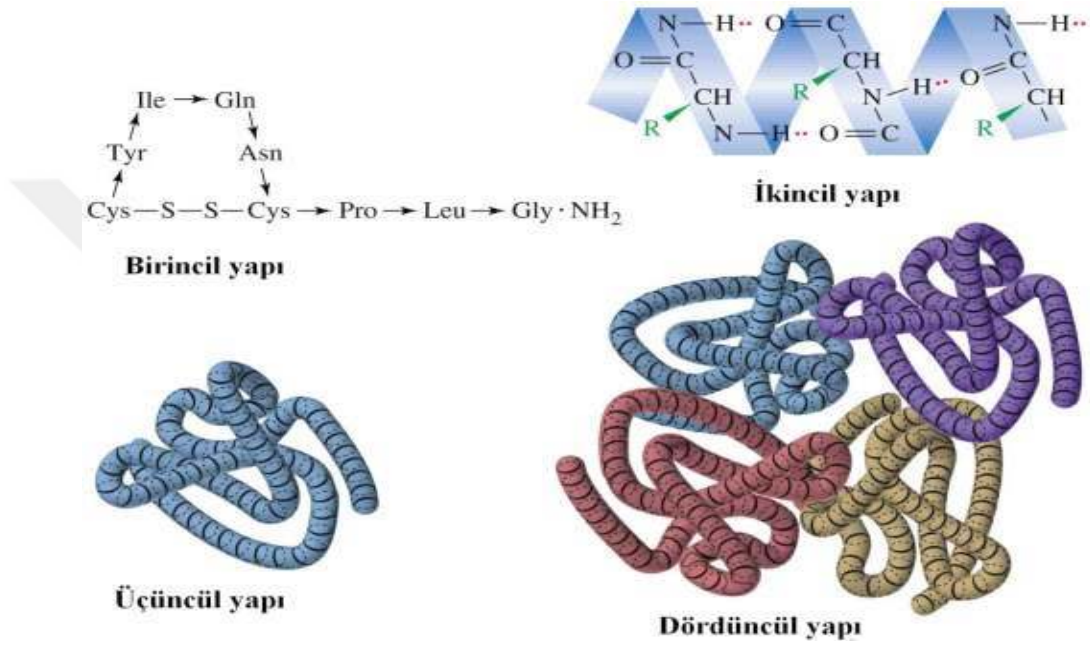
Sekonder yapı; lineer dizilişte birbirine yakın amino asit rezidüleri arasındaki etkileşmeler sonucu meydana gelir. Bu etkileşmelerin bazıları periyodik ve düzenli bir özelliktedir. Mesela α -sarmal, β -kırmalı tabaka ve kollagen sarmalı bu yapıya dahildir. Bir protein zincirinin bazı bölgelerinin maruz kaldığı bu yapılanmayı hidrojen bağları oluştururken, amino asitlerinin R gruplarından kaynaklanan etkileşmeler de bu yapının proteinin hangi bölgelerinde olacağını belirler.

Tersiyer yapı; lineer dizilişte birbirinden uzak noktalardaki amino asitler arasındaki sterik etkileşmelerle ortaya çıkar. Bir protein zinciri içindeki kararlı katlanmalar

sonucu, lineer dizilişte birbirinden uzakta olan amino asit rezidüleri bir araya gelir ve proteinin aktif bölgesini de oluşturur. Tersiyer yapıda belli bir düzenlilik periyodik şekil göze çarpmaz. Disülfid bağı bu yapıyı daha kararlı hale getirir.

Kuaterner yapı; birden fazla polipeptid zincirine sahip oligomerik proteinlerde rastlanır. Polipeptid alt birimleri, sekonder ve tersiyer yapıları meydana getiren sterik etkileşmelerle oluşan bağlar vasıtasıyla bir arada tutulur.

Şekil 2.5’de proteinlerin yapıları gösterilmiştir.



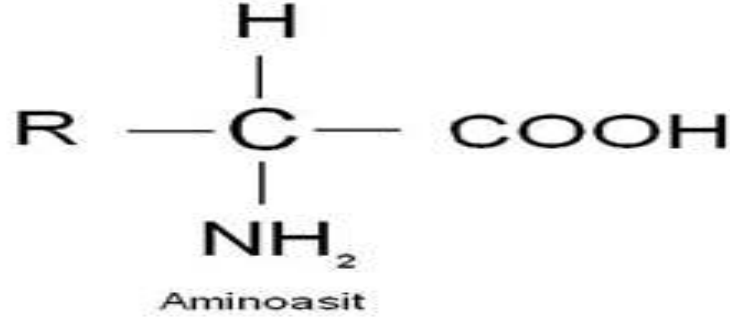
Şekil 2.5 Proteinlerin yapıları [97].

2.5.1 Amino Asitler

Proteinler, amino asitlerin birbirine bağlanması sonucu oluşur. Bu ise amino asidin a-karboksil grubu ile bir diğer aminoasidin a-amino grubu arasında bir H₂O molekülünün açığa çıkmasıyla oluşan kovalent bir bağla gerçekleşir. Bu bağa peptid bağı denir.

Basit proteinler asit, baz veya enzim tarafından hidroliz edildikleri zaman, yapı taşları olan a-amino asitlere parçalanır. a-amino asitler, a-karbon atomuna bir amino grubu (-NH₂), bir karboksil grubu (-COOH), bir hidrojen atomu (-H) ve bir yan grubun (-R) bağlanmasıyla ortaya çıkan bileşiklerdir. A-amino asitler, birbirinden farklı R grubu ihtiva ederler. Buradaki R, organik kimyadaki alkil grubu anlamında olmayıp, a-

karbona bağılı herhangi bir dördüncü yapıyı ifade etmektedir. İyonlaşmış amino asitlerin genel formülü aşağıdaki Şekil 2.6’da verilmektedir.



Şekil 2.6 Aminoasitlerin genel yapısı

Proteinler şekil, büyüklük, yük, hidrojen bağı yapma kapasitesi ve kimyasal aktivite yönünden birbirinden farklı R gruplarını bulunduran 20 çeşit amino asidi ihtiva eder [98].

2.5.1.1 Amino Asitlerin Asit-Baz Özellikleri

Kristal haldeki amino asitlerin erime noktaları 200°C ve daha yukarıdır. Sudaki çözünürlükler, daha az polar çözücülere nispeten daha fazladır. Bu özelliklerde ancak amino asitlerin nötral sulu çözeltilerinden dipolar iyonlar halinde, yani zwitter iyon şeklinde kristallendiğini göstermektedir. Nötralliğe yakın çözeltilerde dipolar hali gözlenen amino asitlerin, düşük pH’larda katyon, yüksek pH’larda ise anyon şekli gözlenmektedir [98].

2.5.1.2 Amino Asitlerin Işık Absorbsiyonu

Amino asitlerin hiçbiri görünür bölgede ışığı absorblamazlar. Yalnız üç tanesi (tirozin, triptofan ve fenilalenin) önemli miktarda ultraviyole ışığı soğururlar. Protein moleküllerinin birçoğu, yaklaşık sabit oranda tirozin ihtiva ettiğinden, 280 nm ‘deki ışık absorbsiyonunun spektrofotometrik ölçümü sonucu çözeltideki protein miktarı kolay ve hassas olarak tayin edilebilir. Bütün amino asitler 220 nm’den daha düşük dalga boylarında absorbsiyon verirler [98].

2.5.2 Proteinlerin İzoelektrik pH'ları

Proteinler nispeten yüksek oranda bazik amino asitler ihtiva ediyorlarsa pH'lar 7 'den yüksek, asidik amino asitler ihtiva ediyorlarsa pH'ları 7'den düşüktür. İzoelektrik pH'nın üzerinde protein negatif olup elektrik alanında anoda doğru hareket ederken, pH'ı nın altında pozitif yüklü olarak katoda doğru yol alırlar. Proteinlerin titrasyon eğrileri ve izoelektrik pH'ları nötral tuzların varlığında önemli miktarda değişir. Çünkü bu şartlarda R gruplarının iyonlaşmaları etkilenir. Proteinlerin gözlenen izoelektrik pH'ları çözündükleri ortamın tabiatına yakındır [98].

2.5.3 Proteinlerin Saflaştırılması

Globüler proteinlerin çözelti içindeki davranışlarından faydalanarak sınıflandırması yapılmaktadır. Bu özellikler şunlardır; (a) molekül büyüklüğü, (b) çözünürlük, (c) elektriksel yük, (d) adsorpsiyon davranışındaki farklılıklar, (e) diğer moleküllere karşı biyolojik afinite [98].

2.5.3.1 Molekül Büyüklüğü Esas Alınarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin en göze çarpan özelliği onların büyüklükleridir. Bu durum, bir proteini diğer proteinlerden ve küçük moleküllerden ayırmayı mümkün kılar. Bu esasa dayalı proteinleri ayırma metodları şunlardır:

- a.1. Diyaliz ve ultrafiltrasyon
- a.2.Yoğunluk gradienti santrifügasyonu
- a.3.Jel filtrasyon kromatografisi

2.5.3.2 Çözünürlüklerindeki Farklılıkların Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin çözünürlüğü başlıca pH, iyonik şiddet, çözücünün dielektrik özelliği ve sıcaklığa bağlıdır. Bu özelliklerden proteinleri ayırma işlemlerinde yararlanılır. Bu esaslara dayalı proteinleri ayırma metodları şunlardır:

- b.1.İzoelektrik çökeltme
- b.2.Nötral tuzlarla çöktürme
- b.3.Çözücülerle fraksiyonlama

2.5.3.3 Elektriksel Yük Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinlerin elektriksel yüklerine göre ayrılması, polipeptid zincirlerinde iyonlaşabilir yan grupların sayısı ve cinsi ise belirlenen asit-baz özelliklerine dayanmaktadır. Proteinler, amino asit bileşiminde ve dizilişinde farklılık gösterdiklerinden, her protein özel bir asit-baz davranışına sahiptir. Karakteristik asit-baz özelliklerinden faydalanarak iki metod geliştirilmiştir.

c.1.Elektroforez

c.2.İyon Değişim Kromatografisi

2.5.3.4 Seçimli Adsorpsiyon Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması

Proteinler, mangal kömürü gibi apolar materyaller veya kizelgur ve alüminyum oksit gibi polar materyallere, molekül büyüklüklerine göre adsorbe olabilirler. Bu gibi adsorbsiyonlarda proteinleri bağlayan kuvvetlerin tam çeşidi bilinmemektedir; muhtemelen apolar adsorbsiyonlarda Van der Waals ve hidrofobik etkileşimler ve polar adsorbsiyonlarda iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı etkilidir [98].

2.5.3.5 Spesifik Ligandları Esasına Dayanarak Proteinlerin Ayrılması (Afinite Kromatografisi)

Bazı proteinler afinite kromatografisi vasıtasıyla çok kere bir basamakta çok kompleks bir karışımdan izole edilebilirler. Afinite kromatografisi bir çeşit adsorbsiyon kromatografisi olup, saflaştırılması istenen molekülün, matriks adı verilen bir kolon maddesine kovalent olarak immobilize edilmiş bir komplementer bağlanma bileşiğine (ligand) spesifik ve tersinir bağlandığı bir tekniktir [98].

2.5.4 Proteinlerin Molekül Ağırlıkları Tayini

Belirli bir protein yüksek bir saflıkta elde edildikten sonra bazı özellikleri belirlenmelidir. Bu amaçla toplam molekül ağırlığı, polipeptid zincir sayısı, polipeptid zincirlerinin molekül ağırlığı, aminoasit bileşimi ve dizilişi analizleri yapılmalıdır.

-Proteinin kimyasal bileşiminden molekül ağırlığının bulunması

-Ozmotik basıncın ölçümüyle molekül ağırlığı tayini

-Sedimentasyon metodu ile molekül ağırlığı tayini

-Jel filtrasyon kromatografisi ile molekül ağırlığı tayini

-Sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezi(SDS-PAGE) [98].

2.5.5 Kullanılan Bazı Proteinlerin İşlevleri

Hemoglobin: Solunum organından dokulara oksijen,dokulardan solunum organına ise karbondioksit ve proton taşıyan proteindir. Eritrositlerin içerisinde bulunur. Oksijeni +2 değerlikli demir içeren hem molekülleri ile bağlar.

Trombin: Trombosit veya kan pulcukları kan pıhtılarının oluşumunda görev alan hücre parçalarına verilen isimdir.

Avidin: B grubu bir vitamin olan biyotini bağlayan ve yumurtada bulunan bir glikoprotein maddedir.

Pepsin: Mide özsuysundaki et, yumurta gibi proteinli yiyeceklere tesir eden kuvvetli bir enzimdir. Yapı olarak büyük ve karmaşık yapıdadır.

Sitokrom-c: Oksidaz ya da kompleks IV enzimi, mitokondrilerde bulunan büyük bir transmembran proteindir. Dört sitokrom-c molekülünün her birinden birer elektron alarak bunları bir oksijen molekülüne transfer eder ve moleküler oksijeni iki su molekülüne çevirir. Elektron taşıma zincirinin terminal elektron alıcısıdır.

Lizozin: Muramidaz veya N-asetilmuramit glikanhidrolaz tükürük, gözyaşı, ter ve mukus gibi vücut salgılarında bulunan glikozit hidrolaz cinsi bir enzimdir. Bazı bakterileri yok edebilir.

BSA: Sığır albümini ya da BSA olarak da adlandırılan bu protein kan plazmasında bulunan en yaygın proteindir. Kanda bulunan proteinin %60'ını oluşturur. Ayrıca, doku sıvılarında, özellikle kas ve deride, az miktarda gözyaşı, ter mide suları ve safrada da bulunur.

HSA: İnsan kanındaki ana plazma protein bileşenlerinden biridir. Kanın sıvı miktarını sabit tutmak, alınan ilaçların, vücutta üretilen hormonun, yağ asitlerinin minerallerin taşıyıcılığını yapmak, kandan bazı toksik maddelerin taşınmasını sağlamak gibi görevleri vardır.

BÖLÜM 3

MATERYALLER VE YÖNTEMLER

3.1 Cihazlar

İletim-Derleme Düzeneği (PI)

Saf Su Cihazı (Millipore)

Etüv (Nüve)

Terazi

Sonikatör

Taramalı Elektron Mikroskopu (JEOL 6510)

Atomik Kuvvet Mikroskopu (Park System XE-100E)

Raman Spektrometre (Renishaw İnvia)

Potansiyostat/Galvanostat (CHI 660d)

3.2 Kimyasallar

Lateks Parçacıklar

Polidimetilsiloksan (PDMS)

Dikolorometan

Gümüş nitrat (AgNO_3)

Nikel (II) sülfat hekzahidrat ($\text{NiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

Bakır sülfat pentahidrat ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)

Potasyum nitrat (KNO_3)

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

Amonyok (NH_3)

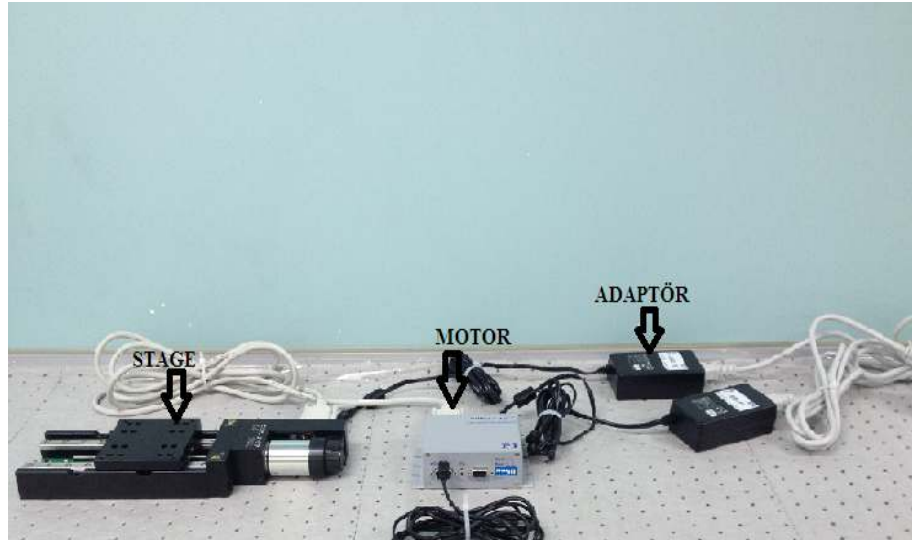
3.3 Lateks Parçacıkların Cam Lam Üzerine Biriktirilmesi

Plazmonik nanokubbeleri hazırlanmasında kalıp olarak kullanılacak olan PDMS nanoçukurcukları elde etmek için ilk olarak 1600 nm büyüklüğündeki latex parçacıkları cam lam üzerine iletim-derleme (Convective-Assembly) (Kuncicky vd. 2005, 2006) yöntemi ile biriktirildi. Lateks parçacıklarının yüzeye düzenli bir şekilde biriktirilmesi için iletim derleme düzeneği kullanıldı (Şekil 3.1). Kullanılan düzeneğin bir yazılım sayesinde bilgisayardan kontrol edilmektedir.



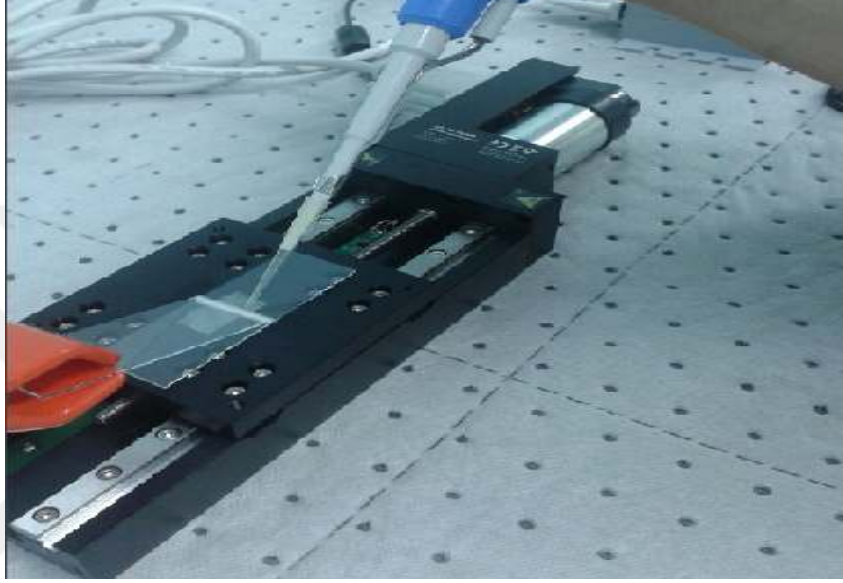
Şekil 3.1 Kurulmuş iletim derleme düzeneğinin fotoğrafı.

Düzenek Şekil 3.2’de görüldüğü gibi üç ana bileşenden (hareketli düzeneğin, motor ve adaptör) oluşmaktadır.



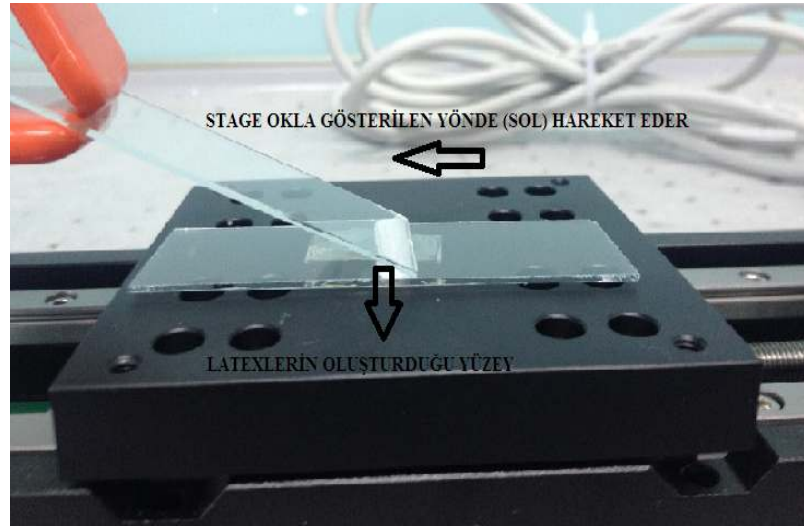
Şekil 3.2 İletim derleme düzeneğinin bileşenleri.

Cam yüzeyine lateks parçacıkların düzenli biriktirmek için kullanılan latex parçacıkların derişimi, düzeneğin hızı ve kullanılan parçacıkların hacmi optimize edildi. Yapılan çalışmalar sonucunda latex parçacıkların derişiminin %0,8, düzeneğin hızının 1µm/s ve damlatılan hacmin 40 µL olduğunda latex parçacıkları cam lam üzerine düzenli bir şekilde biriktirildiği gözlemlendi. Hazırlanan latex parçacıkların iletim derleme düzeneği üzerindeki iki cam lam üzerine damlatılmasının fotoğrafı Şekil 3.3'te görölmektedir.



Şekil 3.3 Latex parçacıkların iletim derleme düzeneği üzerindeki iki cam lam üzerine damlatılmasının fotoğrafı.

Hazırlanan latex süspansiyonunun Şekil 3.3'te görüldüğü gibi yüzeye damlatılarak iletim derleme cihazı ile yukarıda belirlenen şartlar kullanılarak cam lam üzerinde elde edilen latex parçacıkları filmi Şekil 3.4'te görölmektedir. İki cam lam arasındaki açı literatürdeki gibi yaklaşık 23°'dir.



Şekil 3.4 İletim derleme yöntemi ile cam lam üzerinde elde edilen lateks parçacıkları filmin fotoğrafı.

3.4 PDMS Yüzeyinde Nanoçukurcukların Oluşturulması

Nanokubbeler için kalıp olarak kullanılacak olan PDMS yüzeyinde nanoçukurcukları oluşturmak için hazırlanan cam lam üzerinde biriktirilen latex parçacıkları üzerine PDMS döküldü ve sıcaklıkla polimerleşmesi sağlandı. Bu amaç için PDMS ve %10 oranında başlatıcısı bir süre karıştırıldıktan sonra cam lam üzerine döküldü. Daha sonra dökülen PDMS yüzeyi 70°C etüvde 1 saat bekletildi. Polimerleşerek sertleşen PDMS, cam lam yüzeyinde bulunan latex parçacıkları üzerinden sökülerek PDMS yüzeyinde nanoçukurcuklar elde edildi.

3.5 Gümüş Nanokubbelerin (AgNDs) Hazırlanması

AgNDs elektrokimyasal yöntemle PDMS üzerindeki nanoçukurcuklar elektrokimyasal yöntemle doldurularak/kaplanarak elde edildi. Bu amaç için elektrokimyasal yöntemle Ag ile kaplamak için, kaplama banyosunda AgNO_3 kullanıldı. Ag^+ iyonlarının indirgenme potansiyeli yüksek olduğundan, homojen ve kaliteli Ag kaplamaları yapabilmek için kontrollü bir şekilde Ag^+ indirgenmesi gerekmektedir. Yüksek indirgenme potansiyeli sahip olan Ag^+ iyonları hava oksijeni ile bile kolaylıkla indirgenebilmektedir. Buna karşın kaplama çözeltisine kompleksleştirici ajanlar ilavesi Ag^+ iyonları ile kompleks oluşturarak daha kararlı hale getirilebilmektedir. Bu tez çalışmasında bu amaçla hem sodyum sitrat hem de amonyak gibi kompleksleştirici ajanlar ile Ag^+ iyonlarının daha kararlı yapılar oluşturularak banyolar hazırlandı. Banyonun elektrolitik iletkenliği sağlamak amacı

ile banyolara ayrıca KNO_3 ilave edildi. Bu tez çalışmasında 6 farklı Ag^+ banyoları hazırlandı. Hazırlanan banyo bileşimleri aşağıda verilmektedir.

A1 Banyosu: 0,1 M AgNO_3 + 0,1 M KNO_3 + 1 M NH_3 , pH =11.95

A2 Banyosu: 0,01 M AgNO_3 + 0,1 M KNO_3 + 0,1 M NH_3 , pH=11.53

A3 Banyosu: 0,1 M AgNO_3 + 1 M KNO_3 +5 M NH_3 pH=12,85

C1 Banyosu: 0,01 M AgNO_3 + 0,1 M KNO_3 +0,5 M H_3BO_3 + 0,1 M $\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5.2\text{H}_2\text{O}$
pH=7,65

C2 Banyosu: 0,1 M AgNO_3 + 0,1 M KNO_3 + 0,1 M $\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5.2\text{H}_2\text{O}$, pH=8,56

C3 Banyosu: 0,1 M AgNO_3 + 1 M KNO_3 +1 M $\text{Na}_3\text{O}_7\text{C}_6\text{H}_5.2\text{H}_2\text{O}$, pH=9,03

Elektrokimyasal yöntemle PDMS bilgisayar destekli CHI 660D Electrochemical Analyser Potansiyostat/Galvanostat cihazında üç elektrot tekniği kullanılarak yapıldı.

Çalışma elektrotu:

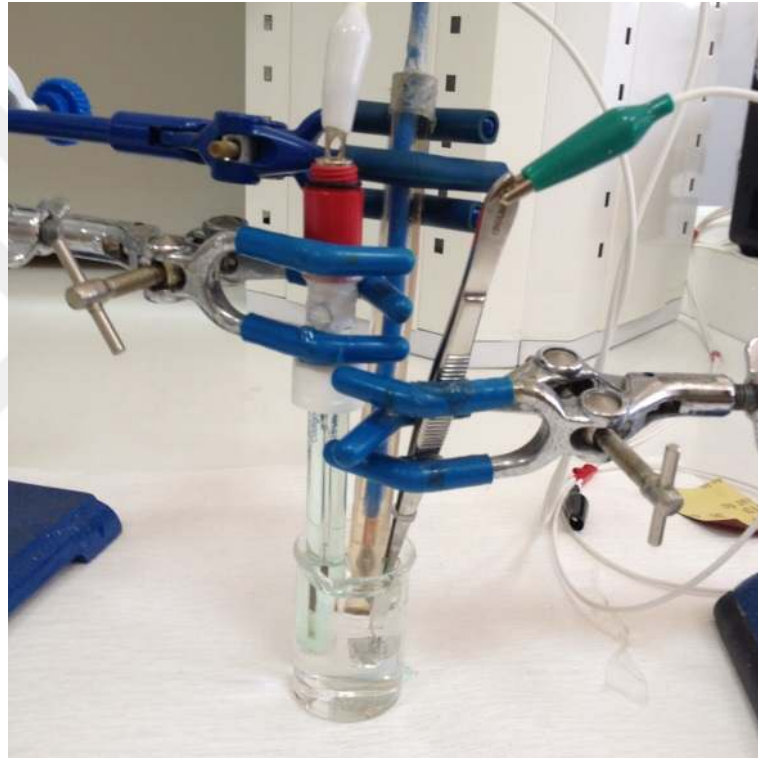
Indium thin oxide (ITO): Sadece bir yüzeyi ITO kaplanmış elektrotlar kullanıldı. ITO'lar 0,5 cm x 2 cm boyutlarında kesildikten sonra bir ucu 0,5 cm x 0,5 cm (0,25 cm^2 toplam yüzey alanı) açıkta kalacak şekilde diğer kısmı parafilm ile kapatıldı. Ölçümler için belirlenen ucun karşı kısmına cihaz ile iletkenliğin sağlanması ve yüzeyin çözeltiye daldırılması için bir pens tutturularak çalışma elektrotu hazırlandı. Pense tutturulmuş ITO bu şekilde çözeltiye daldırıldığında daima aynı büyüklükte yüzey alanının çözelti ile temas etmesi ve aynı miktarda kaplama yapılması sağlandı. ITO elektrotlar sadece kaplama optimizasyonun ön denemelerinde kullanıldı.

İletken hale getirilmiş PDMS: Nanoçukurların olduğu kısımlardan belirli ölçülerde kesilmiş ve yukarıda anlatıldığı gibi pens ile tutturularak hazırlandı.

Karşı elektrot: Karşı elektrot olarak Pt levha kullanıldı. Pt elektrotlar 0,2cmx1cmx1cm boyutlarındaki Pt levhalara Pt teller tutturulduktan sonra iletkenliği sağlamak için bakır telle bağlanmış ve sadece Pt levha dışarıda kalacak şekilde poliester içerisine gömülerek hazırlandı. Platin elektrotun yüzeyi bütün ölçümlerden önce 1:1 (v/v) $\text{HNO}_3:\text{H}_2\text{O}$ çözeltisinde bir süre bekletildi ve saf sudan geçirilerek yıkandı.

Referans elektrot: Gümüş - gümüş klorür (Ag , AgCl/Cl^- , $\text{KCl}= 3 \text{ M}$) referans elektrot olarak kullanıldı.

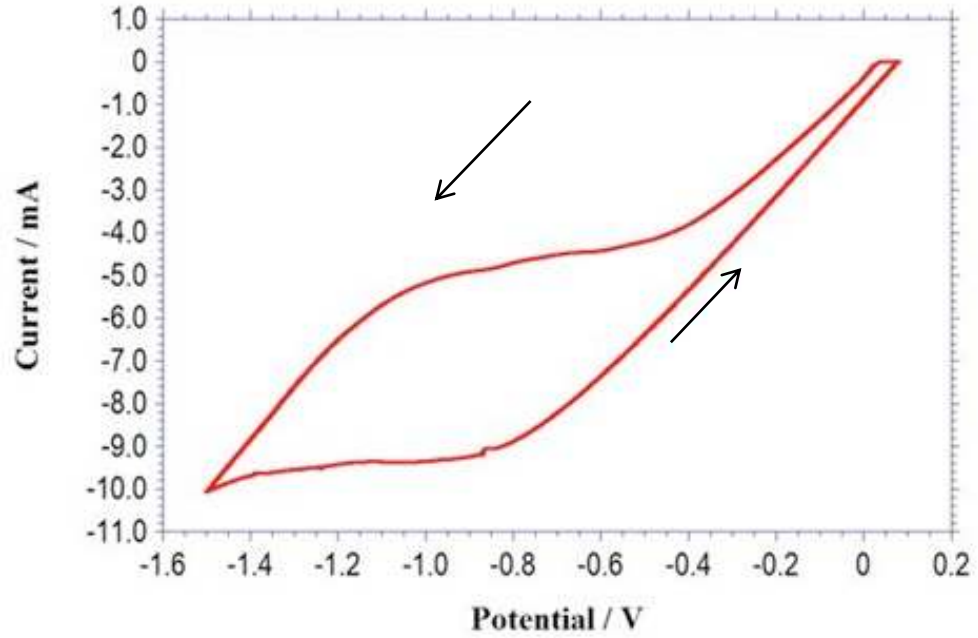
PDMS esnek olduğundan ve yüzeyine metal çöktürmek daha zor olduğundan uygun metal çöktürme banyosunun belirlenmesinde daha sağlıklı karar verebilmek için ITO elektrotlardan ayarlandı. Düz ve iyi bir iletken olması ayrıca kısmi şeffaf olması nedeni ile yüzeyine çöktürülecek Ag'nin kalitesinin belirlenmesinde oldukça avantajlıdır. Yukarıda verilen şekilde hazırlanan ITO elektrotlar 20 mL kaplama banyolarına daldırıldı. Yukarıda verilen Ag/AgCl ve Pt elektrotlar referans ve karşı elektrot olarak aynı banyoya daldırılarak elektroliz hücresi oluşturuldu. Ag çöktürmede kullanılan ve üç elektrot tekniği ile oluşturulan elektroliz hücresinin fotoğrafı Şekil 3.5'te görülmektedir.



Şekil 3.5 Elektrokimyasal Ag kaplamalarda kullanılan üç elektrot sistemi.

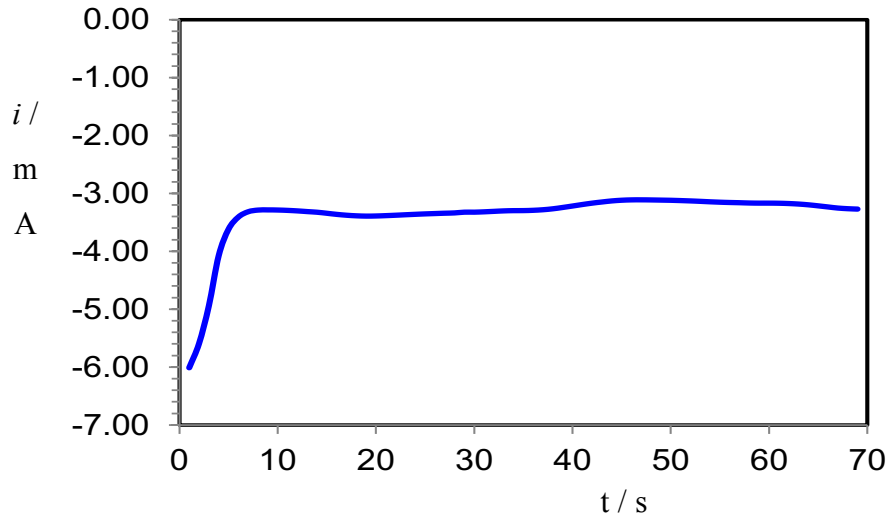
Öncelikle ITO elektrotlar hazırlanan banyolara daldırılarak elektrot potansiyelleri dengeye geldikten sonra dönüşümlü voltamogramlar elde edildi. Elde edilen voltamogramlardan Ag^+ iyonlarının indirgenerek metalik gümüşe indirgendiği potansiyeller belirlendi. Her bir banyo için ITO yüzeyine 1 mg Ag/cm^2 gümüş çökecek şekilde Ag^+ iyonlarının indirgendiği ve elde edilen dönüşümlü voltamogramlardan belirlenen değişik potansiyeller belirli sürelerde elektroliz sistemine (Ag çöktürme banyolarında) uygulanarak Ag filmler elde edildi (Teorik olarak bu miktarda Ag çöktürmek için sistemden $0,2234 \text{ C}$ yük geçirmek gerekmektedir).

ITO elektrotun A1 banyosunda açık devre potansiyeli ile hidrojen gazı çıkış potansiyelleri arasında 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramı Şekil 3.6’da verilmektedir. Elde edilen eğriden de açık bir şekilde görülebileceği gibi elektrot potansiyeli açık devre potansiyelinden itibaren daha katodik potansiyellere doğru tarandığında kısa bir potansiyel aralığında (yaklaşık 0,03 V) Ag^+ iyonları hızlı bir şekilde indirgenmeye başlamaktadır. Metal iyonları indirgenmesi yaklaşık -0,6 V’ta maksimum hızda gerçekleşmektedir. Yaklaşık -1,0 V’tan itibaren gözlenen ikinci akım artışı ise hidrojen iyonlarının hidrojen gazına indirgenmesine karşılık gelmektedir. Geri yönlü tarama sırasında akımın daha da artması, ilk tarama esnasında ITO yüzeyinde Ag çökmesi ve Ag’nin yüksek elektriksel iletkenliğinden kaynaklanmaktadır.



Şekil 3.6 ITO elektrotun A1 banyosunda 10 mV/s tarama hızı ile elde edilen dönüşümlü voltamogramı.

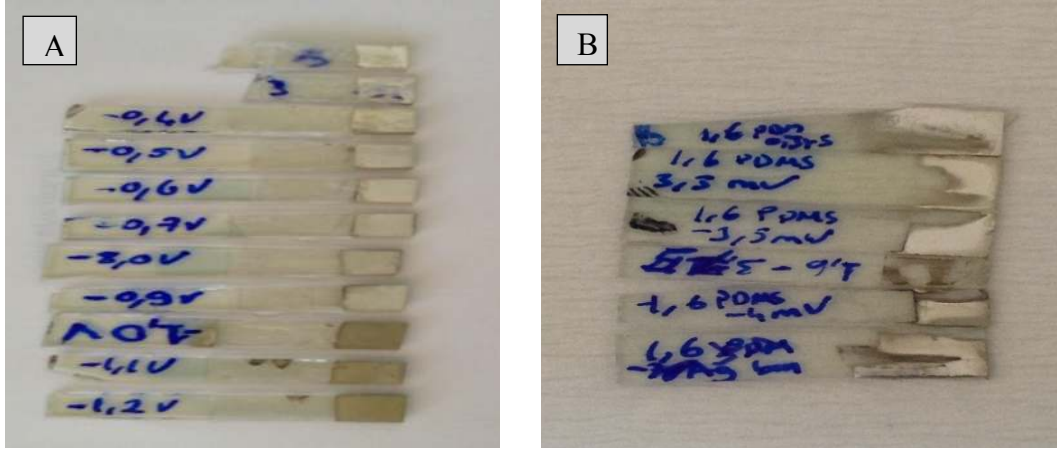
Ag kaplamalar, elde edilen voltamogramdan belirlenen ve Ag^+ iyonlarının indirgendiği potansiyeller/akımlar uygulanarak elde edildi. -0,6 V potansiyel uygulanarak potansiyostatik olarak Ag çöktürmesine ait kronoamperometri eğrisi Şekil 3.7’de görülmektedir.



Şekil 3.7 ITO elektrotun A1 banyosunda -0,6 V'ta elde edilen kronoamperometri eğrisi.

Yukarıdaki banyolarda değişik potansiyellerde ve akımlarda Ag filmler elde edildi. Elektrokimyasal olarak çöktürülmüş Ag filmler incelendiğinde genel olarak sodyum sitrat içeren banyolarda (C1-3) kalitesiz ve yüzeye sıkı tutunmadığı, toz gibi dökülen kaplamaların olduğu gözlemlendi (kalınlaştırıldığında yüzeyden çözeltiye dökülmektedir). Bu kaplamalarda kısmen siyah renkli Ag filmler oluşturuldu. Amonyak içeren banyolarda ise C1-3 banyolarına kıyasla daha kaliteli kaplamalar elde edildi. Amonyak derişiminin artırılması ile filmlerin rengi kararmaya başladı ve kaliteleri düştü. A1 banyosunda son derece kararlı ve yüzeye sıkıca tutunan homojen Ag kaplamalar elde edildi. Bu nedenle bundan sonraki elektrokimyasal Ag çöktürmeleri A1 banyosunda yapıldı.

Seçilen çöktürme banyosunda uygulanacak uygun potansiyel veya akımın belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. -0,2 V ile -1,2 V aralığında değişik potansiyellerde 1 mg Ag/cm² gümüş çöktürüldüğü ITO elektrotların yüzey fotoğrafları Şekil 3.8'de görülmektedir.



Şekil 3.8 Değişik potansiyelerde (A) ve akımlarda (B) ITO üzerine elde edilmiş Ag filmleri.

Resimlerden de görülebileceği gibi düşük potansiyelerde ITO yüzeyini yeterince kapatamayan bölgesel Ag filmleri oluşmaktadır. Potansiyelin artırılması ile akım verimi artmakta ve daha çok Ag çökmektedir. Bu koşullarda yüzeydeki film sıkılaşmaktadır. -0,6 V ile -0,9 V aralığında uygulanan potansiyelerde oldukça kaliteli Ag filmleri elde edilmektedir. Potansiyel daha da artırıldığında film kalitesi tekrar azalmakta ve film kararmaya başlamaktadır. -1,2 V'tan daha yüksek potansiyelerde ise hidrojen gazı çıkışı nedeni yüzeydeki film atmaktadır.

Şekil 3.8'de de görülebileceği gibi ITO yüzeyinde sabit potansiyel altında Ag oluşumu ile akım sabit kalmayıp önemli ölçüde değişmektedir. Daha kalın filmler elde etmek amacı ile Ag çöktürmek için uygun oldukları belirlenen -0,6 V ile -0,9 V aralığında potansiyeller uygulandığında film kalınlaştıkça kalitesinin tekrar azaldığı ve filmin renginin koyulaştığı gözlemlendi. Bu nedenle Şekil 3.6'da verilen dönüşümlü voltamogramda birinci tarama esnasında gözlenen maksimum pik potansiyeline karşılık gelen akımlar elektroliz sistemine uygulanarak akım optimizasyonu ayrıca yapıldı. Değişik akımlarda elde edilen Ag filmlerin görüntüleri Şekil 3.8B'de verilmektedir (daha düşük akımlarda sıkı, homojen ve kaliteli filmler oluşturulamamış, yüksek akımlarda ise Ag iyonlarının indirgenmesi ile aynı anda hidrojen gazı oluşumundan dolayı filmler yüzeye sıkı tutunamayarak atmaktadır). Elde edilen bulgulardan değişik kalınlıklarda Ag filmlerin en iyi 3,5 mA sabit akım uygulanarak oluşturulduğu belirlendi. Bu nedenle PDMS nanoçukurlarda elektrokimyasal olarak metal çöktürülmesi 3,5 mA akımda yapılması kararlaştırıldı. PDMS özellikleri ITO'dan farklı olmasına karşın, PDMS üzerinde Ag çöktürmek için en uygun akımın

3,5 mA olduğu gözlemlendi. Bütün kaplamalardan sonra filmler saf su, mutlak etanol ile iyice yıkandıktan sonra azot gazı ile kurutularak desikatörde muhafaza edildi.

PDMS iletken olmadığı için elektrokimyasal kaplama için uygun değildir. PDMS yüzeyini iletken hale getirmek için fiziksel buhar biriktirme (PVD) yaklaşık 10 nm krom (Cr) ile kaplandı. Cr kaplama ile PDMS yüzeyi iletken hale gelmesi sağlandı. Bu sayede elektrokimyasal kaplama için uygun hale geldi. Ayrıca PDMS yüzeyine Ag metalinin tutunması için bir tutucu özelliği gösterdi. İletken hale getirilen PDMS nanoçukurcukları, İTO yüzeyleri kullanılarak belirlenen uygun şartlarda (A1 banyosu ve sabit 3.5 mA akım) Ag ile kaplanarak nanoçukurcuklar dolduruldu. PDMS üzerinde yaklaşık 4 µm Ag oluşacak şekilde kaplamaya devam edildi. Bu sayede tüm nanoçukurcukların dolması sağlandı. Kaplama tamamlandıktan sonra PDMS Ag banyosundan çıkarılarak önce saf su ve daha sonra etanol ile iyice yıkandı. Oluşan AgNDs oldukça yumuşak ve kırılgan bir yapıya sahiptir. Elde edilen AgNDs, PDMS yüzeyinden sökülmeğe çalışıldığında kırılmaktadır. Ni ise oldukça sert ve dayanıklı bir metal olduğundan PDMS yüzeyleri Ag ile kaplandıktan sonra Ni filmi ile kaplama yapıldı. Bu sayede PDMS üzerinde elde edilen AgNDs PDMS yüzeyinden kolaylıkla söküldü. Ni kaplam banyosu olarak %30 NiSO₄.7H₂O, %1 NiCl₂.6H₂O, ve %1,25 H₃BO₃ karışım kullanıldı.

3.6 Hazırlanan Nanokubbelerin Üzerinde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Proteinlerin Tayini

Bu tez çalışmasında kullanılan proteinlerin listesi Tablo 3.1’de verilmektedir.

Tablo 3.1 Kullanılan proteinlerin listesi.

Proteinler
BSA
HSA
Avidin
Lizozim
Sitokrom c
Hemoglobin
Trombin
Pepsin

Proteinler ticari olarak temin edildikten sonra 1 mg/mL derişimde sulu çözeltiler şeklinde hazırlanarak -20'de stoklandı. Öncelikle proteinlerin fizikokimyasal özelliklerini belirlemek için (büyüklük ve yük) Zetasizer cihazı kullanıldı. Bu cihaz yardımı ile proteinlerin hem hidrodinamik çapı hem de zeta potansiyeli ölçüldü. Ölçümlerde proteinlerin derişimi 1 mg/mL idi. Üçer ölçüm alınarak ortalaması kullanıldı.

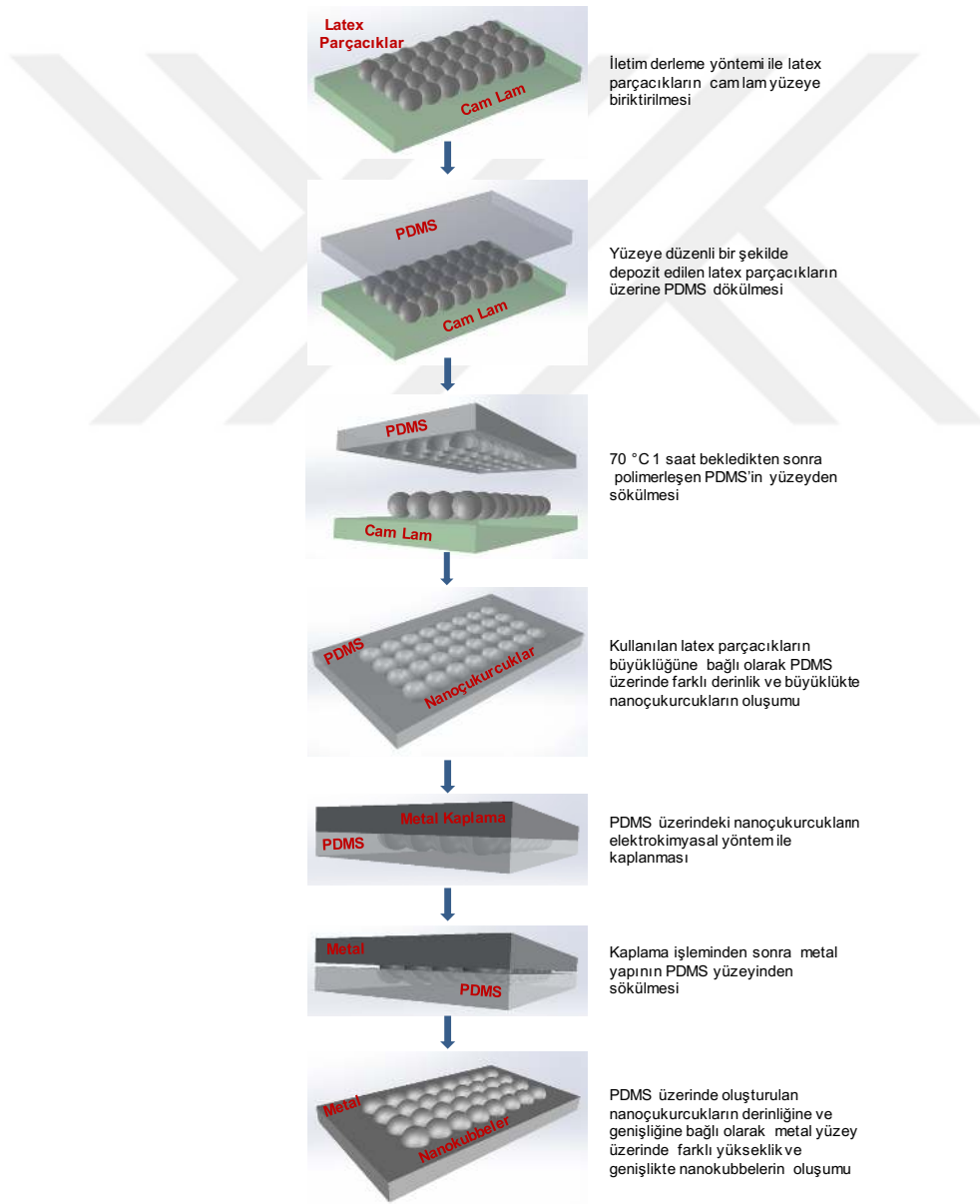
YZRS aktivitesi yüksek ve hazırlanması kolay olan 1600 nm latex parçacıkları kullanılarak hazırlanan PDMS nanoçukurcukların Ag ile doldurulmasıyla hazırlanan AgNDs kullanıldı. AgNDs performansını test etmek ve karşılaştırmak için AgNPs kullanıldı. Performans karşılaştırması için AgNPs olarak 8 defa deriştirilmiş (8X) ve 50 nm büyüklüğünde AgNPs kullanıldı. Bunun için eşit hacimlerde 8X AgNPs ve 100 µg/mL derişimde proteinler karıştırılarak son derişim AgNPs için 4X ve proteinler için 50 µg/mL olarak elde edildi. Bu karışımdan 5 µL CaF₂ üzerine damlatarak kurumaya bırakıldı. AgNDs performansını test etmek ve AgNPs ile karşılaştırmak için ise protein derişimi 50 µg/mL olan çözeltilerden direk 5 µL alınarak AgNDs üzerine damlatıldı ve kurumaya bırakıldı. Yapılan her iki deneyde proteinin son derişimi 50 µg/mL olmaktadır. Kuruyan yüzeylerden her bir örnek için rastgele seçilen on noktadan YZRS spektrumları alındı ve ortalaması karşılaştırma için kullanıldı. YZRS spektrumları 785 nm dalga boyuna sahip Renishaw Invia Raman spektrometre ile elde edildi. Örneklerden spektrum alırken lazerin gücü (lazer power, %1) 3 mW, örneğe maruz kalma süresi (exposure time) ise 1s idi.

BÖLÜM 4

BULGULAR ve TARTIŞMA

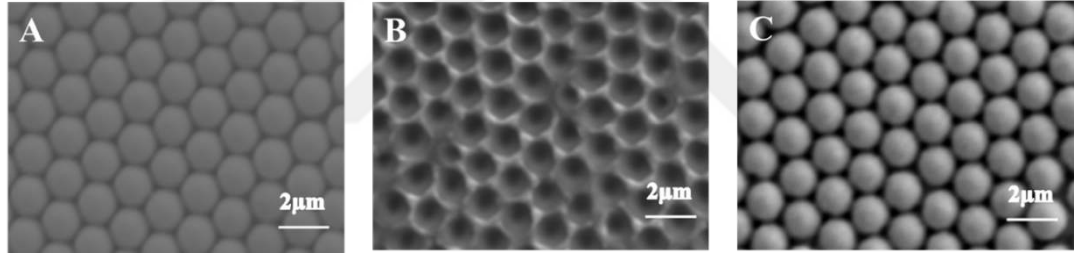
4.1 Gümüş Nanokubbelerin (AgNDs) Hazırlanması ve Karakterizasyonu

AgNDs'lerin hazırlanmasının basamaklarını gösteren şematik çizim Şekil 4.1'de verilmektedir.



Şekil 4.1 AgNDs'lerin hazırlanma basamaklarının şematik gösterimi

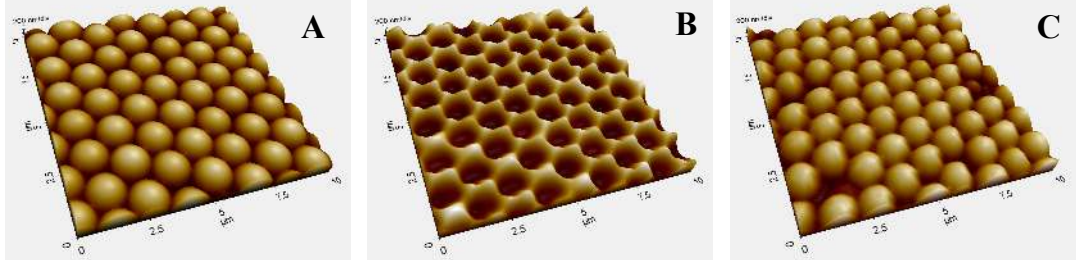
YZRS'ye dayalı protein tayini için AgNDs elde etmek için PDMS kalıplar hazırlandı. Çalışmanın ilk basamağı olan PDMS yüzeyinde nanoçukurcukları oluşturmak için 1600 nm büyüklüğüne sahip lateks parçacıklar iletim derleme düzeneği ile cam lam üzerine düzenli bir şekilde biriktirildi. Lateks parçacıkların cam lam üzerinde homojen dağılımlarını sağlamak için iletim derleme düzeneğinin hızının, lateks parçacık derişiminin, ve iki cam lam arasına damlatılan parçacıkların hacminin optimizasyonu yapıldı. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonrasında düzenli ve geniş bir alanda yüzeyler hazırlamak için optimum koşullar lateks parçacık derişiminin %0,8, iletim derleme düzeneğinin hızının 1µm/s olduğu durumdur. (Şekil 4.2A). Bütün çalışmalarda iki cam lam arasına 40 µL lateks parçacık süspansiyonu eklenerek yapıldı. Daha sonra cam yüzeyine biriktirilen latex parçacıkları üzerine PDMS dökülerek sıcaklıkla polimerleşmesi sağlandı. Böylelikle PDMS yüzeyinde nanoçukurcuklar elde edildi (Şekil 4.2B). Elde edilen bu çukurcuklar yukarıda bahsedilen deneysel koşullar kullanılarak Ag doldurularak AgNDs elde edildi (Şekil 4.2C).



Şekil 4.2 Bir cam lam üzerinde biriktirilen lateks parçacıkların (1600 nm) (A), PDMS nanoçukurcukların (B), ve elde edilen AgNDs (C) SEM görüntüleri.

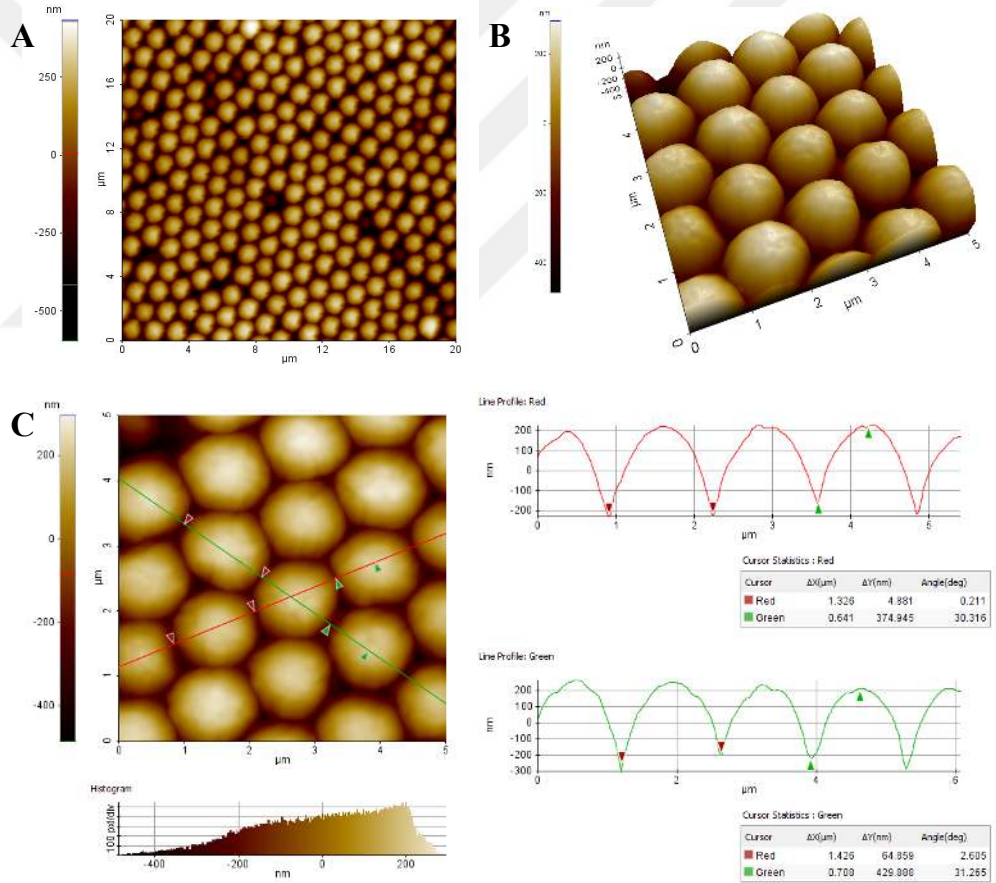
Şekilde latex parçacıkların cam lam üzerinde düzenli ve homojen şekilde dağıldığı görülmektedir. Bu yüzeyler üzerine PDMS döküldükten sonra PDMS üzerinde nanoçukurcuklar elde edildi. Son olarak ise nanoçukurcuklar Ag ile doldurulduğunda düzenli ve homojen AgNDs elde edildi.

Şekil 4.3'te cam lam yüzeyine biriktirilen latex parçacıkların, PDMS yüzeyinde oluşturulan nanoçukurcukların ve elde edilen AgNDs yapıların üç boyutlu AFM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.3 1600 nm lateks parçacıkların (A), PDMS nanoçukurçukların (B), ve oluşan AgNDs (C) 3D AFM görüntüleri.

Şekil 4.3'te verilen AFM görüntüleri de SEM görüntülerini desteklemektedir. Üç boyutlu AFM görüntüleri elde edilen nanoçukurcukları ve AgNDs yapılarını daha detaylı göstermektedir. Elde edilen AgNDs yapılarının yüksekliği ve genişliğini AFM ile belirlendi (Şekil 4.4).



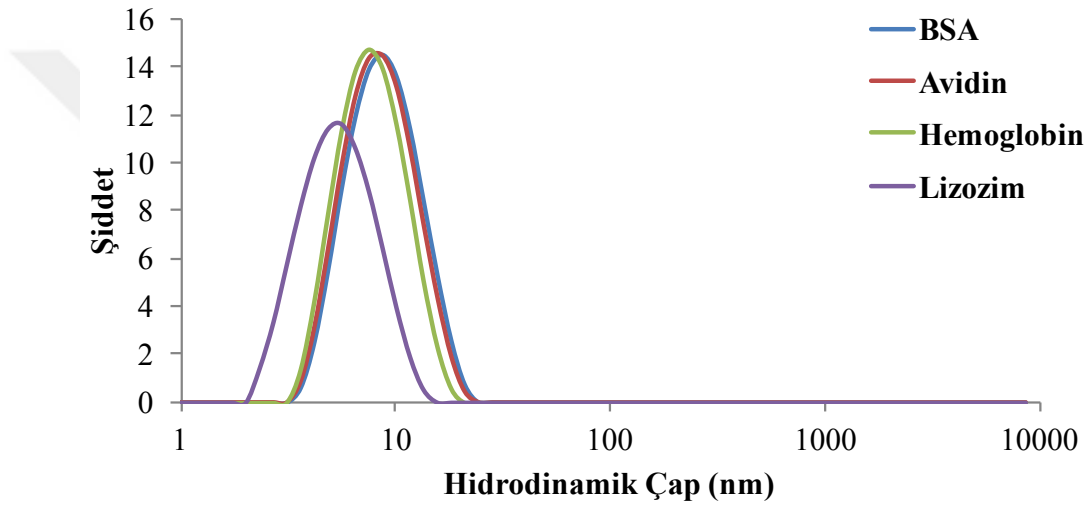
Şekil 4.4 1600 nm büyüklüğündeki lateks parçacıklar kullanılarak elde AgNDs AFM görüntüleri A) 20x20µm, B) 5x5µm C) çizgi analizi.

Hem SEM hem de AFM görüntüleri incelendiğinde hazırlanan AgNDs geniş alanda düzenli bir şekilde olduğu görülmektedir. Şekil 4.4C'de görüldüğü gibi AFM cihazının software programı ile derinlik ve büyüklük analizi yapıldı. Analizler

sonucunda AgNDs ortalama genişliğinin 1400 nm, yüksekliğinin ise 450 nm olduğu belirlendi.

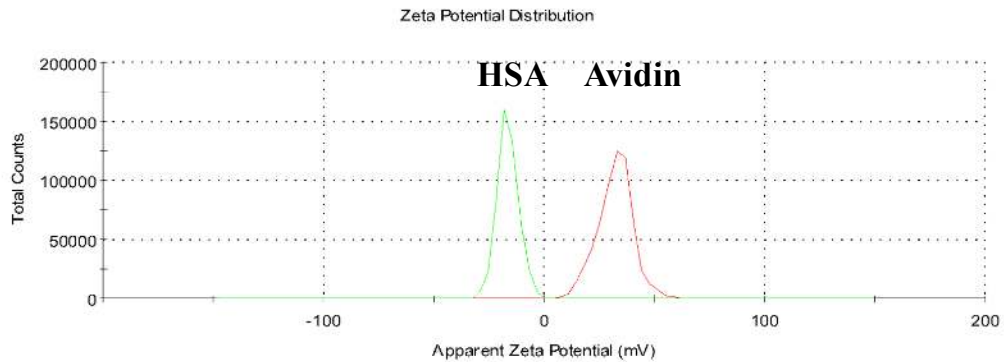
4.2 Plazmonik Nanokubbeler Üzerinde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Protein Tayini

Öncelikle hazırlanan nanokubbelerin üzerinde YZRS dayalı protein tayininde kullanılabilirliği araştırıldı. Bu amaç için 8 model protein kullanıldı. Öncelikle proteinlerin fizikokimyasal (büyüklük ve zeta potansiyel) özellikleri zetasizer ile belirlendi. Şekil 4.5'te proteinlerden elde edilen hidrodinamik çap grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.5 Kullanılan model proteinlerin bazılarının hidrodinamik çapları.

Şekilde görüldüğü gibi proteinlerin çeşidine göre farklı büyüklüğe sahiptirler. Bu farklılık proteinlerin molekül ağırlıklarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca proteinlerin yüzey yükünü belirlemek için zeta potansiyel ölçümleri yapıldı. Şekil 4.6'da HSA ve avidin protein çözeltilerinden elde edilen zeta potansiyel grafikleri görülmektedir.



Şekil 4.6 HSA ve Avidin protein çözeltilerinin zeta potansiyel grafikleri.

Elde edilen zeta potansiyellere bakıldığında HSA proteinin negatif zeta potansiyele, avidin ise pozitif zeta potansiyele sahiptir. Bunun nedeni ise proteinlerin sahip oldukları izoelektrik noktasıdır (pH). Zeta potansiyeller saf su içerisinde ölçüldüğü için izoelektrik noktası bu pH'dan yüksek olan proteinler pozitif, düşük olanlar ise negatif yüke (zeta potansiyel) sahiptirler. Tüm model proteinler için zetasizer cihazı ile elde edilen hidrodinamik çap ve zeta potansiyelleri Tablo 4.1'de verilmektedir. Molekül ağırlıkları ve izoelektrik noktaları satın alınan firmanın MSDS formundan elde edildi.

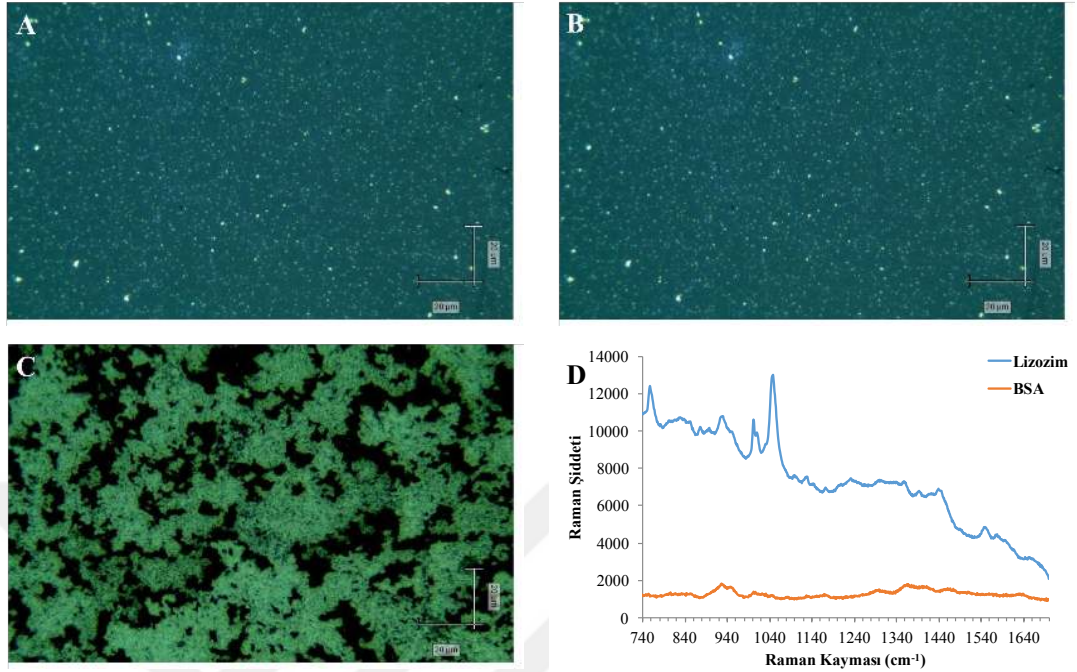
Tablo 4.1 Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri.

PROTEİN ADI	İzoelektrik Noktası (pI)	Molekül Ağırlığı(kDa)	Zeta Potansiyeli (mV)	Hidrodinamik Çap(nm)
BSA	4,7	66,430	-15,5	9,292
HSA	4,7	66,430	-16,4	9,231
PEPSİN	2,2-3,0	34,620	-13,0	6,287
HEMOGLOBİN	6,8	64,500	-3,4	8,170
TROMBIN	6,35-7,6	37,400	-5,8	6,852
LİZOZİM	11,3	14,307	+25,2	5,917
SİTOKROM-C	10-10,5	12,327	+20,1	5,101
AVIDİN	10,0	66,000	+18,2	8,920

Tablo dikkatli bir şekilde incelendiğinde hidrodinamik çapların molekül ağırlıkları ile doğru orantılı olduğu görülmektedir. Bu da zaten beklenen bir durumdur. Zeta potansiyellerin ise proteinlerin izoelektrik noktasına bağlı olarak değiştiği görülmektedir. İzoelektrik noktası yüksek olan proteinler pozitif zeta potansiyele (avidin, lizozim gibi), düşük izoelektrik noktasına sahip olan proteinler ise negatif zeta potansiyele (BSA, pepsin gibi) sahiptirler.

YZRS ile protein analizleri literatürde çok yaygın olarak araştırılmaktadır. Genellikle YZRS substratı olarak kolloidal nanoparçacıklar, kolay hazırlanabildiğinden ve yeterince yüksek zenginleştirme faktörüne sahip olduklarından dolayı tercih edilmektedir. Bu çalışmada hazırlanan AgNDs lerin protein tayini için kullanılabilirliğini araştırmak ve nanoparçacık kullanılarak yapılan protein analizler ile karşılaştırmak için öncelikle protein analizi için nanoparçacıklar kullanıldı. Bunun için 8x AgNPs ile 100 µg/mL protein çözeltileri ile eşit hacimde karıştırarak AgNPs derişimi 4x, protein derişimi 50 µg/mL olarak elde edildi. Bu karışımdan 5 µL CaF₂ üzerine damlatılarak kurutuldu ve kuruyan yüzeylerden YZRS spektrumları alındı. Şekil 4.7'da CaF₂ üzerine damlatılan 4x AgNPs, 4x AgNPs-BSA ve 4x AgNPs-

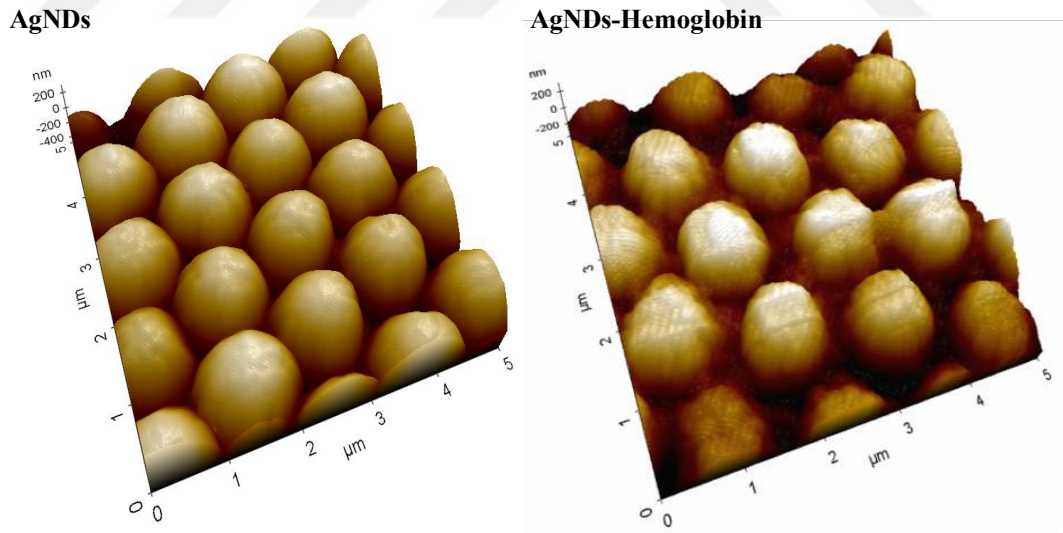
lizozim 50x objektifle alınan beyaz ışık mikroskop görüntüleri ve AgNPs-protein karışımlarından elde edilen YZRS spektrumları görülmektedir.



Şekil 4.7 50x objektifle alınan ışın mikroskop görüntüleri A) AgNPs, B) AgNPs-BSA, C) AgNPs-Lizozim ve D) C ve D görüntüsünden alınan YZRS spektrumları.

Şekildeki elde edilen ışık mikroskop görüntülerine bakılacak olursa tek başına damlatılan AgNPs dağılımı ile AgNPs-BSA karışımından damlatılan nanoparçacıkların dağılımı benzer olduğu görülmektedir. AgNPs sitrat indirgeme yöntemi ile hazırlandı ve sitrattan dolayı negatif yüke sahiptir. Yüzeye damlatıp kendiliğinden kurumaya bırakıldığında herhangi bir toplanma görülmemektedir. AgNPs-BSA karışımını yüzeye damlatıp kurutulduğu zaman yine nanoparçacıklarda toplanma olmamaktadır. Çünkü karıştırılan protein negatif yüke sahiptir (Tablo 4.1). Kullanılan AgNPs de negatif yüklü olduğundan bir itme kuvveti söz konusudur ve herhangi bir etkileşim olmamaktadır. Bu neden tek başına damlatılan AgNPs gibi dağılım göstermektedir. Ancak AgNPs-lizozim karışımı yüzeye damlatılıp kurutulduğunda AgNPs bir araya gelerek yığıntılar oluşturduğu görülmektedir (Şekil 4.7C). Bunun nedeni ise pozitif yüklü lizozim proteinleri negatif yüklü AgNPs ile etkileşime girerek AgNPs yüzey yükünü azaltarak (zeta potansiyelin azalması) yığıntı olmasına neden olmaktadır. Genel olarak negatif yüklü proteinler negatif yüklü AgNPs ile etkileşime girmez iken, pozitif yüklü proteinler AgNPs ile etkileşime girmektedir. Elde edilen YZRS spektrumlarına bakıldığında (Şekil 4.7D) negatif yüklü BSA proteininden herhangi bir YZRS spektrumu elde edilemezken, pozitif yüklü lizozim

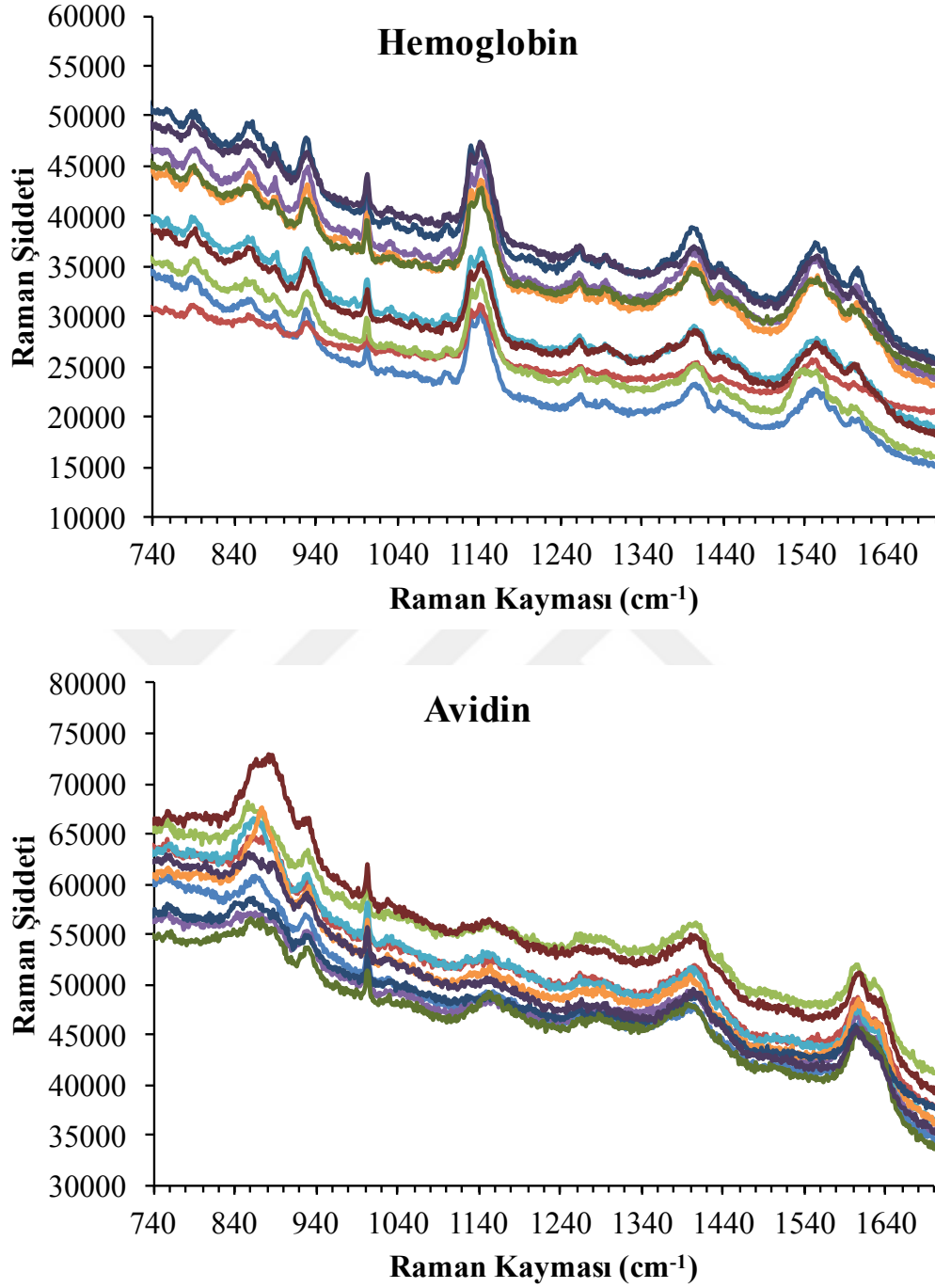
proteininden YZRS sepktrumu elde edildi. Bunun nedeni aynı yüke sahip olan AgNPs ve BSA etkileşime girmediğinden, dolayısı ile proteinlerin plazmonik AgNPs yüzeyine yaklaşmadığı için YZRS sepktrumu elde edilememektedir. Ancak pozitif yüklü lizozim negatif yüklü AgNPs ile elektrostatik etkileşime girerek AgNPs üzerine tutunmakta ve ayrıca AgNPs yığıntı oluşturmalarına neden olmaktadır. Yüzeye tutunduğu için YZRS sepktrumu elde edildi. Çünkü temel olarak molekülün plazmonik yüzeye 1-4 nm uzaklıkta olmalıdır. İkinci olarak AgNPs-lizozim yığıntı oluşturduğu için daha iyi zenginleştirme elde edildi. Buna bağlı olarak sepktrum elde edildi. Sonuçlara bakıldığında eğer negatif yüklü AgNPs kullanıldığında ancak pozitif yüklü proteinlerden YZRS sepktrumu elde edilebilmektedir. Negatif yüklü proteinlerden YZRS sepktrumu elde edilememektedir. Bu koloidal nanoparçacıkların kullanımını sınırlamaktadır. Literatürde katı YZRS substratları hazırlanarak bu elimine edilmeye çalışılmaktadır. Bu projede hazırlanan katı ve üç boyutlu AgNDs üzerinde YZRS'ye dayalı protein tayini yapılabirliği araştırıldı. Bunun için hazırlanan AgNDs üzerine 50 µg/mL derişimde proteinler damlatıldı. Şekil 4.8'de boş AgNDs ve üzerine hemoglobin damlatılan AgNDs yüzeylerinden alınan AFM görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.8 AgNDs ve üzerine 5 µL hemoglobin (50µg/mL) damlatılan AgNDs.

Proteinler AgNDs üzerine damlatılıp kurutulunca, nanoboyuttaki proteinler nanokubbeler arasına dolarak nanokubbelerin morfolojisini değiştirmektedir. Daha önce yapılan elektromagnetik modellemelerde en yüksek elektrik alanı nanokubbeler arasında olduğu gösterilmişti. Nanokubbeler arasında bulunan proteinlerden daha zengin YZRS sepktrumu alınması beklenmektedir. Hemoglobin ve avidin proteinleri

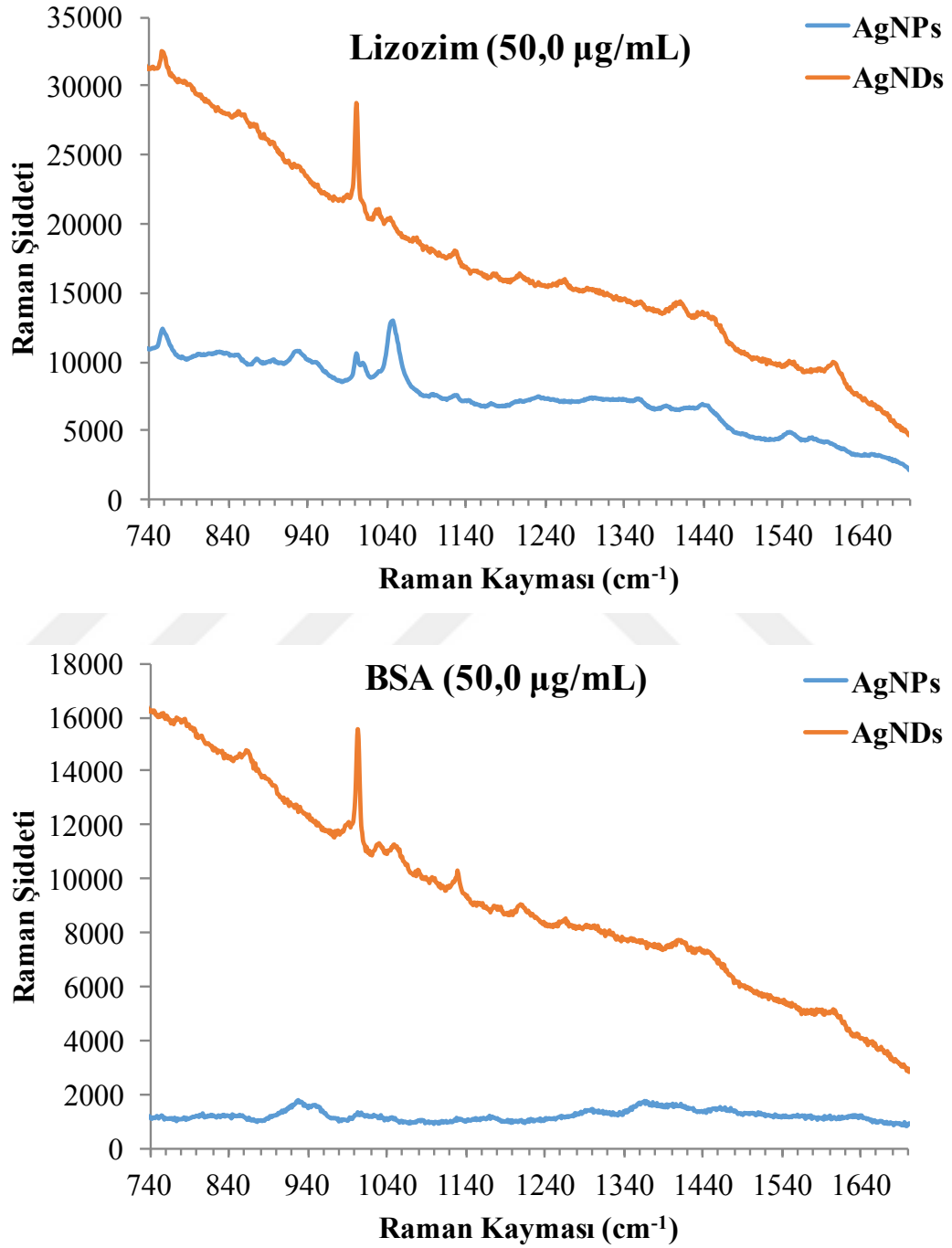
AgNDs üzerine damlatılarak kurutuldu ve yüzeylerin 10 farklı bölgesinden YZRS spektrumları elde edildi (Şekil 4.9).



Şekil 4.9 AgNDs üzerine damlatılan hemoglobin ve avidin proteinlerden elde edilen YZRS spektrumları (protein derişimleri 50µg/mL’dir)

Elde edilen YZRS spektrumlarına bakıldığında tekrarlanabilirliğin iyi olduğu görülmektedir.

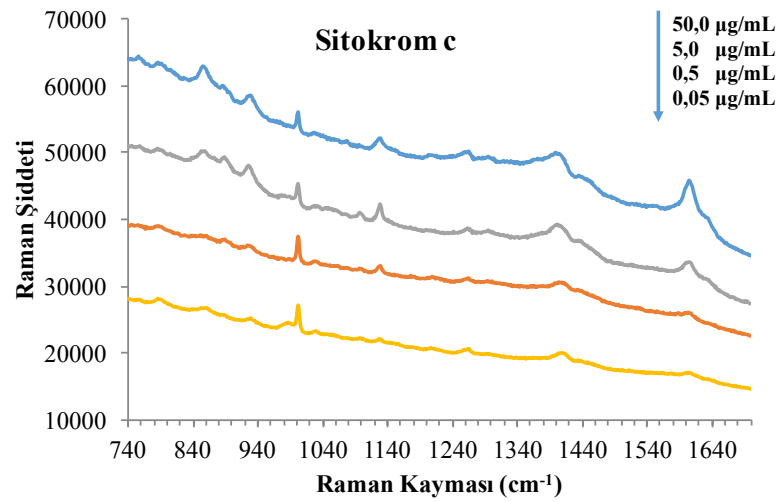
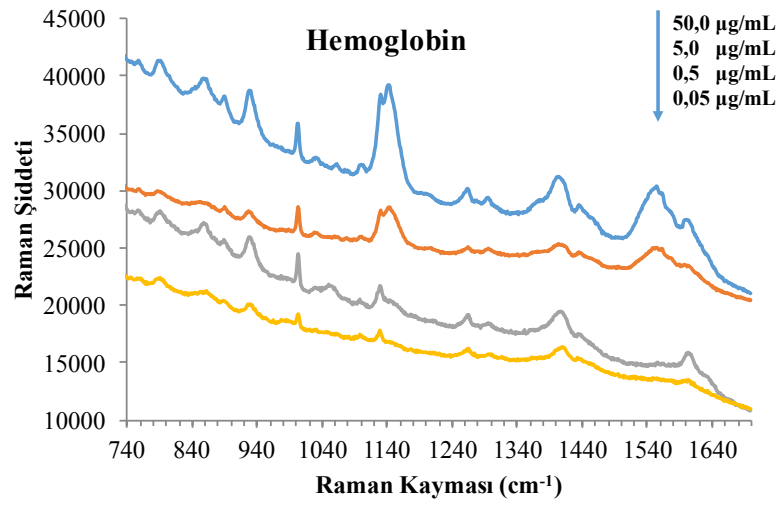
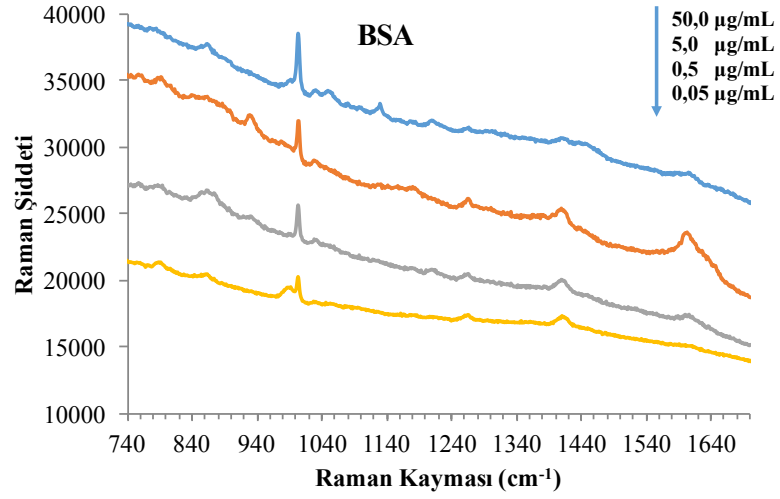
AgNDs yüzeylerine damlatılan proteinlerden elde edilen YZRS spektrumları ile AgNPs kullanılarak alınan YZRS spektrumları karşılaştırarak AgNDs yüzeylerinin protein tayininde kullanılabilirliği test edildi (Şekil 4.10).



Şekil 4.10 AgNPs ile karıştırılan ve AgNDs üzerine damlatılan lizozim ve BSA proteinlerden elde edilen YZRS spektrumları.

Şekilde görüldüğü gibi aynı yüke sahip AgNPs ve protein (BSA) kullanıldığı zaman herhangi bir spektrum elde edilememektedir. Ancak protein AgNDs üzerine damlatılınca, proteinler nanokubbelerin arasına dolduğundan iyi bir YZRS spektrumu elde edilmektedir. Katı bir yüzeye proteinler damlatıldığı için yükten bağımsız olarak spektrum elde edilmektedir. Pozitif yüklü protein (Lizozim) ile negatif yüklü AgNPs kullanıldığında etkileşim olduğundan YZRS spektrumu elde edildi. Aynı protein AgNDs üzerine damlatılarak elde edilen YZRS spektrumu bakıldığı zaman AgNPs göre daha şiddetli ve fazla pik içeren YZRS spektrumu elde edildi. AgNPs kullanıldığı zaman 1050 cm^{-1} elde edilen pik AgNPs den kaynaklanmaktadır. AgNDs kullanıldığı zaman katı bir metalik yüzey olduğundan herhangi bir arka plan (background) spektrumu elde edilmedi. Bu YZRS deneylerinde istenen bir durumdur. Elde edilen sonuçlara bakıldığında YZRS dayalı protein tayininde YZRS substratı olarak AgNDs kullanılabileceği sonucuna varıldı.

Proteinlerin AgNDs üzerinde YZRS'ye dayalı tayininde en düşük protein derişimi belirlemek için farklı derişimlerde protein çözeltileri hazırlanarak AgNDs üzerine damlatıldı ve kurutuldu. Elde edilen azalan derişimine bağlı olarak proteinlerin YZRS spektrumları Şekil 4.11'da görülmektedir.



Şekil 4.11 AgNDs üzerine damlatılan proteinlerin azalan derişime bağı olarak elde edilen YRZS spektrumları

Spektrumlar incelendiğinde proteinlerin büyüklüğünden ve yükünden bağımsız olarak 0,05 µg/mL'ye kadar spektrum (tayin) elde edildiği görülmektedir.

BÖLÜM 5

SONUÇ

Proteinlerin tanı ve tayini yapılırken elbette ki hızlı, ucuz ve tekrarlanabilir olması istenen bir durumdur. YZRS tekniğinin bu avantajlarından dolayı literatürde birçok çalışma mevcuttur. YZRS ile protein tespitinde sorun oluşturan birçok neden vardır. Proteinlerin ortamın pH'sına göre yüklü olması ve elektronca zengin halkalı grupların iç kısımda yer alması proteinlerden elde edilen YZRS spektrumunun zenginliğini ve tekrarlanabilirliğini olumsuz etkilemektedir. Bu dezavantajlarını ortadan kaldırmak için plazmonik AgNDs yapıları hazırlanarak YZRS substratı olarak kullanıldı. Bu amaç için öncelikle iletim derleme yöntemi ile 1600 nm büyüklüğündeki lateks parçacıkları düzenli bir şekilde cam lam üzerine biriktirildi. Daha sonra elde edilen tabakanın üzeri PDMS dökülerek sıcaklıkla polimerleştirildi. Kullanılan latex parçacıklarının büyüklük ve genişliğine bağlı olarak PDMS yüzeyinde nanoçukurcuklar oluşturuldu. Elde edilen PDMS nanoçukurcuklar elektrokimyasal kaplama ile Ag ile doldurularak AgNDs elde edildi. AgNDs yüzeyden sökülmesini sağlamak için Ni büyütme yapıldı. Elde edilen AgNDs'ler üzerinde YZRS'ye dayalı protein tayini için model proteinler kullanıldı. YZRS deneylerinde kullanılan proteinlerin büyüklüğü ve yükü sonuçları etkilediğinden dolayı, tezde kullanılan proteinlerin büyüklükleri ve yükleri Zetasizer cihazı ile belirlendi. AgNDs'lerin protein tayini için uygulanabilirliğini test etmek ve karşılaştırmak için genellikle YZRS deneylerinde kullanılan AgNPs ile karşılaştırıldı. Bu amaçla öncelikle protein analizi için AgNPs kullanıldı. 8x AgNPs ile 100 µg/mL protein çözeltileri ile eşit hacimde karıştırarak AgNPs derişimi 4x, protein derişimi 50 µg/mL olarak elde edildi. Bu karışımdan 5 µL CaF₂ üzerine damlatılarak kurutuldu ve kuruyan yüzeylerden YZRS spektrumları alındı. Yapılan çalışmalarda kolloidal süspansiyon (AgNPs-protein) karışımlarından alınan YZRS spektrumlarında protein yükünün son derece önemle olduğu saptandı. AgNPs ile aynı yüke sahip proteinler birbirini ittiğinden dolayı etkileşim olmadığından YZRS spektrumu elde edilemedi. AgNPs ile zıt yüke sahip olan proteinlerden elektrostatik etkileşimden dolayı YZRS spektrumu elde edilebildi. Elde edilen bu sonuçlar kolloidal AgNPs kullanıldığında

protein yükü YZRS deneylerini etkilediğinden dezavantaj yaratmaktadır. Bu nedenle kolloidal süspansiyonlar yerine bu tez çalışmasında AgNDs'ın proteinlerle direk etkileşimini sağlayarak proteinlerin yük ve büyüklüğünden bağımsız YZRS'ye dayalı protein tayini yapıldı. Protein tayini için AgNDs üzerine proteinler damlatılarak YZRS spektrumları alındı. Protein damlatılan AgNDs'ların morfolojik yapısının değiştiği AFM ile tespit edildi. Proteinler AgNDs yüzeyine damlatıldığında protein molekülleri nanokubbeler arasına dolduğu gözlemlendi. AgNDs üzerine damlatılan proteinlerden elde edilen YZRS spektrumlarının hem oldukça tekrarlanabilir hem de daha zengin olduğu gözlemlendi. Proteinlerden elde edilen YZRS spektrumlarının daha zengin olması, hazırlanan AgNDs arasının, diğer bölgelere göre en yüksek elektrik alanına sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Elde edilen sonuçlar, proteinlerin yükünden ve büyüklüğünden bağımsız 0.05 $\mu\text{g/mL}$ 'ye kadar proteinlerin tespitinin yapılabileceğini gösterdi. Hazırlanan AgNDs yapıları YZRS'ye dayalı biyoalgılama ve kimyasal analizlerde YZRS substratı olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Han XX, Zhao B, Ozaki Y. (2009). Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal. Bioanal. Chem.* **394**, 1719-1727.
- [2] Ferraro JR, Nakamoto, K. 1994. Introductory Raman Spectroscopy, Acedemic Press, *New York*.
- [3] Kılıç E, Köseoğlu F, Yılmaz H. 1998. Enstrümantal Analiz İlkeleri, Ankara. Bilim Yayıncılık.
- [4] Kneipp K, Kneipp H, Kneipp J. (2006). Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates-from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells. *Acc Chem Res.* **39**, 443–50.
- [5] Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan A. (1974). Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. *Chem Phys Lett.* **26**, 163–6.
- [6] Jeanmaire DL, Duyne RPV. (1977). Surface Raman spectroelectrochemistry: part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode. *J Electroanal Chem Interfacial Electrochem.* **84**, 1–20.
- [7] Albrecht MG, Creighton JA. (1977). Anomalousy intense Raman spectra of pyridine at a silver electrode. *J Am Chem Soc.* **99**, 5215–7.
- [8] Nie S, Emory SR. (1997). Probing single molecules and single nanoparticles by surface-enhanced Raman scattering. *Science.* **275**, 1102–6.
- [9] Blackie EJ, Ru ECL, Etchegoin PG. (2009). Single-molecule surfaceenhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules. *J Am Chem Soc.* **131**, 14466–72.
- [10] Prinz J, Heck C, Ellerik L, Merk V, Bald I. (2016). DNA origami based Au- Ag-core-shell nanoparticle dimers with single-molecule SERS sensitivity. *Nanoscale.* **8**, 5612–20
- [11] Moskovits M. (1978). Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals. *J Chem Phys.* **69**, 4159–61.
- [12] Moskovits M. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Rev Mod Phys.* **57**, 783.
- [13] Otto A. (1984). Surface-enhanced Raman scattering:“classical” and “chemical” origins, in Light scattering in solids IV. *Berlin, Heidelberg, Springer.* 289–418.
- [14] Persson B. (1981). On the theory of surface-enhanced Raman scattering. *Chem Phys Lett.* **82**, 561–5.
- [15] Haynes CL, McFarland AD, Duyne RPV. (2005). Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Anal Chem.* **77**, 338A–46A.
- [16] Campion A, Kambhampati P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chem Soc Rev.* **27**, 241–50.
- [17] Moskovits M. (2013). Persistent misconceptions regarding SERS. *Phys Chem Chem Phys.* **15**, 5301–11.

- [18] Halas NJ, Moskovits M. (2013). Surface-enhanced Raman spectroscopy: substrates and materials for research and applications. *MRS Bull.* **38**, 607–11.
- [19] Suzuki M, Niidome Y, Kuwahara Y, Terasaki N, Inoue K, Yamada S. (2004). Surface-enhanced nonresonance Raman scattering from size-and morphology-controlled gold nanoparticle films. *J Phys Chem B.* **108**, 11660–5.
- [20] Seney CS, Gutzman BM, Goddard RH. (2008). Correlation of size and surface-enhanced Raman scattering activity of optical and spectroscopic properties for silver nanoparticles. *J Phys Chem C.* **113**, 74–80.
- [21] Njoki PN, Lim IS, Mott D, et al. (2007). Size correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles. *J Phys Chem C.* **111**, 14664–9.
- [22] Bell SE, McCourt MR. (2009). SERS enhancement by aggregated Au colloids: effect of particle size. *Phys Chem Chem Phys.* **11**, 7455–62.
- [23] Sant'Ana A, Rocha TCR, Santos PS, Zanchet D, Temperini MLA. (2009). Size-dependent SERS enhancement of colloidal silver nanoplates: the case of 2-amino-5-nitropyridine. *J Raman Spectrosc.* **40**, 183–90.
- [24] Tiwari VS, Oleg T, Darbha GK, Hardy W, Singh JP, Ray PC. (2007). Nonresonance SERS effects of silver colloids with different shapes. *Chem Phys Lett.* **446**, 77–82.
- [25] Ciou S-H, Cao Y-W, Huang H-C, Su D-Y, Huang C-L. (2009). SERS enhancement factors studies of silver nanoprism and spherical nanoparticle colloids in the presence of bromide ions. *J Phys Chem C.* **113**, 9520–5.
- [26] Kwon K, Lee KY, Lee YW, et al. (2007). Controlled synthesis of icosahedral gold nanoparticles and their surface-enhanced Raman scattering property. *J Phys Chem C.* **111**, 1161–5.
- [27] Guo H, Ruan F, Lu L, et al. (2009). Correlating the shape, surface plasmon resonance, and surface-enhanced Raman scattering of gold nanorods. *J Phys Chem C.* **113**, 10459–64.
- [28] Zhang J, Li X, Sun X, Li Y. (2005). Surface enhanced Raman scattering effects of silver colloids with different shapes. *J Phys Chem B.* **109**, 12544–8.
- [29] Zou X, Dong S. (2006). Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated silver nanoplates in aqueous solution. *J Phys Chem B.* **110**, 21545–50.
- [30] Nikoobakht B, El-Sayed MA. (2003). Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated gold nanorods. *J Phys Chem A.* **107**, 3372–8.
- [31] Jana NR, Pal T. (2007). Anisotropic metal nanoparticles for use as surface-enhanced Raman substrates. *Adv Mater.* **19**, 1761–5.
- [32] Orendorff CJ, Gearheart L, Jana NR, Murphy CJ. (2006). Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates. *Phys Chem Chem Phys.* **8**, 165–70.
- [33] Link S, Wang ZL, El-Sayed M. (1999). Alloy formation of gold-silver nanoparticles and the dependence of the plasmon absorption on their composition. *J Phys Chem B.* **103**, 3529–33.

- [34] Rodríguez-González B, Burrows A, Watanabe M, Kiely CJ, Liz Marzán LM. (2005). Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties. *J Mater Chem.* **15**, 1755–9.
- [35] Liu M, Guyot-Sionnest P. (2004). Synthesis and optical characterization of Au/Ag core/shell nanorods. *J Phys Chem B.* **108**, 5882–8.
- [36] Tognalli NG, Fainstein A, Calvo EJ, Abdelsalam M, Bartlett PN. (2012). Incident wavelength resolved resonant SERS on Au sphere segment void (SSV) arrays. *J Phys Chem C.* **116**, 3414–20.
- [37] Lee SH, Bantz KC, Lindquist NC, Oh SH, Haynes CL. (2009). Self-assembled plasmonic nanohole arrays. *Langmuir.* **25**, 13685–93.
- [38] Yu Q, Guan P, Qin D, Golden G, Wallace PM. (2008). Inverted sizedependence of surface-enhanced Raman scattering on gold nanohole and nanodisk arrays. *Nano Lett.* **8**, 1923–8.
- [39] Brolo AG, Arctander E, Gordon R, Leathem B, Kavanagh KL. (2004). Nanohole-enhanced Raman scattering. *Nano Lett.* **4**, 2015–8.
- [40] Baca AJ, Truong TT, Cambrea LR, et al. (2009). Molded plasmonic crystals for detecting and spatially imaging surface bound species by surface-enhanced Raman scattering. *Appl Phys Lett.* **94**, 243109.
- [41] Cinel NA, Bütün S, Ertas G, et al. (2013). “Fairy chimney”-shaped tandem metamaterials as double resonance SERS substrates. *Small.* **9**, 531–7.
- [42] Yu Q, Braswell S, Christin B, et al. (2010). Surface-enhanced Raman scattering on gold quasi-3D nanostructure and 2D nanohole arrays. *Nanotechnology.* **21**, 355301.
- [43] Cintra S, Abdelsalam ME, Bartlett PN, et al. (2006). Sculpted substrates for SERS. *Faraday Discuss.* **132**, 191–9.
- [44] Kahraman M, Daggumati P, Kurtulus O, Seker E, (2013). Wachsmann- Hogue S. Fabrication and characterization of flexible and tunable plasmonic nanostructures. *Scientific Reports.* **3**, 3396, 1–9.
- [45] Grand J, de la Chapelle LM, Bijeon J-L, Adam P-M, Vial A, Royer P. (2005). Role of localized surface plasmons in surface-enhanced Raman scattering of shape-controlled metallic particles in regular arrays. *Phys Rev B.* **72**, 033407.
- [46] Haynes CL, Duyne RPV. (2003). Plasmon-sampled surface-enhanced Raman excitation spectroscopy. *J Phys Chem B.* **107**, 7426–33.
- [47] Féridj N, Aubard J, Lévi G, et al. (2002). Controlling the optical response of regular arrays of gold particles for surface-enhanced Raman scattering. *Phys Rev B.* **65**, 075419.
- [48] McFarland AD, Young MA, Dieringer JA, Duyne RPV. (2005). Wavelength scanned surface-enhanced Raman excitation spectroscopy. *J Phys Chem B.* **109**, 11279–85.
- [49] Haes AJ, Haynes CL, McFarland AD, Schatz GC, Duyne RPV, Zou S. (2005). Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy. *MRS Bull.* **30**, 368–75.
- [50] Stiles PL, Dieringer JA, Shah NC, Duyne RPV. (2008). Surface-enhanced Raman spectroscopy. *Annu Rev Anal Chem (Palo Alto Calif).* **1**, 601–26.

- [51] Yang WH, Schatz GC, Duyne RPV. (1995). Discrete dipole approximation for calculating extinction and Raman intensities for small particles with arbitrary shapes. *J Chem Phys.* **103**, 869–75.
- [52] Gray SK, Kupka T. (2003). Propagation of light in metallic nanowire arrays: finite-difference time-domain studies of silver cylinders. *Phys Rev B.* **68**, 045415.
- [53] Dieringer JA, McFarland AD, Shah NC, et al. (2006). Introductory lecture surface enhanced Raman spectroscopy: new materials, concepts, characterization tools, and applications. *Faraday Discuss.* **132**, 9–26.
- [54] Whitney AV, Elam JW, Zou S, et al. (2005). Localized surface plasmon resonance nanosensor: a high-resolution distance-dependence study using atomic layer deposition. *J Phys Chem B.* **109**, 20522–8.
- [55] Alvarez-Puebla RA, Arceo E, Goulet PJ, Garrido JJ, Aroca RF. (2005). Role of nanoparticle surface charge in surface-enhanced Raman scattering. *J Phys Chem B.* **109**, 3787–92.
- [56] Faulds K, Littleford RE, Graham D, Dent G, Smith WE. (2004). Comparison of surface-enhanced resonance Raman scattering from unaggregated and aggregated nanoparticles. *Anal Chem.* **76**, 592–8.
- [57] Kahraman M, Tokman N, Culha M. (2008). Silver nanoparticle thin films with nanocavities for surface-enhanced Raman scattering. *Chem Phys Chem.* **9**, 902–10.
- [58] Kahraman M, Tokman N, Türkoğlu G. (2008). Surface-enhanced Raman scattering on aggregates of silver nanoparticles with definite size. *J Phys Chem C.* **112**, 10338–43.
- [59] Kahraman M, Aydın Ö, Culha M. (2009). Size effect of 3D aggregates assembled from silver nanoparticles on surface-enhanced Raman scattering. *Chem Phys Chem.* **10**, 537–42.
- [60] Sharma B, Frontiera RR, Henry A-I, Ringe E, Duyne RPV. (2012). SERS: materials, applications, and the future. *Materials Today.* **15**, 16–25.
- [61] Lu X, Rycenga M, Skrabalak SE, Wiley B, Xia Y. (2009). Chemical synthesis of novel plasmonic nanoparticles. *Annu Rev Phys Chem.* **60**, 167–92.
- [62] Ding T, Sigle DO, Herrmann LO, Wolverson D, Baumberg JJ. (2014). Nanoimprint lithography of Al nanovoids for deep-UV SERS. *ACS Appl Mater Interfaces.* **6**, 17358–63.
- [63] Le Ru E, Etchegoin P. (2008). Principles of surface-enhanced Raman spectroscopy: and related plasmonic effects. *Wellington, New Zealand, Elsevier.*
- [64] Rycenga M, Cobley CM, Zeng J, et al. (2011). Controlling the synthesis and assembly of silver nanostructures for plasmonic applications. *Chem Rev.* **111**, 3669–712.
- [65] Orendorff CJ, Gole A, Sau TK, Murphy CJ. (2005). Surface-enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayers: sandwich architecture and nanoparticle shape dependence. *Anal Chem.* **77**, 3261–6.
- [66] Wiley BJ, Chen Y, McLellan JM, et al. (2007). Synthesis and optical properties of silver nanobars and nanorice. *Nano Lett.* **7**, 1032–6.

- [67] Wu HY, Choi CJ, Cunningham BT. (2012). Plasmonic nanogap-enhanced Raman scattering using a resonant nanodome array. *Small*. **8**, 2878–85.
- [68] Ye J, Wen F, Sobhani H, et al. (2012). Plasmonic nanoclusters: near field properties of the Fano resonance interrogated with SERS. *Nano Lett.* **12**, 1660–67.
- [69] Singh J, Chu H, Abell J, Tripp RA, Zhao Y. (2012). Flexible and mechanical strain resistant large area SERS active substrates. *Nanoscale*. **4**, 3410–4.
- [70] Chung AJ, Huh YS, Erickson D. (2011). Large area flexible SERS active substrates using engineered nanostructures. *Nanoscale*. **3**, 2903–8.
- [71] Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR, and Feld, M.S. (1997). Single Molecule Detection using Surface-Enhanced Raman Scattering. *Phys. Rev. Letters*. **78**, 1667–1670.
- [72] Murphy GP, Elgamal AA, Su SL, Bostwick DG, Holmes EH. (1998). Current evaluation of the tissue localization and diagnostic utility of prostate specific membrane antigen. *Cancer*. **83**, 2259–69.
- [73] Han XX, Zhao B, Ozaki Y. (2009). Surface-enhanced Raman scattering for protein detection. *Anal Bioanal Chem*. **394**, 1719–27.
- [74] Li J, Zhang Z, Rosenzweig J, Wang YY, Chan DW. (2002). Proteomics and bioinformatics approaches for identification of serum biomarkers to detect breast cancer. *Clin Chem*. **48**, 1296–304.
- [75] Baggerly KA, Morris JS, Coombes KR. (2004). Reproducibility of SELDITOF protein patterns in serum: comparing datasets from different experiments. *Bioinformatics*. **20**, 777–85.
- [76] Cao YC, Jin R, Nam JM, Thaxton CS, Mirkin CA. (2003). Raman dyelabeled nanoparticle probes for proteins. *J Am Chem Soc*. **125**, 14676–7.
- [77] Grubisha DS, Lipert RJ, Park HY, Driskell J, Porter MD. (2003). Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels. *Anal Chem*. **75**, 5936–43.
- [78] Xu S, Ji X, Xu W, et al. (2004). Immunoassay using probe-labelling immunogold nanoparticles with silver staining enhancement via surface-enhanced Raman scattering. *Analyst*. **129**, 63–8.
- [79] Liang Y, Gong JL, Huang Y, et al. (2007). Biocompatible core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman scattering probes for detection of DNA related to HIV gene using silicacoated magnetic nanoparticles as separation tools. *Talanta*. **72**, 443–9.
- [80] Kho KW, Dinis US, Kumar A, Olivo M. (2012). Frequency shifts in SERS for biosensing. *ACS Nano*. **6**, 4892–902.
- [81] Kahraman M, Sur I, Çulha M. (2010). Label-free detection of proteins from self-assembled protein-silver nanoparticle structures using surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem*. **82**, 7596–602.
- [82] Han XX, Jia HY, Wang YF, et al. (2008). Analytical technique for label-free multi-protein detection based on Western blot and surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem*. **80**, 2799–804.

- [83] Han XX, Cai LJ, Guo J, et al. (2008). Fluorescein isothiocyanate linked immunoabsorbent assay based on surface-enhanced resonance Raman scattering. *Anal Chem.* **80**, 3020–4.
- [84] Owens P, Phillipson N, Perumal J, O'Connor GM, Olivo M. (2015). Sensing of p53 and EGFR biomarkers using high efficiency SERS substrates. *Biosensors.* **5**, 664–77.
- [85] Perumal J, Kong KV, Dinish US, Bakker RM, Olivo M. (2014). Design and fabrication of random silver films as substrate for SERS based nano-stress sensing of proteins. *RSC Adv.* **4**, 12995–3000.
- [86] Han XX, Kitahama Y, Tanaka Y, et al. (2008). Simplified protocol for detection of protein-ligand interactions via surface-enhanced resonance Raman scattering and surface-enhanced fluorescence. *Anal Chem.* **80**, 6567–72.
- [87] Bizzarri AR, Cannistraro S. (2002) Surface-enhanced resonance Raman spectroscopy signals from single myoglobin molecules. *Appl Spectrosc.* **56**, 1531–7.
- [88] Han XX, Huang GG, Zhao B, Ozaki Y. (2009). Label-free highly sensitive detection of proteins in aqueous solutions using surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chem.* **81**, 3329–33.
- [89] Han XX, Kitahama Y, Itoh T, Wang CX, Zhao B, Ozaki Y. (2009). Protein-mediated sandwich strategy for surface-enhanced Raman scattering: application to versatile protein detection. *Anal Chem.* **81**, 3350–5.
- [90] Keskin S, Çulha M. (2012). Label-free detection of proteins from dried-suspended droplets using surface-enhanced Raman scattering. *Analyst.* **137**, 2651–7.
- [91] Kahraman M, Balz BN, Wachsmann-Hogiu S. (2013). Hydrophobicity-driven self-assembly of protein and silver nanoparticles for protein detection using surface-enhanced Raman scattering. *Analyst.* **138**, 2906–13.
- [92] Kahraman M, Wachsmann-Hogiu S. (2015). Label-free and direct protein detection on 3D plasmonic nanovoid structures using surface-enhanced Raman scattering. *Anal Chim Acta.* **856**, 74–81.
- [93] Matteini P, de Angelis M, Ulivi L, Centi S, Pini R. (2015). Concave gold nanocube assemblies as nanotraps for surface-enhanced Raman scattering-based detection of proteins. *Nanoscale.* **7**, 3474–80.
- [94] Avci E, Culha M. (2014). Influence of protein size on surface-enhanced Raman scattering (SERS) spectra in binary protein mixtures. *Appl Spectrosc.* **68**, 890–9.
- [95] Zhou Z, Han X, Huang GG, Ozaki Y. (2012). Label-free detection of binary mixtures of proteins using surface-enhanced Raman scattering. *J Raman Spectrosc.* **43**, 706–11.
- [96] Keskin S, Kahraman M, Çulha M. (2011). Differential separation of protein mixtures using convective assembly and label-free detection with surface-enhanced Raman scattering. *Chem Commun.* **47**, 3424–6.
- [97] Solomons G, Fryhle C. 2008. Organic Chemistry, Wiley.
- [98] Prof. Dr. E. Keha, Prof. Dr. Ö. İrfan Küfrevioğlu. 2015. Biyokimya. 11. Baskı. Erzurum: Aktif yayınevi.