

**TOPLAM PROTEİN TAYİNİNDE NANOPARTİKÜL TABANLI YENİ
ANALİZ SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ**

Merve ERYILMAZ

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

AĞUSTOS 2014

Merve ERYILMAZ tarafından hazırlanan “Toplam Protein Tayininde Nanopartikül Tabanlı Yeni Analiz Sistemlerinin Geliştirilmesi” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile Gazi Üniversitesi Analitik Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Uğur TAMER

Analitik Kimya ABD, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Başkan: Prof. Dr. Mehmet Tefik ORBEY

Analitik Kimya ABD, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Üye: Prof. Dr. İsmail Hakkı Boyacı

Gıda Mühendisliği, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum

Tez Savunma Tarihi: .../.../....

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....
Müdür Ünvanı Adı Soyadı
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

TOPLAM PROTEİN TAYİNİNDE NANOPARTİKÜL TABANLI YENİ ANALİZ
SİSTEMLERİNİN GELİŞTİRİLMESİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Merve ERYILMAZ

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Ağustos 2014

ÖZET

Toplam protein miktarının belirlenmesi yaşam bilimleri için önemli bir analitik konudur. Sütteki toplam protein miktarının belirlenmesi gıda kalitesi tespitinde ön plana çıkarken, idrar ve kandaki toplam protein miktarının belirlenmesi hastalıkların teşhisinde önem kazanmaktadır. Her alanda tercih edilen yöntemler farklılık göstermektedir, bu yüzden her çalışmada kullanılabilecek hassas hızlı ve basit bir yöntemin geliştirilmesi üzerinde çalışılmıştır. Bu tez kapsamında yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması (Surface-enhanced Raman Spectroscopy, SERS) kullanılarak toplam protein tayini ile gerçekleştirilmesi hedeflenmiştir. Bu amaçla iki farklı analitik yaklaşım geliştirilmiştir. İlk olarak klik kimyası temelli toplam protein tayini amaçlanmıştır. Bunun için azid modifiye silikon yüzeyler ve nanoküreler ile 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)-alkin modifiye nanopartiküller hazırlanarak heterojen ve homojen analiz sistemleri kurulmuştur. Bu sistemlerde ortama eklenen biuret reaktifi üzerine protein standardı eklendiğinde partikül ve yüzey/partikül arasında klik kimyası reaksiyonu gerçekleşmiş ve protein konsantrasyonuna paralel DTNB etiketinin SERS sinyali izlenmiştir. İkinci tayin stratejisinde ise o-fitalaldehit (OPA) molekülü ile toplam protein miktarı tayini nanoçubuklar kullanılarak yapılmıştır. Tamamlanmış OPA reaktifi sadece amin gruplarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Artan protein miktarının derişimine paralel OPA molekülünün spektral bant intensiteleri kullanılarak doğrusal kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Geliştirilen her iki yöntemde protein standardı olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır. Gerçek örnek olarak süt numuneleri seyreltme işlemi yapılarak analiz yöntemlerinde denenmiştir.

Bilim Kodu : 201.1.004
Anahtar Kelimeler : Toplam protein, süt, nanopartikül, SERS
Sayfa Adedi : 73
Danışman : Doç. Dr. Uğur TAMER

DEVELOPMENT OF NEW ANALYSIS SYSTEMS FOR TOTAL PROTEIN
ASSAYS BASED ON NANOPARTICLES
(M. Sc. Thesis)

Merve ERYILMAZ

GAZI UNIVERSITY
INSTITUTE OF HEALTH SCIENCES
August 2014

ABSTRACT

The quantitative determination of total protein is an important analytical task for the life sciences. Especially, accurate quantification of total proteins of milk has importance in many applications, ranging from food quality to diagnosis of diseases. In this scope, the determination of total protein using Surface enhanced Raman Spectroscopy (SERS) is proposed. For this purpose, two different methods were developed. Firstly, we prepared azide modified silica surfaces/particles and 5,5'-dithiobis-2-nitrobenzoic acid (DTNB)-alkyne modified gold nanorod particles to perform both a heterogen assay and a homogen assay. In these assays, biuret reagent added to the medium to occur the click reaction between the particles in the presence of protein. The protein concentration was monitored in a paralel signal ratio of DTNB tag. In the second method, o-phthalaldehyde (OPA) used to quantify total protein using nanoparticles. Completed OPA reagent binds specifically only to amine groups of proteins. Proportional to the increasing amount of protein concentration, OPA molecules spectral band intensity were monitored and linear calibration graph was obtained. In developed methods, bovine serum albumine (BSA) was used as protein standard and as a real sample, milk was tested only by dilution.

Science Code : 201.1.004
Key Words : Total protein, milk, nanoparticle, SERS
Page Number : 73
Advisor : Assoc. Prof. Dr. Uğur TAMER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT	v
İÇİNDEKİLER	vi
ÇİZELGELERİN LİSTESİ	ix
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	x
RESİMLERİN LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. Proteinler	5
2.1.1. Süt Proteinleri	6
2.2. Toplam Protein Tayini Yöntemleri	8
2.2.1. Toplam azot miktarı değerlendirilen yöntemler	8
2.2.2. Spektrofotometrik yöntemler	10
2.3. Raman Spektroskopisi	14
2.3.1. Raman spektrofotometre bileşenleri	16
2.3.2. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (Surface-enhanced Raman spektroskopisi, SERS) ...	17
2.3.3. SERS substratları	19
2.4. Metal Nanopartiküller	20
2.4.1. Altın nanopartiküller	21
2.4.2. Nanopartikül karakterizasyonu	22
2.5. Klık kimyası	22

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	25
3.1. OPA-protein Etkileşiminin Nanopartikül Varlığında İncelenmesi	25
3.1.1. Kullanılan kimyasal maddeler	25
3.1.2. Kullanılan Cihaz ve gereçler	25
3.1.3. Kullanılan çözeltiler	26
3.1.4. Altın nanopartikül sentezi	27
3.1.5. Altın nanopartikül karakterizasyonu	27
3.1.6. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi	27
3.1.7. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi karakterizasyonu	28
3.1.8. Nanoartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi için en iyi koşulların belirlenmesi	28
3.1.9. OPA ile nanopartikül tabanlı toplam protein tayini çalışmaları	29
3.2. Nanopartiküller ile Klik Kimyası Temelli Toplam Protein Tayini	30
3.2.1. Kullanılan kimyasallar	30
3.2.2. Kullanılan cihaz ve gereçler	30
3.2.3. Nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu	31
3.2.4. Alkin – DTNB sentezi	33
3.2.5. Nanopartikül modifikasyonları	33
3.2.6. SERS substratı modifikasyon ve karakterizasyonu	35
3.2.7. Klik kimyasıyla nanopartikül tabanlı toplam protein miktarı tayin çalışmaları	36
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4.1. OPA-Protein Etkileşimi Temelli Toplam Protein Tayini Yönteminin Bulguları.....	41

4.1.1. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu	41
4.1.2. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi karakterizasyonu	43
4.1.3. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi için en iyi çalışma koşulları	44
4.1.4. Toplam protein miktarı belirleme çalışmaları	47
4.2. Klik Kimyası Temelli Toplam Protein Tayini Yönteminin Bulguları	50
4.2.1. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu	50
4.2.2. Nanopartiküllerin modifikasyonu	52
4.2.3. SERS substratları modifikasyon ve karakterizasyon...	53
4.2.4. Toplam protein miktarı belirleme çalışmaları.....	54
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	61
KAYNAKLAR	63
EKLER.....	69
EK-1. Nanopartikül varlığında Klik Kimyası (NP Klik) (homojen sistem) ve OPA (NP OPA) yardımıyla geliştirilen yöntemlerin geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması.....	70
ÖZGEÇMİŞ	71

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. İnek sütünün fiziksel – kimyasal durumu	6
Çizelge 2.2. Süt proteini çeşitleri ve derişimleri	7
Çizelge 6.1. Süt örneklerinde nanopartikül tabanlı OPA yöntemiyle toplam protein tayini sonuçları.....	50
Çizelge 6.2. Süt örneklerinde nanopartikül tabanlı OPA yöntemiyle toplam protein tayini sonuçları.....	59

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Bir proteinin aminoasit zincir modeli ile amino ve karboksil grupları	5
Şekil 2.2. Kjeldahl yönteminin reaksiyonları	9
Şekil 2.3. Bir protein – Cu ⁺² kompleksi oluşumunun 540 nm’de absorpsiyon veren menekşe renkli şelat kompleksi.....	10
Şekil 2.4. Tetradental-Cu ⁺¹ yapısının folin çözeltisiyle gerçekleştirdiği reaksiyon	11
Şekil 2.5. Protein varlığında indirgenen Cu ⁺² nin BCA ile 562 nm’de absorbans veren kompleksi	12
Şekil 2.6. Toplam protein tayini için 2 – merkaptoetanol varlığında o-fitalaldehit reaksiyonu	13
Şekil 2.7. Bir molekülün enerji diyagramı ve saçılma türleri	15
Şekil 2.8. Mikroskop sistemli bir Raman spektrofotometrenin şematik gösterimi	17
Şekil 2.9. Termal ve bakır (Cu) katalizörlü halka oluşum reaksiyonlarının gösterimi	23
Şekil 3.1. Sentezlenen alkin – DTNB molekülü yapısı	33
Şekil 3.2. Nanoçubukların alkin – DTNB ile modifikasyonu	34
Şekil 3.3. Manyetik nanoküre ve azid ile modifikasyonu	34
Şekil 3.4. Silika yüzeyin azid ile modifikasyonu	36
Şekil 3.5. Heterojen sistemde klik kimyası	37
Şekil 3.6. Homojen sistemde klik kimyası ile toplam protein tayini	38
Şekil 4.1. Altın nanoçubukların UV-visible spektrumu	42
Şekil 4.2. Nanopartikül içeren çözeltide o-fitalaldehit (OPA), 2mercaptoetanol ile oluşan tamamlanmış OPA çözeltisi (OPA + ME) ve protein (BSA) varlığında gerçekleşen reaksiyonun (OPA + ME + BSA) SERS spektrumları	43

Şekil 4.3. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine pH etkisi	45
Şekil 4.4. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine reaktif çözeltisine ilave edilen OPA miktarının etkisi	46
Şekil 4.5. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine reaktif çözeltisine ilave edilen ME miktarının etkisi	47
Şekil 4.6. Farklı derişimlerdeki protein varlığında OPA – protein etkileşiminden elde edilen SERS spektrumu ve 727 cm^{-1} de gözlenen C – S gerilmesi.....	48
Şekil 4.7. Farklı protein derişimlerinde OPA- protein etkileşimiyle elde edilen kalibrasyon grafiği	49
Şekil 4.8. Altın kaplı Fe_3O_4 partiküllerinin UV- visible spektrumu	52
Şekil 4.9. Alkin – DTNB modifiye nanoçubukların SERS spektrumu	53
Şekil 4.10. Azid modifiye edilmiş silica yüzeylerin SERS spektrumu ve spectral bant gösterimi	54
Şekil 4.11. Klik kimyası temelli toplam protein tayininde heterojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu	55
Şekil 4.12. Klik kimyası temelli toplam protein tayininde heterojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği	56
Şekil 4.13. Klik kimyası temelli toplam protein tayininde homojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu	57
Şekil 4.14. Klik kimyası temelli toplam protein tayininde homojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği	58

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 4.1. Çubuk nanopartiküllerin TEM görüntüsü	41
Resim 4.2. Altın kaplı Fe ₃ O ₄ partiküllerin TEM görüntüsü	51

SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar; açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
BCA	Bikinkoninik Asit
SERS	Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
OPA	o-fitalaldehit
ME	2-merkapttoetanol
TEOS	Tetraetil Ortosilikat
BSA	Bovin Serum Albumin
CTAB	Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür
TEOS	Tetraetil Ortasilikat
DTNB	5,5-Ditiobis(2-Nitrobenzoik Asit
UV	Ultra Violet

1. GİRİŞ

Toplam protein miktarının belirlenmesi kan, idrar gibi vücut sıvılarında hastalık teşhisi, enzim etkinliği ve gıda kalitesinin belirlenmesi gibi temel bilim ve klinik araştırmalarda önemlidir. Bu amaçla çeşitli tayin yöntemleri geliştirilmiştir. Bugüne kadar geliştirilen yöntemlerin dezavantajları mevcut olduğundan, bütün bu uygulamalarda kullanılabilecek tek bir protein ölçme yöntemi bulunmamaktadır.

Günümüzde toplam protein miktarının belirlenmesinde Biuret [1], Lowry [2], BCA [3], ve Kjeldahl gibi geleneksel yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Toplam protein miktarı deneylerinde hangi yöntemin seçilmesi hususunda numune matrisi ve girişim yapan türlerin etkisinden kaynaklanan problemler vardır. Örneğin, bakır temelli Biuret ve BCA protein tayinlerinde analiz ortamdaki glukoz Cu^{+2} iyonunu Cu^{+1} iyonuna indirgeme yeteneğinden dolayı girişim yapar. Bu konuda en eski tayin yöntemlerinden biri olan Kjeldhal yönteminin temeli toplam azot miktarının belirlenmesine dayanır. Ancak proteinden gelmeyen azotun da tayin edilebilmesinden dolayı, numunede yapılmış herhangi bir tahşiş durumunda, toplam protein miktarı yanlış belirlenecektir. Ek olarak, Kjeldhal yöntemi özel cihaz kurulum gereksinimleri, analiz süresinin uzun olması ve fazla kimyasal atık oluşumuna sebep olduğundan klinik araştırmalarda pratik bir uygulama değildir.

Günümüze kadar kararlılığını korumuş yöntemlerin her birinin teknik ihtiyaç ve uygulama alanına ait hassasiyet konularında olumsuz özellikleri vardır. Raman spektroskopisi biyomoleküllere zarar vermeyen ve yüksek hassasiyette sonuç verebilen bir tekniktir. Bu özellikleriyle gerek spesifik protein tayinlerinde gerekse toplam protein miktarı belirlenmesinde önemli bir potansiyele sahiptir [4, 5]. Bu amaçla diyabetik hastalarında glisemik endeks belirleyen HbA1c proteinin tayinini yüzeyde güçlendirilmiş rezonans Raman spektroskopisi tekniği kullanarak gerçekleştirilmiş olup [6], başka bir çalışmada ise gümüş nanopartiküller ve SERS tekniğini kullanarak label-free protein tayini yapılmıştır [7]. Yine benzer teknikle çoklu protein tayini amacıyla Western Blot ve SERS teknikleri bir araya getirilmiştir [8].

Belirtilen yöntemler incelendiğinde birbirinin tekrarı sayılabilecek nitelikte spesifik bir protein türünün tespitine yönelik çalışmalar olduğu anlaşılmaktadır. Raman spektroskopisi kullanılarak toplam protein miktarının tespiti üzerine farklı denemeler yapılmıştır. Bu amaçla süt tozu bileşenlerinin miktarları Raman spektroskopisi yöntemiyle incelenmiştir [9], daha sonra klasik Bradford [10], yönteminde kullanılan Coomassie Brilliant Blue boyasını farklı derişimlerde protein çözeltileri ile karıştırılmış ve gümüş yüzeylere adsorbe ederek SERS ölçümleri yapılmıştır [11]. Kolorimetrik yöntemlerde tercih edilen boyaların toplam protein tayininde Raman spektroskopisi ile kullanılmasına ait başka bir çalışma ise Zincon kullanılarak yapılmıştır [12]. Bilinen klasik yöntemlerden bicinchoninic acid (BCA) kullanarak alkali ortamda protein varlığında indirgenen bakırın (Cu^+), BCA ile oluşturduğu kompleksi hem rezonans Raman hem de SERRS tekniği kullanılarak çalışılmıştır.

Toplam protein miktarının belirlenmesi amacıyla Raman spektroskopisi kullanılarak geliştirilen bu yöntemlerin, kullanılan reaktiflerin etkilenebileceği matriks girişimlerinden dolayı olumsuz sonuç verme ihtimalleri vardır. Ayrıca belirtildiği üzere geliştirilen yöntemlerin gerçek örneklerde uygulanma potansiyelleri mevcut ama etkin bir şekilde kullanımları yoktur [6-8, 11, 12].

Yürütölen tez çalışması kapsamında, toplam protein miktarı tayini için nanopartiköl tabanlı iki yeni yöntem geliştirilmiştir. Toplam protein miktarı tayininde floresans temelli teknikler de kullanılmaktadır ve o-phtalaldehide (OPA) bu amaçla kullanılan bir moleküldür [13]. OPA molekülünün 2-merkaptöetanol ile elde edilen tamamlanmış çözeltilisindeki indirgenmiş sülfidril grupları proteinlerin primer amin gruplarıyla floresans yapılar meydana getirmektedir. Benzer strateji bu tez çalışmasının ilk bölümünde SERS ölçümlerinde kullanılmıştır. Tamamlanmış OPA reaktif çözeltilisinin proteinlerle oluşturacağı yapıdaki grupların Raman pikleri gözlenebilmektedir. Altın nanoçubukların yapıya dahil edilmesiyle oluşacak farklı konfigürasyon sonucu SERS sinyalleri alınabilmektedir. Tamamlanmış OPA reaktifi sadece amin gruplarına spesifik olarak bağlanmaktadır. Başka bir indirgeyici grup/deterjan tepkimeyi bozucu etki gösterememektedir, ve böylece geliştirilen analiz yönteminin tayin limitinin ve doğruluğunun yeterli olması sağlanmıştır. Toplam protein miktarının OPA reaktifi ile SERS tekniği kullanılarak belirlenmesinde protein standardı olarak bovin serum albumin (BSA) kullanılmıştır.

Artan BSA derişimine paralel OPA molekülünün spektral bant şiddeti değerleri araştırılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci bölümünde ise matriste klik kimya [14] reaksiyonu gerçekleştirip etiket üzerinden yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi SERS kullanılarak, sütte toplam protein miktar tayini hedeflenmiştir. Bu kapsamda iki farklı analiz platformu inşa edilmiştir. İlk platformda heterojen sistem olarak silikon çip yüzeyinin azid sonlu moleküller ile modifiye edilmiştir. Bu yüzeye protein varlığında bağlanacak alkin ve Raman etiket ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin hazırlanmıştır.

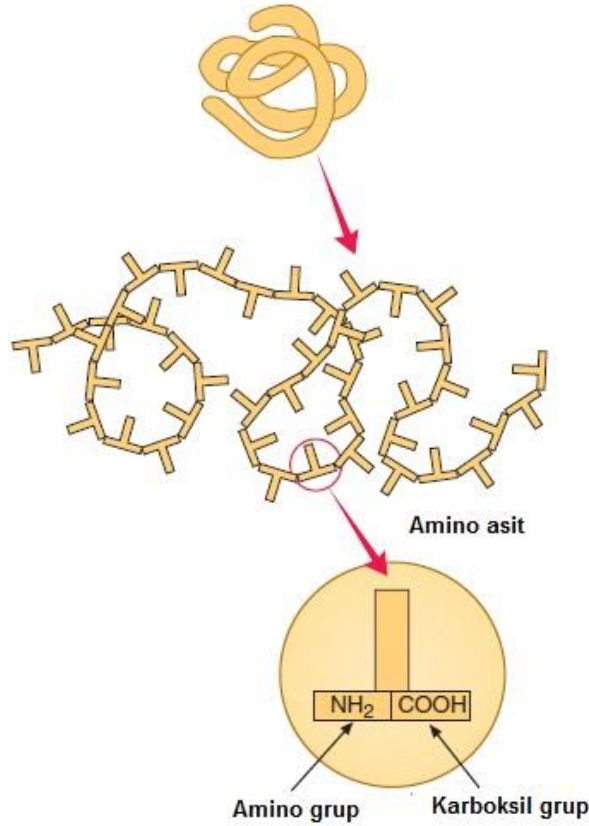
İkinci toplam protein analiz platformu silikon çip yüzeyler yerine azid modifiye manyetik nanopartikülleri, Raman etiket ve alkil modifiye altın nanoçubuk partiküller kullanarak homojen bir analiz platformunun inşa edilmesi hedeflenmiştir. Her iki platformda da Cu(II) iyonları varlığında gerçekleşecek klik kimya reaksiyonlarının Raman etiket üzerinden ölçümlerin alınması amaçlanmıştır.

Geliştirilen yöntemle gerçek örnek süt kullanarak toplam protein miktarı tayin edilerek test edilmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Proteinler

Proteinler, karmaşık yapılı ve yüksek molekül ağırlıklı moleküllerdir. Molekül yapılarında temel olarak karbon, hidrojen, oksijen ve azot bulunmaktadır. Proteinlerin yapıtaşları amino asitlerdir. En az yüz amino asit biriminin belirli bir sıra ile aralarında peptit bağı oluşturmasıyla polipeptid yapıdaki proteinler meydana gelir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1: Bir proteinin amino asit zincir modeli ile amino ve karboksil grupları [15]

Aminoasitlerin asidik karakterli karboksil grubu ($-\text{COOH}$) ile bazik karakterli amino ($-\text{NH}_2$) grubu olmak üzere iki adet işlevsel grubu vardır. Aminoasitler sahip oldukları bu iki farklı grup ile çözelti içerisinde hem asit hem de baz gibi etki yapabilmektedir. Bu etki amfoter özellik olarak tanımlanmaktadır. Bir amino asit molekülünde nötr pH değerinde, H iyonları COOH grubundan NH_2 grubuna geçer, böyle bir durumda negatif yük taşıyan COO^- grubu ile pozitif yük taşıyan NH_3^+ grubu bir arada bulunmaktadır. Bu durumda hem pozitif hem negatif yük içeren

iyonlar zwitteron iyonlar olarak adlandırılır ve bu pH değerine izoelektronik nokta denir. Her amino asit için izoelektronik nokta pH değeri o moleküle özgüdür [16].

2.1.1. Süt Proteinleri

Sütün bileşeni süt veren canlının türüne göre değişmektedir. Günümüzde sıklıkla tüketilen inek sütü genel olarak %87 oranında su ve %13 oranında kuru madde içermektedir. İnek sütünün fiziksel-kimyasal durumu çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2.1: İnek sütünün fiziksel-kimyasal durumu [15]

	Ortalama Bileşeni %	Emülsiyon tipi (yağ/su)	Kolloid solisyon/ süspansiyon	Gerçek çözelti
Su	87.0			
Yağ	4.0	x		
Proteinler	3.5		x	
Laktoz	4.7			x
Kül	0.8			x

Sütün kimyasal yapısı yeni doğan memeliler için yeterli bir besin kaynağıdır, aynı zamanda insan beslenmesinde temel bir gıda kaynağıdır. Özellikle protein kaynağı olarak tüketilen süt proteinin biyolojik değeri 1.0 üzerinden yapılan değerlendirmede 0.9 olup oldukça yüksektir [17, 18]

Kaliteli bir inek sütü % 3.0 – 3.5 arasında protein içermektedir. İnek sütü proteinleri kazein ve serum proteinleri başta olmak üzere enzimler ve yağ globülleri membran proteinlerinden oluşmaktadır. Tablo 2.2’de modern sistemdeki süt proteinlerinin listesi verilmiştir.

Çizelge 2.2: Süt proteini çeşitleri ve derişimleri [15]

	Sütteki Derişim (g/kg)	% Toplam Protein (a/a)
Kazein		
α_{s1} -kazein	10,0	30,6
α_{s2} -kazein	2,6	8,0
β -kazein	10,1	30,8
κ -kazein	3,3	10,1
Toplam Kazein	26,0	79,5
Serum Proteinleri		
α -laktalbumin	1,2	3,7
β -laktoglobulin	3,2	9,8
Kan serum albumini	0,4	1,2
İmmunoglobulinler	0,7	2,1
Diğer	0,8	2,4
Toplam Serum Proteini	6,3	19,3
Yağ Membran Proteinleri	0,4	1,2
Toplam Protein	32,7	100

Temel olarak üç grup protein farklı davranışları ve yapıları ile ön plana çıkmaktadır. Bunlardan kazein toplam süt proteinlerinin yaklaşık %80'ni oluşturan kazein, kazein miselleri ile sütte koloidal bir sistem oluşturur. İyonize grupların ve kazein molekül içindeki hidrofobik ve hidrofilik bölgelerin çokluğundan dolayı kazeinler tarafından oluşturulan polimerik yapılar çok özeldir. Kazein miseli α , β ve κ -kazein misellerinden oluşan alt birimlerden meydana gelmektedir.

Sütte kazein proteinleri uzaklaştırıldığı zaman geriye kalan protein grubu serum proteinleri veya peynir altı suyu proteinleri olarak isimlendirilir. Özellikle α -laktalbumin ve β -laktoglobulin en temel serum proteinleridir.

Esansiyel amino asit içeriği yüksek olan süt proteini, kaliteli protein olarak kabul edilmekte ve besinlerdeki protein kalitesinin değerlendirilmesinde standart referans olarak kullanılmaktadır [19].

2.2. Toplam Protein Tayini Yöntemleri

Doğal kaynaklardaki protein miktarlarını belirlemek için birçok yöntem vardır. Bu yöntemler temel olarak proteinlerin bazı bileşiklerle verdiği reaksiyonlar temel alınarak geliştirilenler, proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değerlendiren metotlar ve proteinlerde bulunan toplam azot miktarının dikkate alındığı yöntemler olmak üzere üç ana başlıkta toplanmaktadır. Yöntemlerin sayıca çokluğuna rağmen, genelde herhangi bir örnekteki protein miktarını en iyi saptayan ve istenen sonucu veren bir yol yoktur. Ayrıca her örnek için farklı yöntem gerektiğinden, toplam protein tayini günümüzde hala üzerinde çalışılan bir konudur. Protein miktarını en iyi şekilde saptayabilmek için proteinin ve örnekteki diğer bileşiklerin yapısına, deneyin hassasiyetine göre yöntem seçilmektedir. Gıda analizlerinde en çok kullanılan yöntem klasik Kjeldahl yöntemidir.

Spektrofotometrik yöntemlerle toplam protein tayini hızlı sonuç verme özelliğinden dolayı klinik analizler, biyokimya ve fizyoloji gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Kromatografik işlemler sırasında elüatlardaki proteinlerin bağıl miktarları doğrudan 280 nm'de absorpsiyon ölçümüne dayanan yöntemle belirlenir [20]. Bu yöntemin hassasiyeti 0.05 – 2.0 mg/mL arasındadır. Çok duyarlı olmamakla birlikte, kolaylığı ve hızlı sonuç vermesi nedeniyle çok kullanılan bir tekniktir. Nicel tayinlerde en çok kullanılan yöntemler, hassasiyeti 1 – 10 mg/mL arasında olan Biüret yöntemi ve hassasiyeti 0.5 – 1.4 mg/mL arasında olan Coomassie-Blue (Bradford) yöntemidir. Bunun yanında Lowry ve Bicinchoninic Acid (BCA-Smith) yöntemleri de kullanılmaktadır. Yine spektrofotometrik olarak floresans spektroskopisi kullanılarak gerçekleştirilen OPA yöntemi ile düşük hassasiyette (0.01 – 0.50 mg/mL) toplam protein miktarı tayini yapılmaktadır.

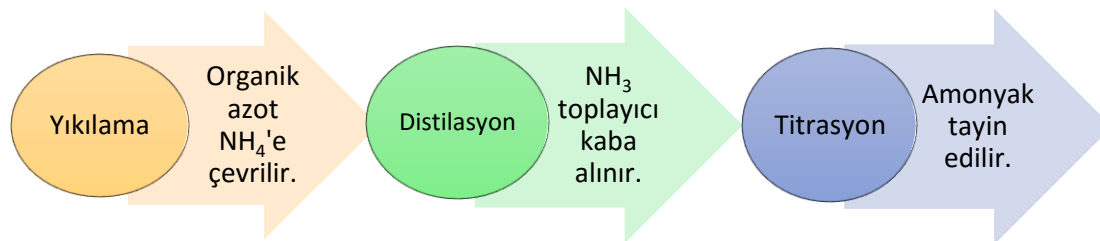
2.2.1. Toplam azot miktarı değerlendirilen yöntemler

Azot miktarını temel alarak toplam protein miktarının belirlendiği iki temel yöntem bulunmaktadır. Bunlar Dumas [21] ve Kjeldhal yöntemleridir. Günümüzde uygulama alanında tercih edilen ise daha çok Kjeldhal yöntemidir.

Kjeldahl yöntemi

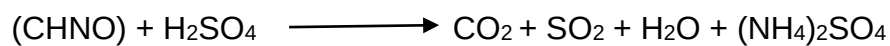
Bu yöntem yüksek kesinlik ve tekrarlanabilir özelliklerinden dolayı hala bilinen en doğru ve yaygın azot tayini yöntemidir. Yöntemin kesinliği fazla ve tekrarlanabilirliği yüksektir. Fakat protein tayinini içerdiği azot miktarına göre yapar ve herhangi bir tahşiş sonucunda protein miktarının yanlış belirlenmesine sebep olur. Analiz sonucunda azot miktarından proteine geçmek için kullanılan Kjeldahl faktörü aminoasit dizilimleri farkından dolayı her protein türü için farklıdır. Kjeldahl yöntemi uzun zaman almaktadır ve atık konusunda çevreci bir yöntem değildir [22].

Kjeldahl yöntemi yıkılama, distilasyon, titrasyon olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.2).

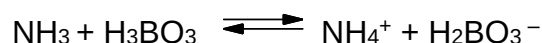


Şekil 2.2: Kjeldhal yönteminin reaksiyonları [23].

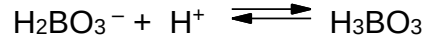
1. Yıkılama basamağında organik olarak bağlı olan azot amonyum sülfata dönüştürülür. Protein içeren örneğin sülfirik asit ile kaynatılması sonucu amonyum sülfat oluşur. Kaynatma işlemi süresince katalizörler de kullanılmaktadır. Sürekli kaynatma sonucu CO₂, SO₂ ve H₂O buharlaşır.



2. Damıtma işlemi için asidik örnek konsantre sodyum hidroksit çözeltisi ile nötralize edilir. Bu basamakta amonyum sülfat ayrıştırılarak öncelikle NH₄OH ve daha sonra NH₃ dönüştürülerek bir zayıf asit ile tutulur.



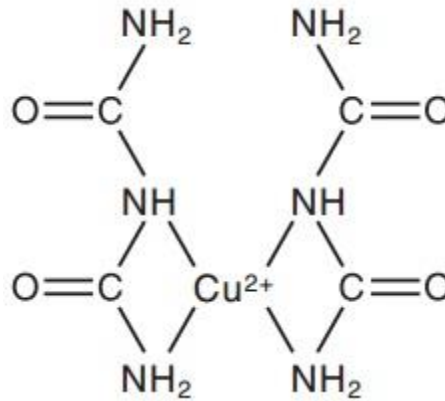
3. Borik asit içinde yakalanan amonyum iyonları konsantrasyonu, genel olarak sülfürik ya da hidroklorik asit standart çözeltileri kullanılarak bir asit-baz titrasyonu ile tespit edilir. Titrasyon sonucunda ise toplam azot miktarı tayin edilir.



2.2.2. Spektrofotometrik yöntemler

Biuret Yöntemi

Süt ve yumurta albumini için kantitatif biuret testi ilk olarak Molnar tarafından bildirilmiştir [24]. Bu yöntemde proteinler trikloroasetik asit ile çöktürülmüş ve santrifüj edildikten sonra alkali çözelti içerisine alınmıştır. Bu karışım üzerine CuSO_4 ilave edildiğinde renk değişimi olmuştur. Günümüzde kullanılan biuret testinin temeli de Cu^{+2} iyonlarının bazik çözeltide peptid azotlarına bağlanması sonucu 540 – 560 nm'de maksimum absorpsiyon gösteren renkli bir şelat kompleks oluşumuna dayanmaktadır (Şekil 2.3). Protein ve peptitlerde iki peptid bağı oluşumuna katılan 4 azot atomu ile biuret çözeltisindeki Cu^{2+} 'nin renkli kompleks oluşturması esastır [25]

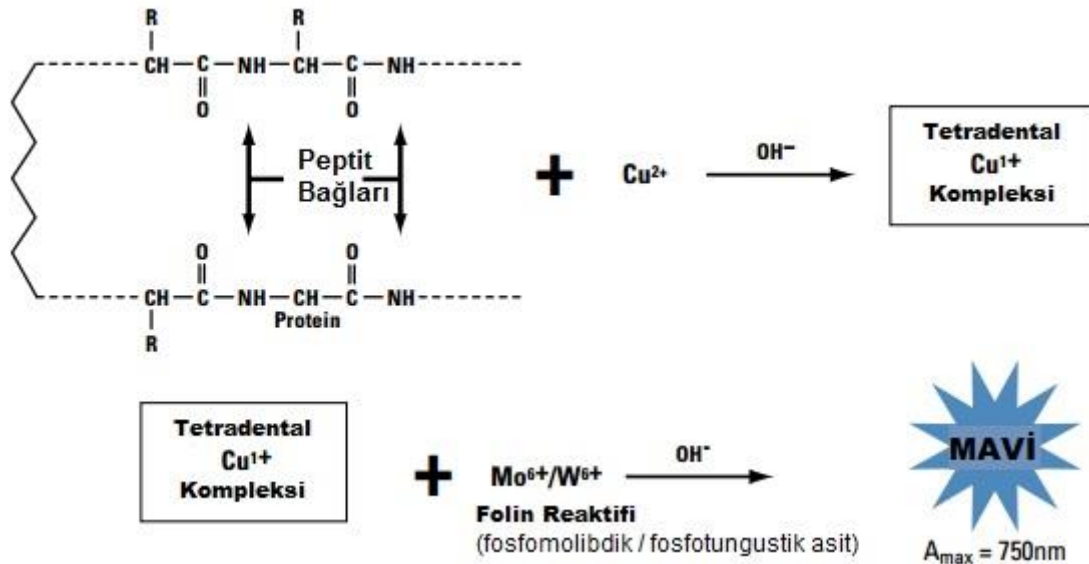


Şekil 2.3. Bir protein – Cu^{+2} kompleksinin oluşumunun 540 nm 'de absorpsiyon veren menekşe renkli şelat kompleksi [26].

Duyarlılığı 1 – 10 mg/mL arasında olan bu yöntem numune içeriğindeki amino asit dağılımından etkilenmez. Tris tamponu ve amonyak girişimi söz konusu olan yöntem pratik bir şekilde uygulanabilmektedir.

Lowry yöntemi

Bu yöntem Folin-Ciocalteu (fosfomolibdik/fosfotungstik asit çözeltisi) reaktifinin alkali koşullarda proteinlerin fenolik amino asitleriyle verdiği reaksiyona dayanmaktadır [2]. İlk olarak peptit bağları ile Cu^{2+} arasında biüret reaksiyonu sonucu indirgenmiş bakır elde edilir. Daha sonra Folin-Ciocalteu reaktifi tirozin ve triptofan amino asitleriyle reaksiyona girerek indirgenmektedir. Bu reaksiyon sonucu 600 – 800 nm (maksimum 750 nm) arasında absorbans veren mavi renkli heteropolimolibden kompleksi oluşmaktadır (Şekil 2.4).

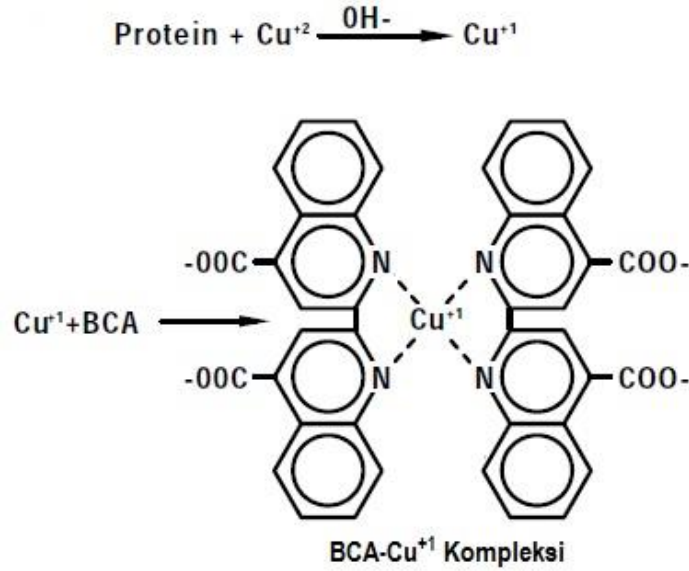


Şekil 2.4. Tetradental- Cu^{+1} yapısının folin çözeltisiyle gerçekleştirdiği reaksiyon [27].

Yöntem biüret yöntemine göre 100 kat hassastır ve 0.50 – 1.50 mg/mL duyarlılığa sahiptir. Yüksek duyarlılık seviyesine rağmen proteinin amino asit bileşenin yöneme etkisi orta düzeydedir. Tampon tuzları, serbest tiyol grupları ve iyonik olmayan deterjanlar bu yöntemle girişim yapmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan renk proteinlere göre farklılık göstermektedir. Aynı zamanda yöntemin gerçekleştiği reaksiyon ortam pH'a oldukça bağlıdır ve bu durum analiz sırasında problem yaratmaktadır. Gıda proteinlerinde sıklıkla kullanılan bu yöntemin diğer araştırma sahalarında kullanımı kısıtlıdır.

Bikinkoninik (BCA) Asit Yöntemi

Lowry yöntemi gibi bakır ile şelat oluşumuna dayalı bir yöntemdir ve reaktif olarak BCA kullanılır. İlk basamak reaksiyonda proteinler Biüret reaktifi ile Cu^{+2} den Cu^{+1} indirgenir ve ikinci basamakta Cu^{+1} in BCA ile oluşturduğu kompleksin (Şekil 2.5) absorbansı 562 nm’de ölçülmektedir [3].



Şekil 2.5. Protein varlığında indirgenen Cu^{+2} nin BCA ile 562 nm’de absorbans veren kompleksi [27].

Duyarlılık olarak Lowry yöntemine yakındır. Lowry yönteminden üstün olan tarafları tamponlar, deterjanlar, aminoasit kompozisyonunun girişimlerinin olmamasıdır. Buna karşın BCA yönteminde indirgen şekerler ve EDTA gibi maddeler girişime yol açmaktadır.

Bradford yöntemi

Bradford yöntemi proteinlerin boyalarla verdiği reaksiyona dayanan yöntemlerden en çok tercih edilenidir. Bu teknikte yapısında (-) yükler içeren bir boya Coomassie Brilliant Blue G-250 (BG-250) proteinlerin (+) yüklerine bağlanmaktadır. Küçük peptitler veya aminoasitler reaksiyona girmemektedir. Normalde kırmızı renk olan BG-250 reaksiyon sonucu oluşan mavi renge dönüşerek 595 nm dalga boyunda absorbans vermektedir [10]. Yöntem duyarlılığı 0.05 – 1.4 mg/mL arasındadır.

Bilinen klasik yöntemler içerisinde en kısa reaksiyon süresine sahip olan yöntem Bradford yöntemidir.

UV 280 nm absorpsiyon yöntemi

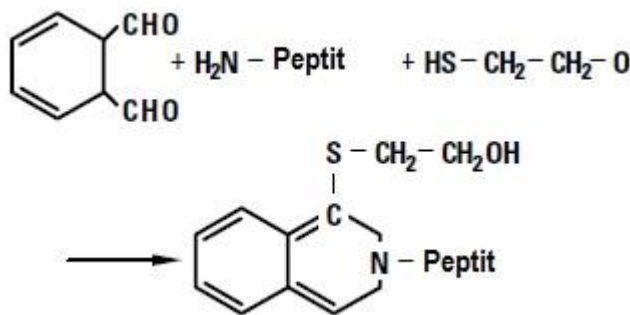
UV-280 yöntemi proteinlerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine göre protein miktarı yapılan yöntemlerden bir tanesidir. Proteinlerin yapısında bulunan tirozin ve triptofan amino asitleri nedeniyle 280 nm’de maksimum absorbands gösterir. Duyarlılığı 0.05 – 2.0 mg/mL aralığındadır, buna karşın 280 nm’de absorbands yapabilecek bir organik bileşiklerin varlığında hassasiyet düşmektedir [4].

UV 220 absorbands yöntemi

Bu yöntemde 220 nm dalgaboyundaki absorbands peptit bağlarının elektronik geçişlerinden dolayı gerçekleşir.

o-fitalaldehit (OPA) yöntemi

OPA floresans spektroskopisi tekniği kullanılarak yapılan ilk toplam protein miktarı belirleme metodudur. OPA floresans yönteminde başka bir indirgeyici grup/deterjan tepkimeyi bozucu etki gösterememektedir ve OPA molekülü sadece primer aminlerle reaksiyona girmektedir. 2 – merkaptoetanol varlığında OPA floresans bir yapı meydana getirmektedir (şekil 2.6)

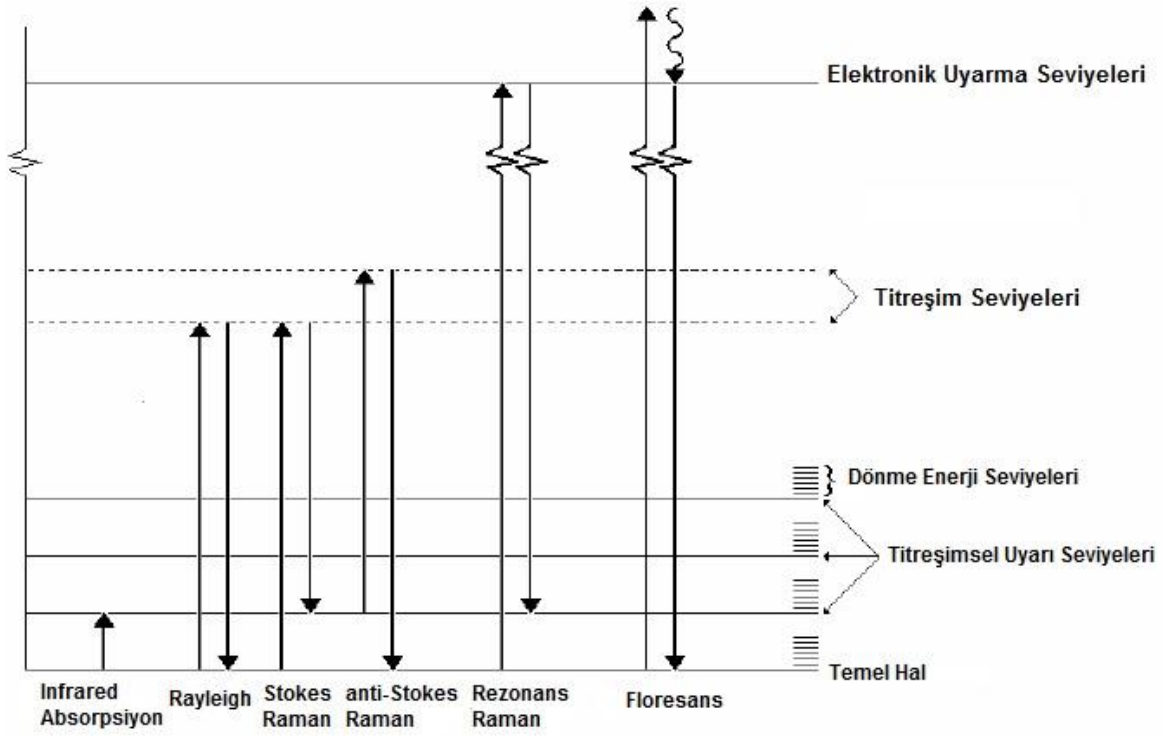


Şekil 2.6. Toplam protein tayini için 2 – merkaptoetanol varlığında o-fitalaldehit reaksiyonu [27].

Oluşan bu yapı floresans spektrofotometre yardımıyla 340 nm dalga boyunda uyarıldığında 455 nm dalga boyunda emisyon vermektedir. Standart bir OPA yönteminde 10 – 500 µg/mL protein derişiminde çalışmak mümkündür. Yalnızca Tris ya da glisin tamponları gibi primer aminleri içeren çözeltiler ve tirozin kalıntıları OPA protein tayin yönteminde girişim yapmaktadır. Toplam protein tayini çalışmalarında girişim yapan bu türler çok nadir bulunduğu için OPA yöntemi hassasiyet ve duyarlılık özellikleri ile ön plana çıkmaktadır [27].

2.3. Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, molekül üzerine gönderilen şiddetli bir ışık demetinin molekülle etkileşmesi sonucu meydana gelen saçılmanın dedektör ile takibine dayanan bir tekniktir. Işık saçılması esnasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur, Rayleigh saçılması adını alan bu olay bir elastik saçılma olayıdır. Elastik saçılma olayından başka saçılan ışığın çok az bir miktarı Raman saçılması adını alan elastik olmayan saçılma olayını gerçekleştirir. Raman saçılması spektroskopik olarak incelenebilmektedir (şekil 2.7). Saçılan ışığın enerjisinde molekül ile etkileşen ışığınkine göre oluşan fazlalık veya azlık ışıkla etkileşmiş molekülün titreşim düzeyleri arasında bilgi vermektedir. Moleküllerin titreşim düzeyleri arasındaki enerji farkından yola çıkarak molekül hakkında inceleme yapmaya izin veren bu spektroskopik yöntem Raman spektroskopisi olarak adlandırılır [28].



Şekil 2.7. Bir molekülün enerji diyagramı ve saçılma türleri [29].

Bir molekülün Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi yani geçici bir dipol momentinin olması gerekmektedir. Asimetrik gerilme titreşimi sırasında molekülün dipol momentinde titreşim ile aynı fazda bir değişme olmaktadır. Titreşim sırasında oluşan polarlanabilme değişim frekansı, titreşim frekansı ile uyuşmamaktadır. Bu titreşim türü ise Raman aktif değildir [28]. Raman spektroskopisi yöntemi ile moleküllerdeki titreşimlerin incelenmesi ile elde edilen karakteristik spektral modellerden (parmak izi) maddenin tanımı yapılabildiği gibi nicel tayine de gidilebilmektedir.

Raman spektroskopisi yöntemi ile katı, sıvı ve gaz örnekler incelenebilmektedir. Katı ve sıvı örnekler bir kapiler cam veya kuvarz tüpte tutularak spektrumları elde edilmektedir [30]. Bir molekülün kimyasal yapısının veya nitel analizinin güvenilir sonuçlar vermesini sağlamak amacıyla Raman spektrumları infrared spektrumları ile birlikte değerlendirilmektedir, böylece incelenen moleküle ait hemen hemen bütün titreşimlerin görülmesini mümkün kılmaktadır. Moleküllerin yapısında bulunan $-C=C-$, $-C\equiv C-$, $-N=N-$, $-S-S-$, $-C-O-C-$ türü titreşimler ile halkalı bileşiklerde gözlenen

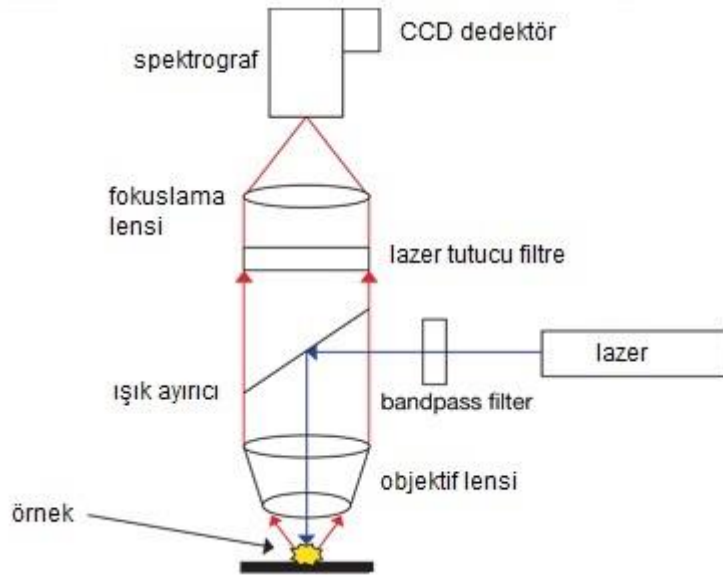
halka daralması-halka genişlemesi titreşimi nedeni ile şiddetli Raman hatları oluşmaktadır. Infrared spektrumunda şiddeti az olan bu bandlar Raman yöntemi ile sorunsuzca ölçülebilmektedir. Biyolojik çalışmalarda IR yöntemi su varlığında kuvvetli absorplama özelliği göstermektedir. Bu olumsuz IR özelliğinin aksine Raman spektroskopisi ile sulu ortamda bulunan numune analizi daha kolay gerçekleştirilmektedir [31]. Böylelikle biyolojik moleküller ile in situ çalışmalarda (kendi doğal ortamında çalışma) Raman yöntemi bir avantaj olarak ön plana çıkarken, kuvvetli bir lazer tarafından uyarılan örnek dokusunun zarar görmesi de bu yöntemin bir dezavantajıdır [32].

Normal Raman spektroskopisi (NRS) sulu ortamda çalışmaya olanak sağlamasına rağmen, düşük şiddet ve hassasiyetle çalışıyor olmasından dolayı, zamanla yerini Rezonans Raman Spektroskopisine (RRS) bırakmıştır. RRS, floresans girişiminin daha az olduğu spektrumların eldesinde ve daha net sinyaller vermesi hususlarında ön plana çıkmaktadır [33]. Rezonans Raman saçılımı, bir analitin elektronik absorpsiyon pikine oldukça yaklaşan dalga boyları ile uyarılması sonucu Raman şiddetlerinin büyük ölçüde güçlenmesidir. Bu koşul altında çoğu Raman bandlarının şiddetleri 10^2 ile 10^6 kat kadar kuvvetlenmektedir. Bu sebepten dolayı RRS 10^{-8} M'a kadar düşürülebilen oldukça küçük analit derişimlerinde kullanılmaktadır [34].

Bir diğer Raman yöntemi olan SERS hassasiyet, miktar ve spektral veri üzerinde seçicilik ile sıklık problemlerine çözüm sağlamaktadır. SERS-aktif substratları floresansı sönmlemektedir, sinyal kuvvetlenmesi sağlayarak spektrumlarda oluşan sıklığı gidermektedir. Böylece daha hassas ölçümler yapılabilmektedir [35].

2.3.1. Raman spektrofotometre bileşenleri

Raman spektroskopisi üç ana bileşenden oluşmaktadır. Bunlar; lazer kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve uygun bir spektrometredir (şekil 2.8) Işık kaynağı olarak lazer kullanılmaktadır. Lazer, zorlanmış emisyon ile ışık çoğaltılması anlamına gelen "Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation" sözcüklerinin baş harflerinden türetilmiş bir kısaltmadır. Dedektör olarak, foto çoğaltıcı tüp veya CCD (yük-eşleşmiş dedektör) kullanılmaktadır.



Şekil 2.8. Mikroskop sistemli bir Raman spektrofotometrenin şematik gösterimi [36].

2.3.2. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

Raman spektrumundan kompleks bir sistemdeki kimyasal bileşenlere ait karakteristik bilgi “parmak izi” elde edilebilmektedir [37]. Sisteme gönderilen yaklaşık bir milyon fotondan sadece bir tanesi Raman saçılmasına uğramaktadır ve bu durum düşük derişimlerdeki molekül tayini için yeterli değildir [37]. Bu sorunu çözebilmek için SERS kullanımı gibi birçok girişimde bulunulmuştur [38]. SERS düşük derişimlerdeki maddelerin tayinine imkan sağladığı için düz Raman’a göre çok daha hassas bir tekniktir.

Temel olarak SERS, Raman sinyallerinin SERS substratları ile güçlendirilmiş şeklindedir ve analizi yapılacak maddenin genellikle nano düzeydeki altın veya gümüş, bakır yüzeylerde ya da kolloidlerde metal yüzeylere tutunduğu veya etkileşime girdiği bir Raman spektroskopisi türüdür. Uygun koşullarda SERS yönteminin, normal Raman spektroskopisine göre 10^{14} defa spektral zenginleştirme verdiği bildirilmektedir SERS substratları için kullanılan yüzeyler, altın, gümüş gibi iletken metallerin nano boyuttaki parçacıklarından oluşmaktadır. Temel düzeydeki elektron dizilişi $d10s^1$ ile biten altın (Au), gümüş (Ag) veya bakır (Cu) gibi soy metaller son

yörüngedeki serbest elektron davranışları nedeniyle SERS çalışmalarında kullanılmaktadırlar [38, 39].

Yüzeyde güçlendirme daha çok elektromanyetik alanın “hot spot” adı verilen ve nano yapıdaki dimer veya agregat yapıda olan metallerin üzerindeki değme noktalarından kaynaklanmaktadır. Geniş ölçekli bir güçlendirme için yüzey pürüzlendirilmesi yapılmaktadır ve bu işlem SERS’in çıkış noktası olup yüzeyin belli kavisli bölgelere sahip olması gerektiği anlamına gelmektedir. Güçlendirmeyi açıklamak için birçok mekanizma önerilmiştir fakat elektromanyetik model ve kimyasal model dışında kalan mekanizmalar yanlış sonuçlar verdikleri için kabul görmemiştir. Raman Saçılması “ $\mu=E \cdot \alpha$ ” arasındaki bağıntı ile ilişkili olmasına rağmen, SERS hem elektrik alanı şiddetinin hem de moleküler polarlanabilirliğin ikisinin de artması ile ilişkilendirilmektedir. Bir molekülün Raman türü saçılma etkileşmesine girebilmesi için molekülün titreşimi sırasında etkileştiği fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarlanabilmesi (α) yani geçici bir dipol momentinin (μ) olması gerekmektedir. Elektromanyetik model (EM) kuramı gerçekte elektrik alanı şiddetinin (E) güçlendirilmesini ele alırken, Yük aktarım modeli (CT) moleküler polarlanabilirlik güçlendirilmesi ile ilgilidir. Bu iki kuramın ortak özelliği ikisinde de spektral güçlendirmenin oluşabilmesi için yüzey pürüzlendirme işleminin yapılması gerektiğidir [40].

Elektromanyetik model, elektriksel alanın şiddeti ile alakalıdır. Yüzey yapısına bağlı güçlendirmeyi hedeflemekte ve tutunan molekülün yüzey plazmonu ile arasındaki ilişkiyi ele almaktadır. Bir destek yüzeydeki iletken üzerindeki serbest elektronların doğal titreşim hareketiyle yüzey plazmonları oluşmaktadır. Bu olay ışığın elektron gaz bulutunu uyarmasıyla yani nano metal yapısındaki iletkenliği sağlayan elektronların salınım frekansı ile ışığın görünür bölgedeki dalga boylarından birinin rezanons oluşturmasıyla elde edilmektedir. Oluşan yüzey plazmonları elektromanyetik dalgalarıdır ve bu dalgalar yüzeye paralel olarak uzanmaktadırlar. Yüzey plazmonları, ara yüzeyde var olan ve bu ara yüzeyin her tarafında üssel olarak azalan elektromanyetik alanları titreştirmektedir. Bu alanların genişliği uygun dalga boyundaki ışımaya ile titreşimsel olarak artırılabilir. Bu sırada plazmonun momentumu ve frekansı korunmalıdır. Nano yapı yüzeyinde oluşan elektromanyetik alan, metal yüzeyinde veya çok yakınında bulunan molekülün Raman saçılmasında

güçlenmeye neden olmaktadır. Lazer, metal yüzeyindeki iletkenlik elektronlarının (yüzey plazmonları) salınımına neden olmaktadır. Böylece ikincil alan partiküllerin üzerinde oluşturulur ve elektromanyetik güçlendirme sağlanmaktadır [40].

Güçlendirme faktörleri hesaplanırken EM model yanısıra ikinci bir mekanizma olarak CT modeli de kullanılmaktadır. Bu modelin temeli metal yüzeye tutunan molekül ile yüzey arasında yük-transfer bandının olması ve bu şekilde molekülün polarlanabilmesi prensibine dayanmaktadır. Fotonlar, metal yüzeyden elektronları adsorblanan molekülün içine doğru harekete geçirirler ve negatif yüklü uyarılmış molekülü oluştururlar. Bu uyarılmış molekülün geometrisi, nötral olan molekülün geometrisinden farklıdır. Bu yük transferi, molekülün içindeki çekirdek dinlenmesini indüklemekte ve bunun sonucu elektron metal yüzeye geri dönmek isteyerek, molekül tekrar nötr hale geçmektedir [35].

DNA, protein ve diğer biyolojik moleküllerin tayininde doğrudan (işaretsiz) ve dolaylı (işaretli) iki yöntem kullanılmaktadır [41]. Doğrudan metot hedef molekülün titreşimine dayalı iken, dolaylı metot ise hedef molekülüne SERS etiketi (işareti) bağlanarak SERS sinyallerinin takip edilmesine dayanmaktadır. Doğrudan metotta elde edilen titreşim bilgileri standard spektrumlar ile karşılaştırılarak hedef molekül tanımlanması gerçekleştirilmektedir [42]. Dolaylı metotta, hedef molekül SERS işareti ile tayin edilmektedir [43]. Dolaylı metot, genellikle düşük tayin limitlerine ulaşılmasını sağlamaktadır. Genel olarak, herhangi bir analitin tespitinde biyomoleküllerin kendilerinin düşük SERS spektrumları doğrudan metotla yüksek duyarlılıklı ölçümler yapmayı zorlaştırmaktadır. Doğrudan metot Raman işareti kullanmadan tespit sağladığı için avantajlı olsa da, gerçek ve kompleks örnek matrislerinde analiz zorlaşmaktadır. Raman işaretli dolaylı yöntem doğrudan yöntem ile karşılaştırıldığında daha uygun ve güvenilir bir metottur [44].

2.3.3. SERS substratları

Raman saçılmasında zenginleşmenin sağlanabilmesi için; SERS aktif metal elektrotlar, metal nanopartikül kolloidler ve metalik nano yapılara dayalı geliştirilen SERS destek yüzeyleri kullanılmaktadır. Metal kolloidler veya farklı büyüklüklerde nanopartiküller kimyasal olarak solüsyon içinde oluşturularak SERS ölçümlerinde

kullanılmaktadır. Metal kolloidler arasında en çok tercih edilenler gümüş, altın ve bakır kolloidlerdir. Aynı zamanda yüzeye bağlı SERS sinyali almak için destek yüzey olarak da metal nanopartiküller farklı katı ortamlarda hareketsiz konuma getirilerek de kullanılmaktadır [45].

2.4. Metal Nanopartiküller

Nanopartikül, boyutu 1-100 nm arasındaki olan partikülere denilmektedir. Nanopartiküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri, partikülün boyutlarının değiştirilmesiyle ile değişim göstermektedir. Nanopartiküller genelde metaller, metal oksitler, silikatlar, organik ve karbon materyaller ile biyomoleküllerden elde edilmektedir. Morfolojik olarak ise nanopartiküller genel olarak küre, silindir, tüp şeklindedir. Nanopartiküller genellikle, yüzey modifikasyonlarının kolaylıkla gerçekleştirilebilmesi için uygun şekilde tasarlanmaktadır. Nanopartiküller kimyasal yapılarındaki çeşitlilik, şekil ve morfolojileri, bulundukları ortama uygunlukları ve ortamda dağılıma şekilleri nedeniyle çeşitli uygulama alanlarında aktif olarak kullanılmaktadır [46].

Nanopartiküller boyutları ve boyutlarına özgül özellikler (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) taşımaları nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre edilebilmektedir. Altın, gümüş gibi soy metallerin iletkenlik elektronların osilasyon hareketleri yüzeyde büyük bir elektrik alan oluşturmaktadır. Bu alan sonucu altın ve gümüş metallerinden üretilen nanopartikül elektromanyetik radyasyonla rezonansa girdiğinde ışığı absorblama ve saçma özelliği artmaktadır. Bu sayede nanopartikülün absorpsiyon özelliğinin en kuvvetli absorplama özelliği olan moleküllerden onlarca kat daha fazla olduğu ve ışık saçılma özelliğinin ise en yaygın saçılma veren organik boyalardan çok daha fazla olduğu belirtilmiştir. Nanopartiküller güçlendirilmiş absorpsiyon ve saçılma özelliklerinden dolayı optik tayin için sensör ve görüntüleme konstat ajanı olarak kullanılabilirler [47].

2.4.1. Altın nanopartiküller

Altın nanopartiküller ile yapılan çalışmalarda biyolojik sistemler üzerine nanopartiküllerin boyut ve şekillerinin etkisi ile nanopartiküllerin dizaynı ve toksik etkilerinin incelenmesini içeren çalışmalar önem kazanmıştır. Altın nanopartiküllerin sentezi tipik olarak altın klorürün sodyum bor hidrür ve sodyum sitratın kullanılması sonucu kimyasal indirgenme yolu ile gerçekleştirilmektedir. Sodyum bor hidrür ile indirgeme sonucunda 2-10 nm boyutunda küresel nanopartikül elde edilebilmekte iken, sodyum sitrat ile indirgeme sonucunda 12-100 nm boyutları arasında küresel nanopartiküller elde edilmektedir [48]. Küresel nanopartikül dışında, çubuk şekilli nanopartikülü kimyasal yöntemle sentezlemek için öncelikle çekirdek çözeltisi hazırlanmakta (<15 nm), daha sonra hazırlanan bu çekirdek çözeltisi vasıtası ile küresel nanopartiküller büyütülerek çubuk şekilli nanopartiküller elde edilmektedir.

Nanoçubukların sentezinde kimyasal, elektrokimyasal ve fotokimyasal yöntemlerle sulu çözelti ortamında düzenli boy-en oranında (uzunlamasına 20-100 nm; enlemesine 10-20 nm) ve yüksek verimli ($>90\%$) partiküller sentezlenmektedir [49]. Nanoçubukların kimyasal sentezinde küçük altın çekirdekler (2-3 nm) üzerine katyonik surfaktanın (CTAB), gümüş iyonu ve askorbik asitin ilavesiyle bağlamaktadır [50]. CTAB molekülleri ve gümüş atomları, nanoçubuğun köşelerini oluşturan ve yüzeyleri yerine altın nanoçubukların kenarlarını oluşturan yüzeylerine adsorbe olmaktadır [49]. Adsorbsiyon ile altın atomlarının biriktirilmesi sonucu nanoçubuklar oluşmaktadır.

Altın nanoçubuklar üzerindeki CTAB molekülleri koruyucu özellik göstermekte ve partiküller üzerinde iki katmanlı bir yapı oluşturarak sulu faz içerisinde nanoçubukların agrege olmadan dağılmasını sağlamak için stabilizatör görevi üstlenmektedir. Askorbik asit ise sentez sırasında indirgeyici ajan olarak kullanılmakta ve indirgeme sürecinin yavaş gerçekleşmesi ile büyümeyi sağlamaktadır. Partiküllerin oluşmasında süre değişkenlik göstermektedir.

Elektrokimyasal sentezde aseton ve siklohekzan CTAB molekülleri ile oluşan iki katmanlı yapıyı partikül yüzeyi üzerinden uzaklaştırırken, CTAB molekülü ve gümüş iyonları altın nanoçubuğun büyümesi için önemli rol oynamaktadır [49].

Fotokimyasal sentez ise CTAB, gümüş iyonları ve altın iyonlarının bulunduğu çözelti içinde gerçekleşmektedir. Altın iyonlar 254 nm'de ultraviyole ışık ile indirgenmektedir. Bu yöntemde, partiküllerin hazırlanması yaklaşık 30 saati almaktadır. Uzun süreli (>40 saat) ışınlama çalışmalarında nanoçubukların bozunarak küre yapılara dönüştüğü görülmüştür. Fakat kuvvetli bir ışınlama ile süre kısaltılırsa bu bozunma bir miktar azaltılabilmektedir [49].

2.4.2. Nanopartiküllerin karakterizasyonu

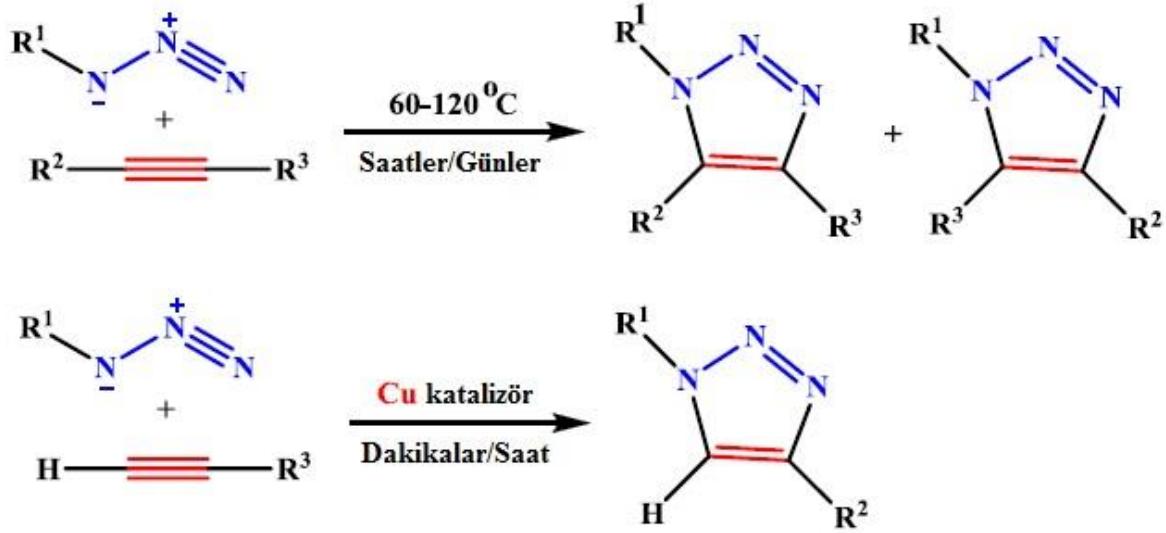
Nanopartikül karakterizasyonu, nanopartiküllerin sentezini ve uygulamalarının kontrolünü ve doğruluğunu kanıtlamak için gereklidir. Karakterizasyon farklı teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Geçişli elektron mikroskobu (TEM), taramalı elektron mikroskobu (SEM), atomik kuvvet mikroskobu (AFM), dinamik ışık saçıcısı (DLS), x-ışını fotoemisyon spektroskopisi (XPS), x-ışını difraksiyon spektroskopisi (XRD), Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR), ultraviyole spektroskopisi (UV) kullanılan tekniklerdir [51].

2.5. Klik Kimyası

Klik kimyası, Sharpless tarafından tanıtilen küçük birimlerin hızlı ve güvenilir bir şekilde yeni maddeler üretmesini sağlayan özel bir tür kimyadır [52]. Günümüzde halka açılma reaksiyonları, karbon-karbon çoklu bağlarına tiyol grubu eklenmesi, halka oluşum reaksiyonları ve non-aldol karbonil kimyası gibi birçok seçici reaksiyon bulunmaktadır. Bu reaksiyonlar içinde özellikle bakır(I) katalizörlü azid-alkin (CuAAC) reaksiyonu, Diels-Alder halka oluşum reaksiyonu ve thiol-ene reaksiyonları birçok kimyacı tarafından ilgi görmüştür. Halka oluşum reaksiyonu olan 1,3-dipolar reaksiyonları belirtilen bu yöntemlerin genel konseptini oluşturmaktadır [53].

Sharpless tarafından geliştirilen azid-alkin klik reaksiyonları C-C üçlü bağ, C-N üçlü bağ ve alkil-aril-sülfonid azidleri arasında tanımlanmış reaksiyonlardır. Reaksiyon sonucu oluşan bileşikler ise tetrazoller, 1,2,3-triazoller ya da 1,2-okzazollerdir (şekil 2.9). Genel olarak bilinen klik kimyası alkin ve azidlerin 1,4-disüstitüe-1,2,3-triazoller oluşturmak üzere 1,3-dipolar halka ekleme (cycloaddition) reaksiyonudur

[53]. Cu(I) türleri başta olmak üzere Ru, Ni, Pt, Pd gibi birçok metal türü Huisgen reaksiyonlarını hızlandırmaktadır. Cu(I) katalizörlü organik azid ve alkinlerin Huisgen 1,3-dipolar halka oluşum reaksiyonu [54], Cu(I) varlığında daha hızlı, bölge seçici ve daha kantitatif bir reaksiyon haline dönüştürmüştür [55].



Şekil 2.9. Termal ve bakır (Cu) katalizörlü halka oluşum reaksiyonlarının gösterimi [53, 56]

Katalizlenmemiş termal azid ve alkin halka oluşum reaksiyonları genellikle sürekli ısıtma gerektirir. Ürün olarak 1,4- ve 1,5-disüstitüe regioizomerlerinin karışımı oluşmaktadır. Buna karşın CuAAC reaksiyonlarında oda sıcaklığında sadece 1,4-disüstitüe-1,2,3 triazoller yüksek verimlilikle elde edilmektedir [53]. Elde edilen bu yapılar yüksek kimyasal kararlılık, güçlü dipol moment ve aromatik karakter ile iyi bir hidrojen bağı kabul etme yeteneğine sahiptir [57].

Klik kimyası nanomateryal geliştirme, ilaç geliştirme ve analitik yöntem geliştirme gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Polimerik yüzey modifikasyonlarında 1,3-dipolar halka ekleme reaksiyonun yanısıra Diels-Alder tipi reaksiyonlar da tercih edilmektedir. Azid ve alkin fonksiyonel grupları biyolojik moleküllerle ve sulu çevrelerde oldukça inert bir özellik göstermektedir. Azid-alkin temelli reaksiyonlar bu özellikleri sayesinde hedef güdümlü sentez [58], aktivite temelli protein profillemeye [59] ve toplam protein tayini [60] gibi çalışmalarda kullanılmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Nanopartikül tabanlı toplam protein tayini yöntemi geliştirilmesi kapsamında iki farklı yöntem geliştirilmiştir. İlk yöntem nanopartikül varlığında OPA molekülünün protein ile etkileşiminin SERS sinyalinin takibinin yapılmasıdır. İkinci çalışmada ise klik kimyası temelli SERS ölçümü toplam protein tayininin gerçekleştirilmesinde kullanılmıştır.

3.1. OPA-protein Etkileşiminin Nanopartikül Varlığında İncelenmesi

3.1.1. Kullanılan kimyasallar maddeler

Çalışmada kimyasal madde olarak hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB), hidrojen tetrakloro Au(III) (HAuCl_4) (30% seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde 99.99), L-askorbik asit, 2-merkaptoetanol, o-phytalaldehide (OPA) ($\text{C}_8\text{H}_6\text{O}_2$) (toz, $\geq 97\%$, HPLC), bovin serum albumin (BSA), disodyum hidrojen fostat (Na_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), potasyum klorür (KCl), 1-9-nonaneditiyol ($\text{HS}(\text{CH}_2)_9\text{SH}$) Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, A.B.D.) sodyum klorür (NaCl) Emir Kimyasalları (Türkiye) sodyum borohidrid (NaBH_4), gümüş nitrat (AgNO_3), etanol (%99.9) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlandı.

3.1.2. Kullanılan cihaz ve gereçler

Deneyler sırasında, SERS analiz cihazı (DELTA NU REPORTER PORTABLE RAMAN SPECTROSCOPY), UV spektroskopisi cihazı (SPECTRONIC GENESYS), santrifüj cihazı (JOUAN MR 1822), deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185), SEM analiz cihazı (JSM-6400), ultrasonik banyo cihazı (BANDELIN SONOREX), hassas terazi (SHIMADZU), Mikropipet (1-10,10-100,100-1000 μl), pH metre (SX-610 PEN TYPE) kullanıldı.

3.1.3. Kullanılan çözeltiler

Hidrojen tetrakloro Altın(III) (HAuCl_4) çözeltisi:

Stok sıvı HAuCl_4 'den 35 μl , 10 ml'lik balonjojeye aktarıldı ve hacmine deiyonize su ile tamamlanarak 0.01M HAuCl_4 çözeltisi hazırlandı.

Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB) çözeltisi

Belli bir miktar katı CTAB'dan tartılarak deiyonize suda çözüldükten sonra derişimi 0.1 M olan CTAB çözeltisi hazırlandı.

Soğuk sodyum borohidrid (NaBH_4) çözeltisi

Belli bir miktarda katı NaBH_4 tartılarak soğutulmuş deiyonize suyla çözümlenerek derişimi 0.01 M olan NaBH_4 çözeltisi hazırlandı.

Gümüş nitrat (AgNO_3) çözeltisi

Belirli bir miktarda katı AgNO_3 tartılarak derişimi 0,01 M olan AgNO_3 çözeltisi hazırlandı.

Askorbik asit çözeltisi

Belirli bir miktarda katı askorbik asitten tartılarak deiyonize su ile çözüldükten sonra derişimi 0.05 M olan askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

Tampon çözeltisi

Tampon çözeltisinin hazırlanmasında 0.1 M KCl , NaCl , Na_2HPO_4 ve KH_2PO_4 çözeltileri karıştırılarak pH değeri 7.4 olan fosfat tamponu (PBS) hazırlandı.

Bovin serum albumin (BSA) çözeltisi

Belirli bir miktarda katı BSA'dan tartılarak deiyonize su ile çözüldükten sonra derişimi 5 mg/mL olan stok BSA çözeltisi hazırlandı. Diğer derişimdeki BSA çözeltileri, stok BSA çözeltisinden belli hacimlerde alınarak deiyonize su ile seyreltilerek hazırlandı.

o-phytalaldehyde (OPA) reaktif çözeltisi

OPA reaktif çözeltisi 5.96 mM OPA ve 8.58 mM 2-merkaptoetanol çözeltileri karıştırılarak hazırlandı.

3.1.4. Altın nanopartikül sentezi

Altın nanopartiküllerin sentezinde öncelikli olarak nanoçekirdek (seed) çözeltisi hazırlandı Altın nano çekirdek çözeltisinin hazırlanmasında 0.1 M 7.5 mL CTAB çözeltisi, 0.01 M 250 µL HAuCl₄ çözeltisi ve 0.01 M 600 µL soğuk NaBH₄ çözeltileri karıştırıldı.

Altın nanoçubukların sentezi için; 0.1 M 4.75 mL CTAB çözeltisi, 0.01 M 500 µL HAuCl₄ çözeltisi ve 60 µL 0,01 M AgNO₃ çözeltisi karıştırıldı.. Hazırlanan turuncu renkli bu çözeltiye 100 µL askorbik asit eklenir. Daha sonra 10 µL altın nanoçekirdek çözeltisi eklenir ve elde edilen çözelti oda sıcaklığında 1 saat bekletildi.

3.1.5. Altın nanopartikül karakterizasyonu

Sentezlenmiş altın nanoçubukların TEM fotoğrafları ve UV-görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi ile spektrumları alındı.

3.1.6. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi

OPA reaktif çözeltisi ile protein etkileşimini gerçekleştirmek için protein çözeltisi ile OPA reaktif çözeltisi 1:10 (h/h) oranında karıştırıldı. Altın nanopartikül stok çözeltisinden 6 µL alınarak, OPA reaktif çözeltisi ve BSA etkileşimi gerçekleşmiş olan çözeltiye eklendi.

3.1.7. Nanopartikül varlığındaki OPA-BSA etkileşiminin karakterizasyonu

Geliştirilen yöntem kapsamında tamamlanmış OPA reaktif çözeltisinin proteinlerin amin grubuyla oluşturduğu kompleks nanopartikül varlığında SERS sinyali

alınmasını sağlamaktadır. Bu oluşan yapının kontrolü Raman spektroskopisi ve IR spektroskopisi kullanarak yapılmıştır.

Bu amaçla öncelikle sadece OPA içeren çözeltiye 6 µL stok altın çözeltisinden ilave edildi ve SERS spektrumu alındı. Daha sonra ME ilave edilerek tamamlanmış çözeltinin benzer şekilde spektrumu alındı. En son olarak ise ortama protein eklendiğinde oluşan yapının SERS spektrumu incelendi.

3.1.8. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi için en iyi çalışma koşullarının belirlenmesi

Çözelti pH'nın etkisi

Bölüm 3.6'ya göre hazırlanan analiz yönteminin SERS sinyali üzerine pH'nın etkisini incelemek için pH'sı 4.0, 5.9, 7.0, 9.0 ve 12.0 olan tampon çözeltileri hazırlandı. Sonrasında 0.54 mg/mL BSA varlığında her bir pH değerine karşı elde edilen SERS sinyali şiddet değerleri grafiğe geçirildi ve en uygun pH değeri belirlendi.

OPA miktarının etkisi

OPA miktarının analiz sırasında meydana gelen yapının SERS sinyaline etkisini incelemek amacıyla çözeltideki diğer bileşenler sabit tutulup hazırlanan OPA reaktif çözeltisine 0 mg - 40 mg OPA miktar aralığında, 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat tampon çözeltisi içerisinde SERS sinyal şiddetlerine bakıldı. Elde edilen grafikten reaksiyon için en uygun OPA miktarı belirlendi.

2-merkaptoetanol (ME) miktarının etkisi

ME miktarının analiz sırasında meydana gelen yapının SERS sinyaline etkisi çözeltideki diğer bileşenler sabit tutulup hazırlanan OPA reaktif çözeltisine eklenen ME miktarı 0 µL – 90 µL aralığında tutularak incelendi. 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat tampon çözeltisi içerisinde SERS sinyal şiddetlerine bakıldı ve elde edilen grafikten reaksiyon için en uygun ME miktarı belirlendi.

Altın nanopartikül miktarının etkisi

Uygun çalışma SERS şiddeti sinyalinin bulunması için farklı miktarlarda altın nanopartikül çözeltisi reaksiyon çözeltisine ilave edildi ve en uygun altın nanopartikül miktarı bulundu.

3.1.9. OPA ile nanopartikül tabanlı toplam protein miktarı tayin çalışmaları

Bölüm 3.1.6'da belirtildiği şekilde nanopartikül tabanlı toplam protein analizini gerçekleştirebilmek için, BSA stok çözeltisinden 0.0 mg/mL – 8.0 mg/mL aralığında dilüsyon çözeltileri 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu çözeltisi ile hazırlandı. Bir viyalde 100 µL BSA çözeltisi, 1 mL OPA reaktif çözeltisi ile karıştırıldı. Gerçekleşen reaksiyon ardından bu çözeltiden 250 µL bir Raman viyaline alındı ve üzerine 6 µL altın nanoçubuk stok çözeltisinden eklendi.

120 mW lazer gücü ve 6 saniye veri toplama süresi ayarlanan SERS cihazında bu çözeltilerle SERS spektrumu elde edildi. Ortalama sinyali almak için beş tekrar yapıldı. Daha sonra yöntemin farklı BSA derişimlerine cevabı bir grafiğe geçirilerek LOD, LOQ, %RSD, eğrinin korelasyon katsayısı ve doğrusal aralık hesaplandı.

Gerçek Örneklerde Uygulama

UHT yağsız süt örneklerinin toplam protein miktarı geliştirilen yöntem ile belirlendi. Süt örnekleri 1:10 (v/v) oranında seyreltildi ve SERS ölçümleri yapıldı.

3.2. Nanopartiküller ile Klik Kimyası Temelli Toplam Protein Tayini

3.2.1. Kullanılan kimyasallar

Çalışmada kimyasal madde olarak hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB), hidrojen tetrakloro Au(III) (HAuCl₄) (30% seyreltik hidroklorik asit çözeltisinde 99.99), L-askorbik asit, bovin serum albumin (BSA), disodyum hidrojen fostat (Na₂HPO₄), potasyum dihidrojen fosfat (KH₂PO₄), potasyum klorür (KCl), 1-9-nonaneditiyol (HS(CH₂)₉SH), demir (III) klorür (FeCl₃), demir (II)-sülfat heptahidrat

(FeSO₄.7H₂O), etilendiamintetraasetik asit (EDTA), perklorik asit (HClO₄), sülfürik asit (H₂SO₄), Silikon yüzey (p tipi), N,N-Dimetilformamid, sodyum azid (≥99.0%), 3-kloro-1-propantiyol, 6-merkapt-1-hekzanol, N,N'-Disikloheksilkarbodiimid, 4-(Dimetilamino)piridin (≥98.0%), (3-kloropropil)trimethoksisilan (≥97%), propargil alkol (99%), 5,5'-ditiyobis(2-Nitrobenzoik Asit) (DTNB), bakır sülfat pentahidrat (CuSO₄5H₂O), sodyum potasyum tartarat Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, A.B.D.) firmasından sodyum hidroksit (NaOH), sodyum klorür (NaCl) Emir Kimyasalları (Türkiye) sodyum borohidrid (NaBH₄), gümüş nitrat (AgNO₃), etanol (%99.9), metanol ve hidrojen peroksit (H₂O₂) Merck (Darmstadt, Almanya) firmasından sağlandı.

Biüret reaktif çözeltisi

Biüret reaktif çözeltisi hazırlamak için 1,5 gram CuSO₄5H₂O ve 6,0 gram sodyum potasyum tartarat kimyasalları tartılıp 1 litrelik balon jojede 500 ml deiyonize su ile çözüldükten sonra üzerine 300 ml %10'luk NaOH çözeltisi eklendi ve 1 litre hacme deiyonize su ile tamamlandı.

3.2.2. Kullanılan cihaz ve gereçler

Deneyler sırasında, DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc., Laramie, WY, A.B.D.) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel (numune tutma) haznesi ve CCD dedektor kullanılmıştır. Cihaz parametreleri ise 20x objektif ve 30 µm lazer spot alanı 150 mW lazer gücü olarak ayarlanmıştır. Ayrıca BWTEK Fiber Optik Raman spektroskopisi cihazı, UV spektroskopisi cihazı (SPECTRONIC GENESYS), santrifüj cihazı (JOUAN MR 1822), deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185), *TEM analiz cihazı (JSM-6400)*, ultrasonik banyo cihazı (BANDELIN SONOREX), hassas terazi (SHIMADZU), Mikropipet (1-10,10-100,100-1000µl), pH metre (SX-610 PEN TYPE) kullanıldı.

3.2.3. Nanopartikül sentezi ve karakterizasyonu

Klik kimyası temelli toplam protein tayini çalışmasında altın nanoçubuklar ve manyetik nanoküreler kullanılmıştır. Modifiye edilerek kullanılan nanoküreler azid

gruplara sahipken, nanoçubuklar hem klik kimya reaksiyonunda gerekli olan alkin grupları sağlayacak hem de Raman sinyali takibini sağlayacaktır.

Altın nanoçubuk sentezi

Çalışmada kullanılan altın nanoçubuklar bölüm 5.1.4'te anlatıldığı şekilde sentezlendi.

Manyetik altın nanoküre sentezi

Partiküllerin manyetik küre şeklinde üretilmesi için öncelikle demir nano partiküller sentezlendi.. Fe^{+3} ve Fe^{+2} karışımını kullanarak oda koşullarında, bazik hidroliz reaksiyon düzeneği ile manyetik nanopartikül sentezi gerçekleştirildi. Sentez işlemine 1 ml 1.28 M FeCl_3 ve 1ml 0.64 M $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2 dakika boyunca karıştırılarak başlandı. Daha sonra bu çözelti üzerine 25 ml 1 M NaOH eklenerek 4 saat oda sıcaklığında azot atmosferi altında karıştırıldı. NaOH eklenmesiyle oluşan demir tuzlarının ileri derecede yükseltgenmesini önlemek için, reaksiyon inert bir atmosferde (azot gazı altında) gerçekleştirildi. Elde edilen demir tuzları üç defa santrifüj işlemi (4000 rpm de 5 dakika boyunca) uygulanmasının ardından, demir tuzları üzerine 3 ml 2 M HClO_4 çözeltisi konularak 24 saat bekletildi. Daha sonra 10000 rpm de 20 dakika santrifüj işlemi üç defa tekrar edilerek oluşan açık kahverengi renkte demir nanopartiküllerinin üzerindeki fazla miktardaki asit uzaklaştırıldı. Oluşan demir hidrosit tuzlarının kontrollü bir şekilde yükseltgenmesiyle kendiliğinden manyetik özellik gösteren demir nanopartikülleri (Fe_3O_4) oda koşullarında sentezlendi [61].

Çekirdek-kabuk yapısında $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-Au}$ nanopartikül sentezi için bir miktar 10 mg demir nanopartikül tartılarak suda çözündü. Bu çözelti üzerine 5 mL 0,01 M EDTA eklenir ve mıknatıs yardımıyla bir kez yıkandı Daha sonra sırasıyla 7 mL 0.1 M CTAB, 3 mL 0.01 M altın çözeltisi ve 300 μL 1 M NaOH ilave edilerek 150 mg hidroksilaminklorür eklendi. Her aşamada sonike edilmesine dikkat edilerek hazırlanan çözelti bir gece karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda şarap kırmızımsı renk gözlenmesiyle altın kaplı manyetik küreler elde edildi.

Manyetik silika nanoküre sentezi

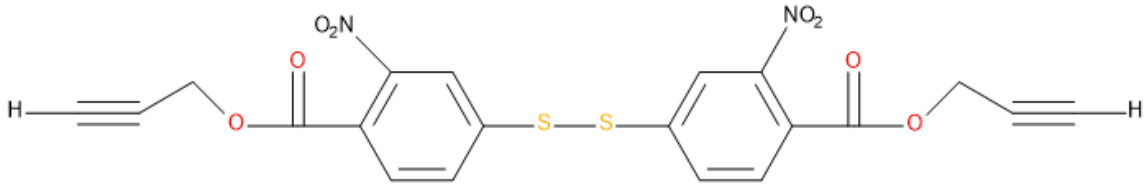
Manyetik silika nanoküreler için öncelikle sodyum sitrat ile modifiye edilmiş koloidal manyetik demir nanopartiküller (Fe_3O_4) kimyasal birlikte çöktürme metoduyla üretildi. Bu amaçla nitrojen gazı akışlı ortamda 80 mL 0.5 M Fe^{+3} ve 40 mL 0.5 M Fe^{+2} içeren sulu çözelti hazırlandı. Manyetik karıştırıcıda bekletilen bu çözeltiye 10 mL %25'lik $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$ eklendi. Bunun sonucunda oluşan siyah çökelek 30 dakika süresince karıştırıldı ve süre sonunda toplanarak 300 mL 0.3 M sodyum sitrat çözeltisinde 90°C sıcaklıkta 1 saat bekletildi. Elde edilen son ürün pH 7.0 olana kadar deiyonize su ile yıkandı ve böylece manyetik demir partiküller elde edildi [62].

Manyetik demir partikülleri silika kaplamak üzere öncelikle 6 mL %25'lik $\text{NH}_3\text{H}_2\text{O}$, 50 mL deiyonize su, 250 mL etanol ve 5 mL yıkanmış manyetik demir partiküller içeren çözeltiye etanolde hazırlanmış tetraetil ortosilikat (TEOS) çözeltisi ilave edildi. Bu çözelti 20 saat süreyle karıştırıldı ve 9000 rpm'de santrifüj edilerek çökelek toplandı. Etanol ile dört kez yıkama işlemi yapıldı ve kuru vakum ortamında 24 saat süreyle bekletilerek silika kaplı manyetik nanoküreler ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) elde edildi [62].

Sentezlenen manyetik altın ve silika nanoküreler ile altın nanoçubukların karakterizasyonunu için UV-VIS spektrofotometre ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM) ölçümleri kullanıldı.

3.2.4. Alkin-DTNB sentezi

Planlanan çalışma kapsamında nanopartiküllerin modifikasyonu ve SERS sinyalinin takibi için Alkin-DTNB gerekmektedir. Bu amaçla 12,4 mM DTNB hazırlanmış ve üzerine 14,6 mM disiklohekzicarbodiimide ile 1,48 mM dimetilaminopiridin ilave edildi. Hazırlanan bu karışım 0°C 'ye soğutuldu. Daha sonra 14,5 mM propargil damla damla çözelti üzerine ilave edildi ve oda sıcaklığında 24 saat süreyle karışmaya bırakıldı. Bu süre sonunda oluşan katı süzölmüş ve çözücü ortamdan buharlaştırıldı. Böylece elde edilen Alkin-DTNB (şekil 3.1) altın nanoçubukların modifikasyonu için kullanıldı.



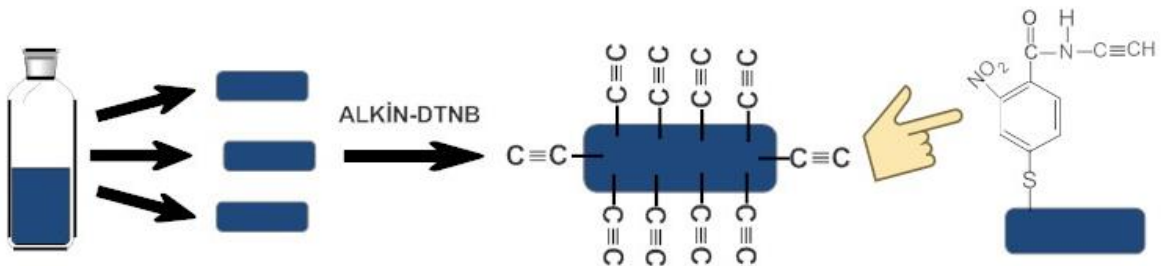
Şekil 3.1. Sentezlenen Alkin-DTNB molekülünün yapısı

3.2.5. Nanopartiküllerin modifikasyonu

Klik kimya reaksiyonunu gerçekleştirebilmek için gereken alkin grubu ve SERS sinyali takibi için uygun olan DTNB, üretilen altın nanoçubukların modifikasyonu ile yapıya kazandırıldı. Hazırlanan bu alkin-DTNB modifiye edilmiş nanoçubuklarla klik reaksiyonu gerçekleştirecek olan altın ve silika nanokürelerde azid modifikasyonu yapıldı.

Nanoçubukların alkin-DTNB ile modifikasyonu

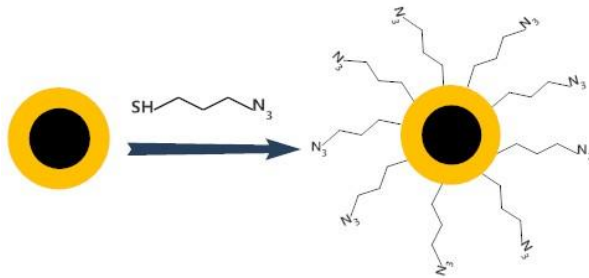
Şekil 3.2’de gösterildiği üzere klik kimya reaksiyonunu gerçekleştirebilmek için gereken alkin grubu ve SERS sinyali takibi için uygun olan DTNB, üretilen bu nanopartiküllerin modifikasyonu ile yapıya kazandırıldı. Bu amaçla nanopartiküller 3 mM alkin-DTNB çözeltisi ve 5 mM 6-Mercapto-1-hexanol çözeltisi içerisinde 24 saat bekletildi. Süre sonunda pH 7,4 PBS tamponu ile 3 sefer yıkanmış ve tampon çözelti içerisinde bekletildi.



Şekil 3.2. Nanoçubukların alkin-DTNB ile modifikasyonu

Altın nanokürelerin azid ile modifikasyonu

Alkin-DTNB modifiye edilmiş nanoçubuklarla klik reaksiyonu gerçekleştirecek olan azid sonlu manyetik kürelerin modifikasyonu için alkolde hazırlanmış 3 mM 3-azidopropanthiol çözeltisi ve spesifik olmayan bağlanmaları engellemek amacıyla 5 mM 6-Mercapto-1-hexanol çözeltisi kullanıldı (Şekil 3.3). Hazırlanan nanoküreler bu çözelti içerisinde 24 saat süreyle bekletildi ve son olarak pH 7.4 PBS tampon çözeltisi içerisine alındı.



Şekil 3.3. Manyetik nanoküre ve azid ile modifikasyonu

Silika nanokürelerin azid ile modifikasyonu

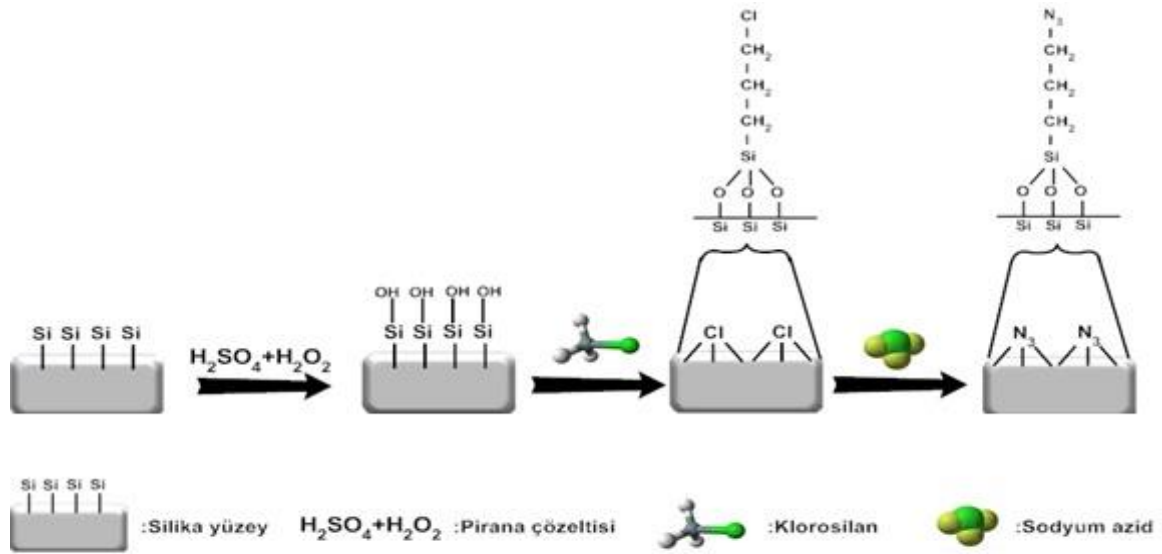
Silika kaplı manyetik kürelerin azid ile modifikasyonu amacıyla 100 mg manyetik silika nanopartikül 100 mL etanol içerisinde dispers edildikten sonra 1 mL 3-kloropropil trimetoksisilan ilave edildi ve karışım oda sıcaklığında mekanik karıştırıcı yardımıyla 24 saat boyunca karıştırıldı. Bu süre sonunda partiküller mıknatıs yardımıyla toplandıktan sonra sırasıyla etanol, etanol/DMF (V/V: 1/1) ve DMF ile üç kez yıkandı ve en son 100 mL DMF içerisinde dispers edildi. Elde edilen bu dispers çözelti içersine derişimi 0.1 M olacak şekilde NaN_3 ilave edildi, ve karışım 90 C'de 24 saat boyunca mekanik karıştırıcı ile karıştırıldı. Bu süre sonunda partiküller mıknatısla toplandıktan sonra DMF ile üç kez yıkayıp vakum etüvde kurutuldu.

3.2.6. SERS substratı modifikasyonu ve karakterizasyonu

Planlanan çalışma kapsamında heterojen sistemde klik kimya reaksiyonlarında gerekli olan azid grupları silika yüzey üzerine modifiye edilmiş ve bu yüzeyler SERS substratı olarak kullanıldı.

Bu amaçla silika yüzeyler 30 dk süresince pirana çözeltisinde bekletilerek, süre sonunda bol su ve alkol ile yıkandı. Temizlenen yüzeyler kurutulduktan sonra %1 lik klorosilan-toluen çözeltisi içinde oda sıcaklığında 24 saat karıştırmadan bekletildi. Daha sonra sırasıyla toluen, 1:1 toluen:metanol ve metanol ile sonike edildi ve yüzeyler kurumaya bırakıldı. Bu işlemler sonunda klor (Cl) bağlanmış silika yüzeyler elde edildi.

Bu aşamadan sonra klor bağlı yüzeyler dimetilformamid (DMF) ile hazırlanmış 0.1 M NaN₃ çözeltisi içerisine atılıp 60°C sıcaklıkta N₂ atmosferinde 24 saat süreyle karıştırılarak bekletildi. Süre sonunda yüzeyler önce DMF ile sonra da su ile 10 dakika süresince yıkandı ve azot gazı ile kurutuldu. Bu işlemler sonucunda heterojen analiz sistemi için gerekli olan azid sonlu yüzeyler elde edildi (şekil 3.4).



Şekil 3.4. Silika yüzeyin azid ile modifikasyonu

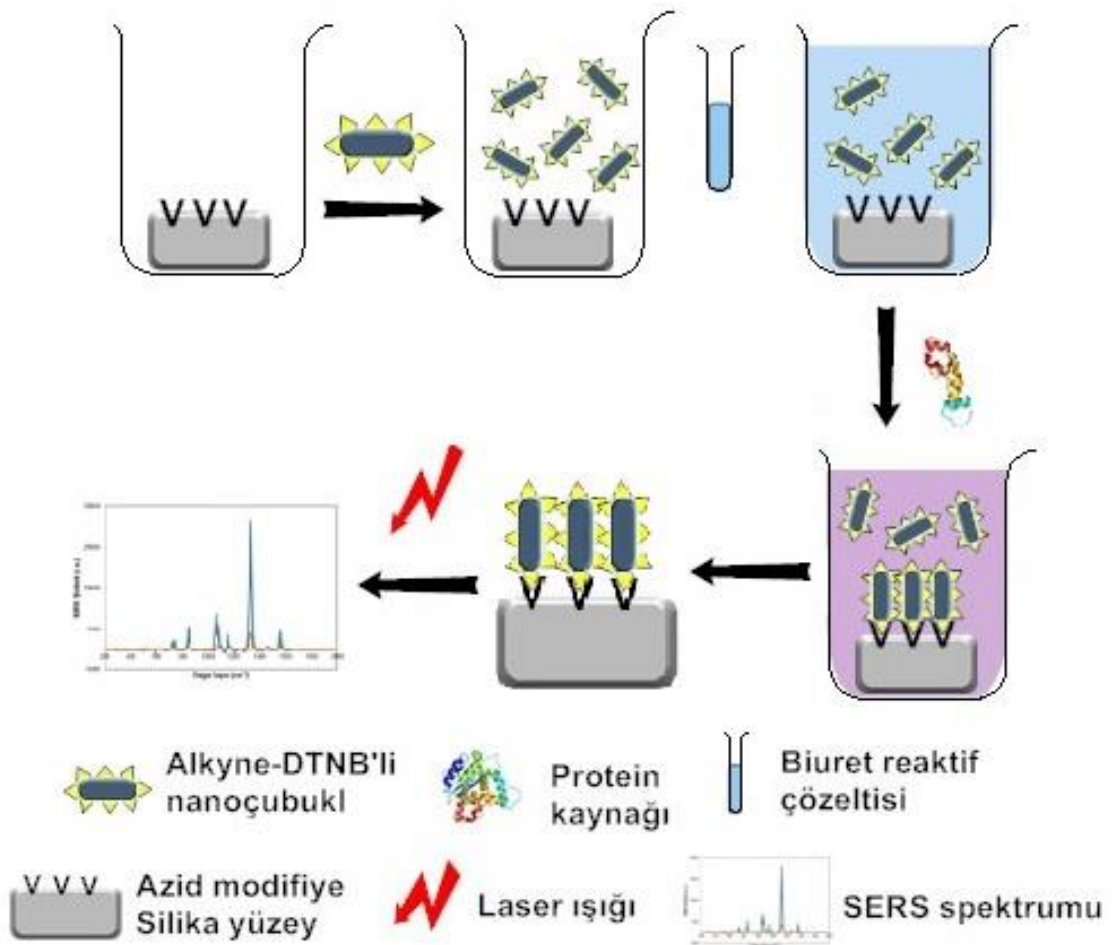
Azid sonlu modifiye silika yüzeylerin özellikleri Raman spektroskopisi kullanılarak test edilmiştir.

3.2.7. Klık kimyasıyla nanopartikül tabanlı toplam protein miktarı tayin çalışmaları

Klık kimyası temelli SERS tekniği yardımıyla toplam protein miktar tayini homojen ve heterojen analiz sistemleri kullanılarak yapıldı.

Heterojen sistemde nanopartikül toplam protein tayini

Şekil 3.5'te şematize edilen heterojen analiz sisteminde modifiye edilmiş azid sonlu yüzeyler boş viyalere alındı. Daha sonra her viyale sırasıyla 600 µL alkin-DTNB ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk çözeltisi, 500 µL protein standardı (BSA) ve 600 µL biüret reaktif çözeltisi ilave edildi. Viyaller oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda yüzeyler PBS tampon çözeltisi ve su ile yıkanıp, kurutuldu. Daha sonra yüzeylerde SERS ölçümü ile sinyal takibi yapıldı.



Şekil 3.5. Heterojen sistemde klik kimyası ile toplam protein miktar tayini

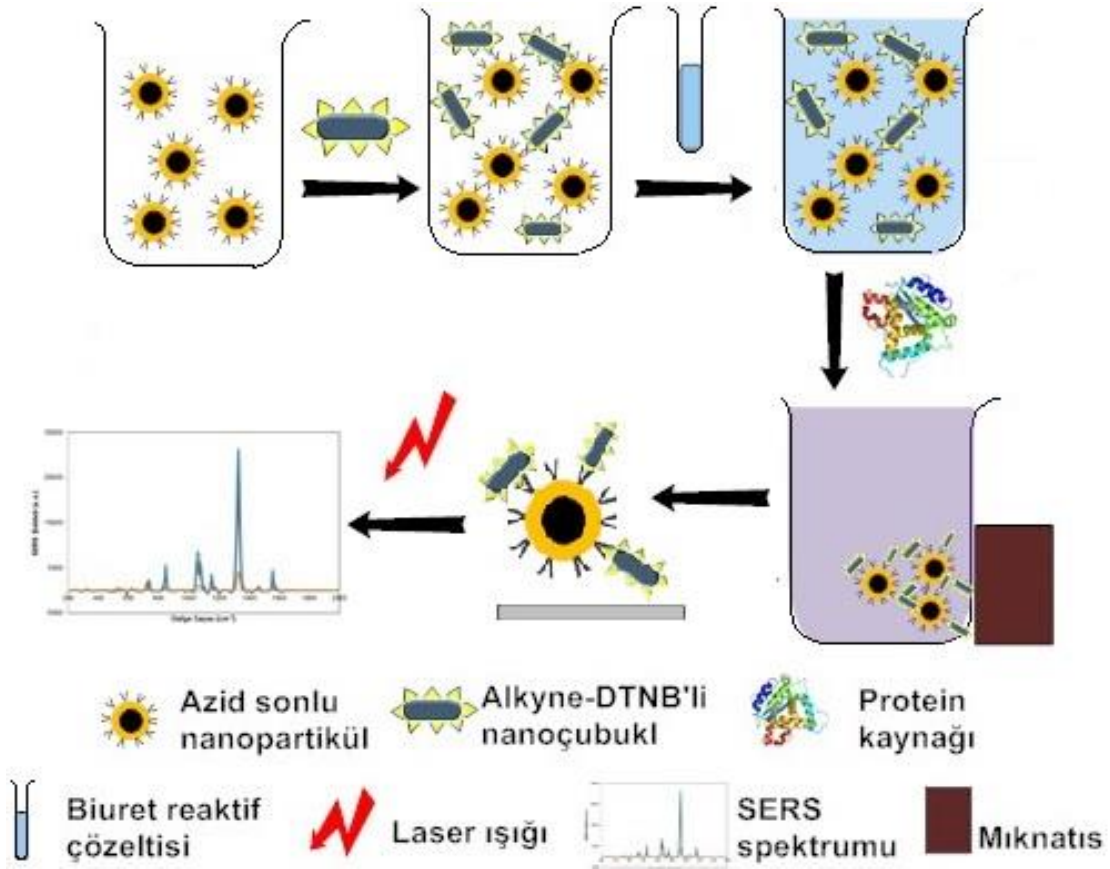
Alkali ortamda Cu^{+2} protein varlığında Cu^{+1} 'e indirgenir ve Cu^{+1} , alkin-DTNB modifiye nanoçubukların, Si yüzeydeki azid grupları ile klik reaksiyonunun gerçekleşmesini sağlar. Artan protein derişimi ile doğru orantılı olmak üzere yüzey ile reaksiyona giren nanopartikül miktarı artar. Bu artış nanoçubuklara bağlanmış

olan DTNB molekülünün sinyali ile takip edildi ve protein derişimine paralel SERS sinyali ile kalibrasyon doğrusu çizildi.

Homojen sistemde nanopartikül tabanlı toplam protein tayini

Homojen sistemde klik kimyası yardımıyla nanopartikül tabanlı toplam protein tayini çalışmasında heterojen sistemde kullanılan azid modifiye silika yüzeyler yerine manyetik silika nanoküreler ve manyetik altın nanoküreler kullanıldı.

Şekil 3.6'da gösterilen homojen analiz sisteminde manyetik altın nanoküreler azid ile modifiye edildi. Klik reaksiyonu gerçekleştirebilmek için öncelikle azid sonlu manyetik altın nanopartiküller viallere alındı. Daha sonra her vialle sırasıyla 600 µL alkin-DTNB ile modifiye edilmiş nanoçubuk çözeltisi, 500 µL protein standardı ve 500 µL biüret reaktif çözeltisi ilave edildi. Viyaller oda sıcaklığında 1 saat süreyle karıştırıcıda bekletildi. Bu süre sonunda klik reaksiyonu gerçekleştirmiş partiküller bir mıknatıs yardımıyla toplanıp, PBS tampon çözeltisi ve su ile yıkandı. Klik kimyası gerçekleşmiş olan manyetik küre ve nanoçubuk yapısından bir miktar ölçüm yüzeyine alınarak SERS spektrumu elde edildi.



Şekil 3.6. Homojen sistemde klik kimyası ile toplam protein miktar tayini

Homojen analiz sisteminde altın nanoküreler yerine silika kaplı demir partiküller de kullanıldı. Bu sistemde ortama öncelikle 650 μL alkin modifiye edilmiş rod çözeltisi, 500 μL protein çözeltisi ve 650 μL azid modifiye manyetik silika nanopartiküller ilave edildi. Daha sonra bu karışım üzerine 500 μL biüret reaktifi ilave edildi ve gerçekleşen klik kimyası sonucu oluşan yapı bir mıknatıs yardımıyla toplanarak 3 kez 0.1 M pH 7.4 PBS tampon çözeltisi ile yıkandı. Bu yapıdan miktar ölçüm yüzeyine alınarak SERS spektrumu elde edildi.

Gerçek örneklerde uygulama

Süt numuneleri seyreltme işlemi sonrası 500 μL alınarak klik reaksiyonda indirgeyici olarak kullanıldı. Elde edilen sinyal değeri kalibrasyon doğru denklemi yardımıyla yorumlandı ve numunelerdeki toplam protein miktarı belirlendi.

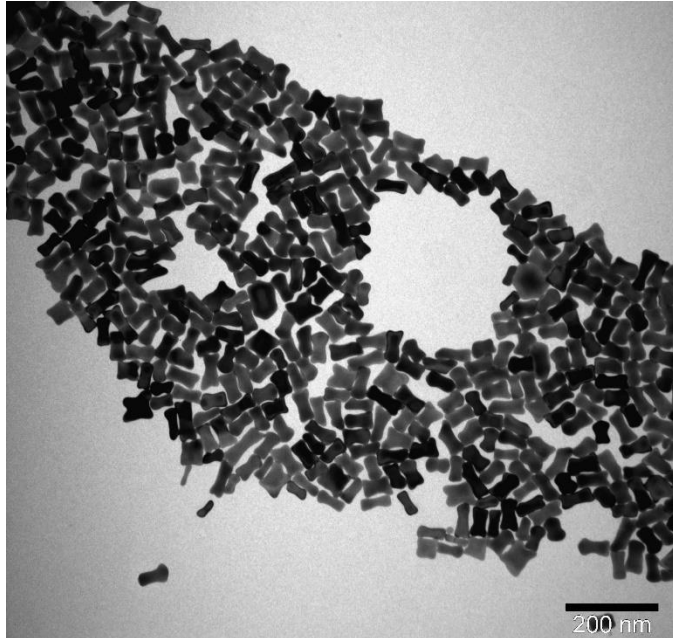
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Nanopartikül tabanlı toplam protein tayinini amacıyla geliştirilen iki yöntemin deneysel bulguları iki farklı başlık altında verilmiştir.

4.1. OPA-Protein Etkileşimi Temelli Yöntemin Bulguları

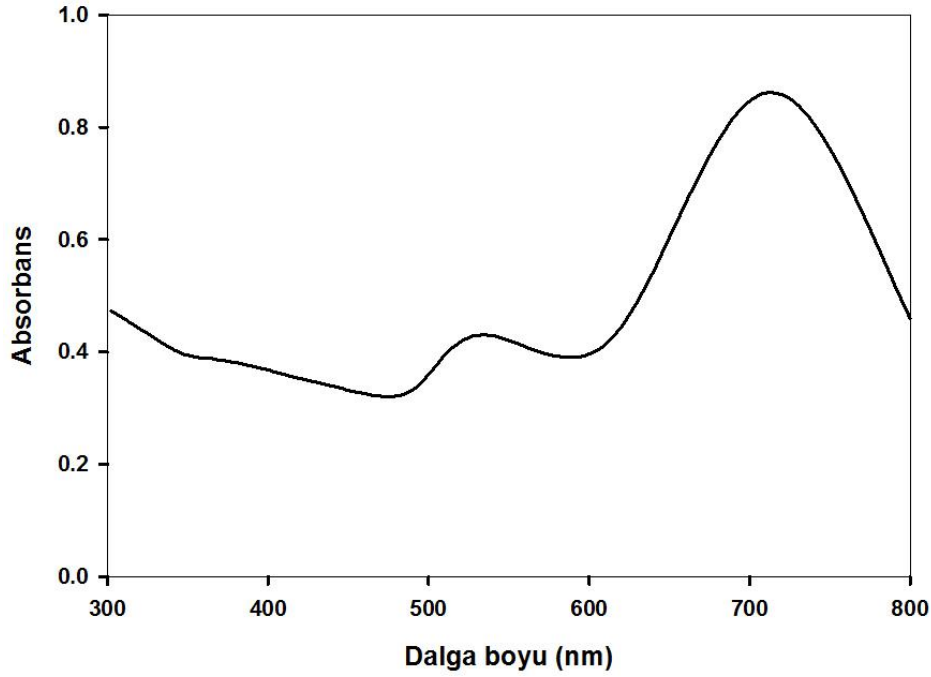
4.1.1. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu

Çalışmada, çubuk nanopartikül şekillerinin analiz performansına etkisi araştırılmıştır. Nanopartiküllerin karakterizasyonu için, partiküllerin optik özellikleri ve anizotropilerinden faydalanılmaktadır. Nanopartikül karakterizasyonu için genellikle UV-visible spektrofotometre ve transmisyon elektron mikroskobu kullanılmaktadır. Nanopartiküllerin şekil ve boyutları resim 4.1’de TEM görüntüleri ile verilmektedir. Buna göre, altın nanoçubukların boyutları yaklaşık olarak boyu 45 nm, eni 15 nm’dir. Nanoçubukların boyutları genellikle boy/en oranı ile verilmektedir. Bu durumda sentezlenen nanoçubukların boy/en oranı yaklaşık olarak 3’tür.



Resim 4.1. Çubuk nanopartiküllerin TEM görüntüsü.

Partiküllerin absorpsiyon spektrumları nanopartiküllerin optik özellikleri yanında şekilleri hakkında da bilgi vermektedir. Şekil 4.1 bir çubuk kolloidin spektrumunu göstermektedir ve altın nanoçubuğa ait plazmon bandları görülmektedir. Buna göre ilk plazmon bandı (530 nm) nanoçubuğa ait enine plazmon bandı iken ikinci plazmon bandı (719 nm) nanoçubuğun boyuna plazmon bandıdır.



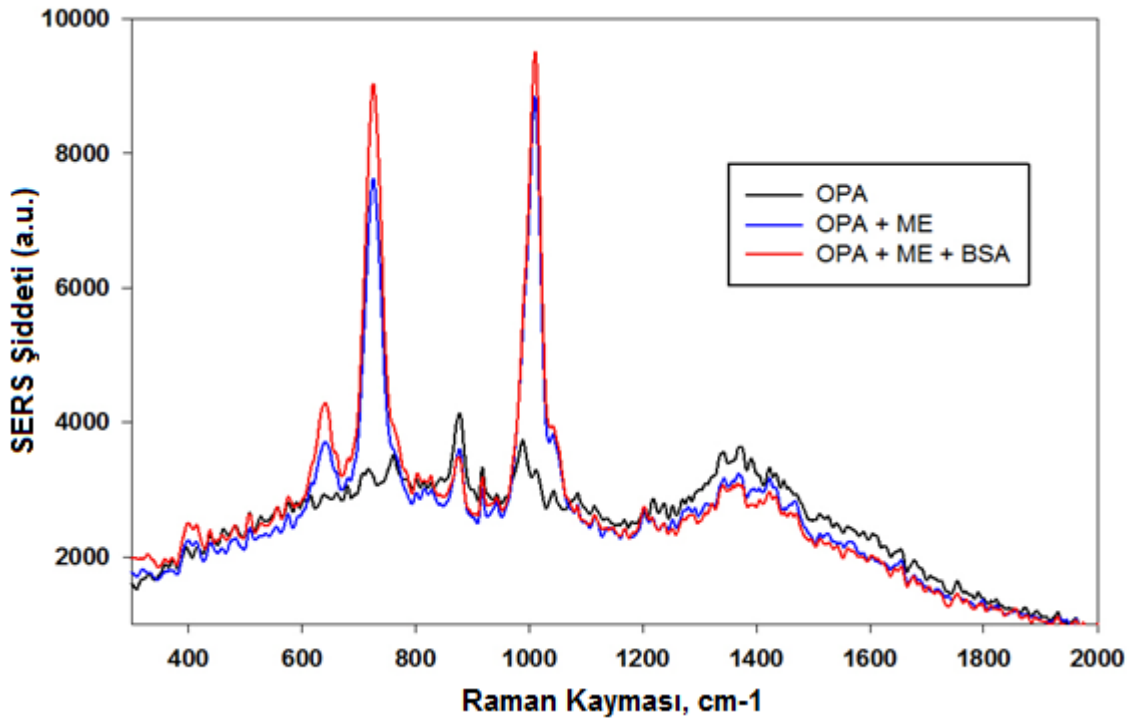
Şekil 4.1. Altın nanoçubukların UV-visible spektrumu

Şekil 4.1’de görüldüğü gibi altın nanopartiküller plazmon rezonansı nedeniyle dar ve şiddetli absorpsiyonlar gösterirler. Uygun dalga boyunda gönderilen ışın ile iletkenlik elektronlarının elektromanyetik alan varlığında osilasyon hareketi sırasında rezonansa girmeleri sonucunda bu durum ortaya çıkmaktadır. Altın nanopartiküllerin plazmon rezonansları, partiküllerin boyutu, şekli, yapısı ve bulunduğu ortamın refraktif indeksi ile değişmektedir. Bu nedenle, manyetik nanopartiküllerin rezonansları farklı gözlenmektedir. Nanoçubukların iki farklı plazmon rezonansı sergilemeleri, kısa ve uzun yüzeyindeki elektron salınımlarından kaynaklanmaktadır [63] Bu özelliğin sağladığı avantaj, boy/en oranı büyük olan nanoçubuklarla düşük enerjili görünür bölge ile NIR’da çalışma yapma olanağıdır. Nanoçubukların boy/en oranı ile oynanarak istenilen boyutta nanoçubuklar üretilmesi ve nanoçubuğa bu sayede farklı optik özellikler kazandırılabilmesi açısından, nanoçubuklar biyolojik

analizlerde oldukça önemlidir. Nanoçubuklarda boy-en oranı arttıkça ışımaz durulma azalmakta ve Raman verimliliği artmaktadır.

4.1.2. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi karakterizasyonu

OPA çözeltisi ve 2 – merkaptoetanol (ME) ile beraber tamamlanmış OPA reaktif çözeltisini oluşturmaktadır. Bu reaktif çözeltisinde açık uçta sülfidril grupları bulunmaktadır. Protein varlığında, proteinlerin primer amin grupları tamamlanmış OPA reaktif çözeltisi ile reaksiyona girmektedir ve böylece bilinen floresans yapı oluşmaktadır. Tez çalışması kapsamında floresans ölçüm yerine ortama nanopartikül ilave edilerek SERS tekniği ile toplam protein tayini çalışması yapılmıştır. Nanopartikül varlığında gerçekleşen reaksiyonların karakterizasyonu SERS ve IR spektroskopisi tekniği ile yapılmıştır. Şekil 4.2’de SERS tekniği ile yapılan karakterizasyon çalışmasının spektrumları verilmiştir.



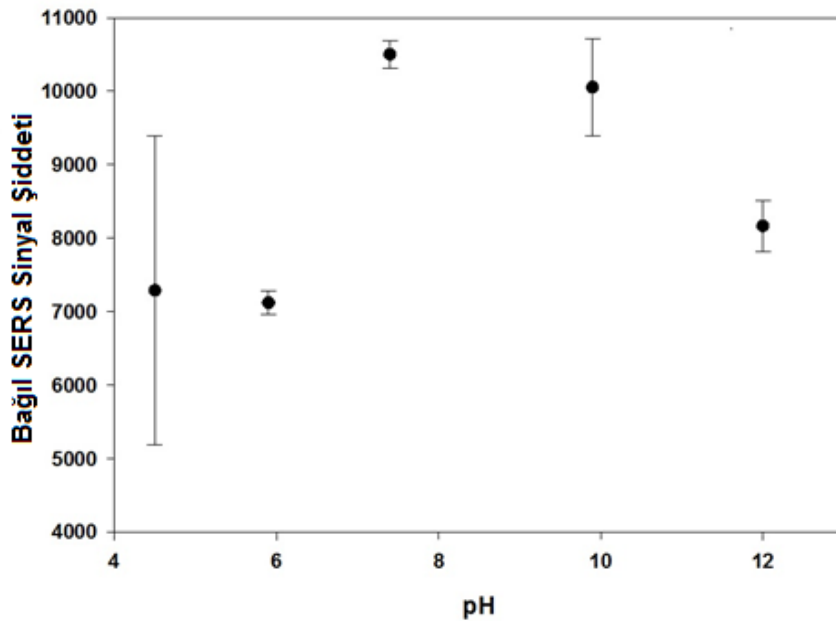
Şekil 4.2. Nanopartikül içeren çözeltide o-fitalaldehit (OPA), 2-mercaptoetanol ile oluşan tamamlanmış OPA çözeltisi (OPA + ME) ve protein (BSA) varlığında gerçekleşen reaksiyonun (OPA + ME + BSA) SERS spektrumu.

OPA molekülü SERS spektrumunda 875 ve 916 cm^{-1} de sırasıyla halka yapının C – H ve C – C gerilmelerine ait bantları göstermektedir [64]. Çözeltiye ME eklenmesinden sonra, 640 ve 727 cm^{-1} de alkil zincirine ait büyük bantlar C – S gerilmesine ve 1008 cm^{-1} de C – C – O gerilmesine ait olan bantlar izlenmiştir [65]. Yapılan birçok denemede proteinler reaktif çözeltisi (OPA + ME) ile etkileştiği zaman 727 ve 1008 cm^{-1} deki bantlarda artış görülmüştür. İndirgenmiş sülfidril grupları ile reaksiyona giren proteinlerin primer amin grupları ile iki halka yapısı oluşmaktadır. Altın nanoçbukların ortamda olmasıyla değişen konfigürasyon ile nicel analiz yapılabilmektedir.

4.1.3. Nanopartikül varlığında OPA-BSA etkileşimi için en iyi çalışma koşulları

OPA – protein etkileşimini nanopartikül varlığında SERS sinyali takip edilerek geliştirilen toplam protein tayini yönteminde en iyi SERS sinyalinin elde edildiği koşullar optimize edilmiştir.

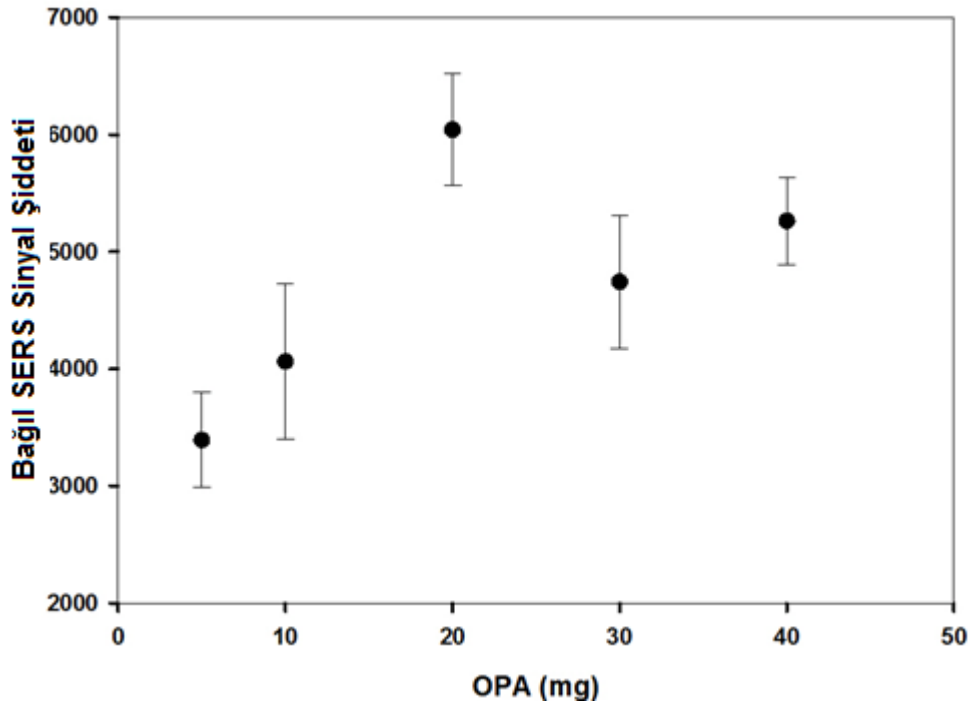
Çözelti pH değerinin etkisi, pH'sı 4.0-12.0 arasında değişen tampon çözeltisine 0.54 mg/ml BSA eklendiğinde elde edilen SERS sinyali şiddetleri kaydedildi. Şekil 4.3 SERS sinyal şiddetinin pH 7.4'de en iyi değerin elde edildiğini göstermektedir.



Şekil 4.3. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine pH'nın etkisi

Klasik floresans spektroskopi yönteminde tercih edilen pH 10'da SERS sinyal şiddetleri pH 7.4'de elde edilen değerlere yakındır. Buna karşın biyolojik örnekler için fizyolojik pH aralığı 6 – 9 arasında olduğundan pH değeri 7.4 olan 0.1 M PBS tampon çözeltisi tercih edilmiştir.

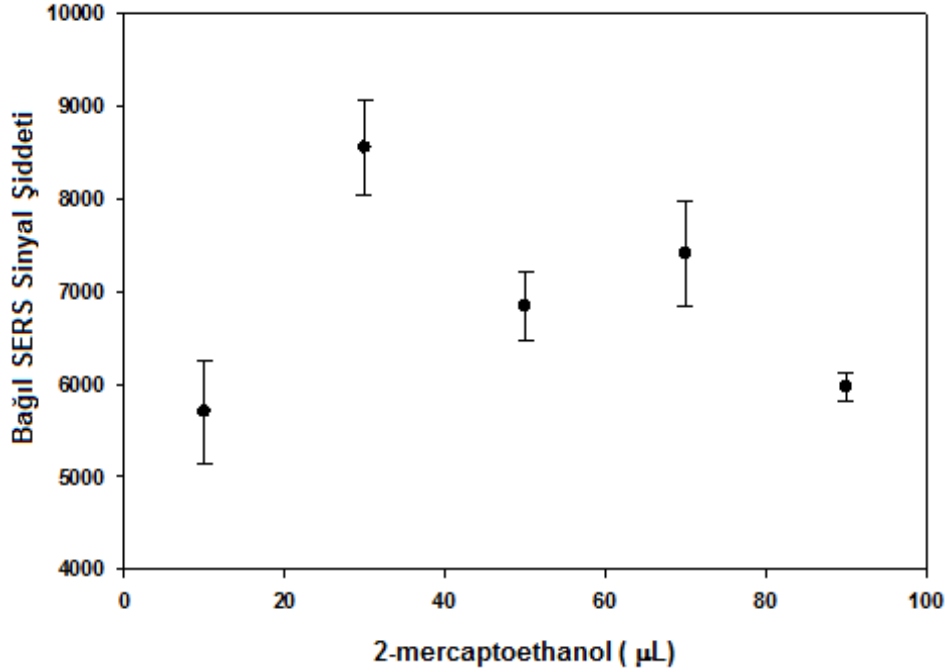
Geliştirilen yöntemde reaksiyona giren çözeltideki bileşenlerin miktarları büyük öneme sahiptir. OPA miktarının reaksiyon sonucu oluşan yapının SERS sinyaline etkisini incelemek amacıyla 0.1 M pH 7.4'de hazırlanan fofstaf tamponu çözeltisinde diğer bileşenler sabit tutulup hazırlanan OPA reaktifine 0 mg – 40 mg arasında değişen OPA ilave edildi ve SERS sinyalleri takip edildi. Şekil 4.4 SERS sinyal şiddetinin OPA reaktif çözeltisine 20 mg OPA ilave edildiğinde en iyi değeri verdiğini göstermektedir.



Şekil 4.4. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine reaktif çözeltisine eklenen OPA miktarının etkisi

Proteinler reaktif çözeltisindeki bileşenler oranında reaksiyona girmekte ve bir noktadan sonra doyum noktasına ulaşmaktadır. OPA reaktif çözeltisinin bir diğer bileşeni olan ME'nin reaksiyondaki miktarının SERS sinyaline etkisi diğer bileşenler sabit tutulup, 0.1 M pH 7.4 fosfat tampon çözeltisi içerisine 0 μ L – 90 μ L aralığında

değişen ME ilave edilerek incelendi. Şekil 4.5'te 25 mL reaktif çözeltisine 30 µL ME eklendiğinde en iyi SERS sinyal şiddetinin elde edildiğini göstermektedir.



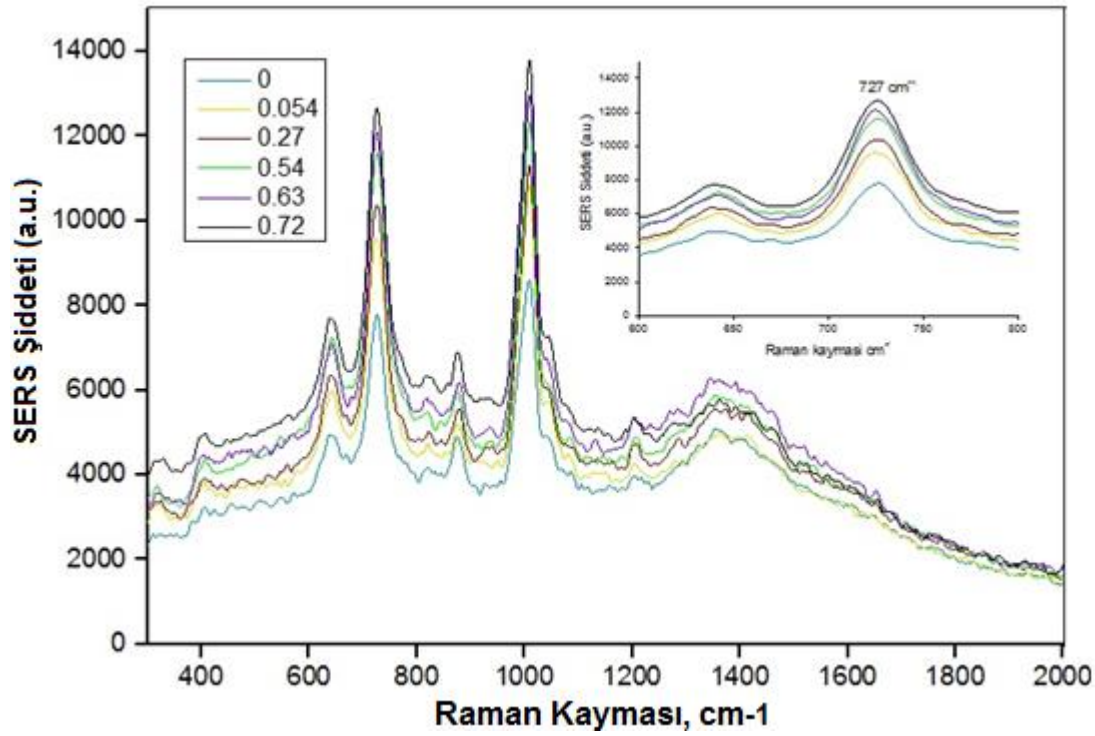
Şekil 4.5. Nanopartikül varlığında OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal şiddetine reaktif çözeltisine eklenen ME miktarının etkisi.

Partiküllerin OPA molekülü varlığında toplam protein tayininde kullanılması ilk defa bu çalışmada söz konusu olmuştur. Çubuk nanopartiküllerin SERS sinyal şiddetine etkisini belirlemek için ilave edilen çubuk nanopartikül miktarı değiştirildi. Reaksiyon ortamındaki tüm bileşenler sabit tutulduğunda artan rod nanopartikül miktarıyla doğru orantılı olarak sinyal şiddeti artmıştır. Bu durumda sinyal doyum noktası incelenmiştir. Reaksiyona giren protein miktarı artışıyla belli bir noktadan sonra doğrusallık kaybolmuştur. OPA reaktif çözeltisi ile etkileşmiş proteinlerin SERS sinyal takibi için 6 µL çubuk nanopartikül en iyi sonucu vermiştir.

4.1.4. Toplam protein miktarı belirleme çalışmaları

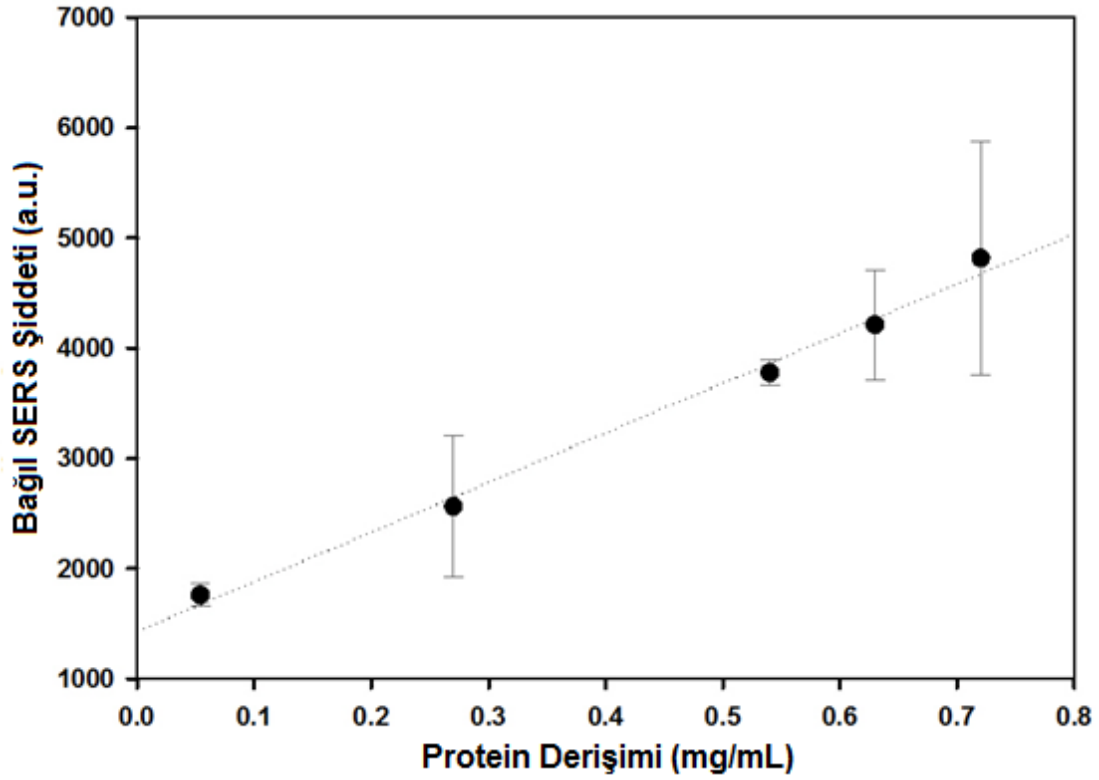
OPA reaktif çözeltisi ile protein etkileşimini gerçekleştirmek için OPA reaktif çözeltisi ile protein çözeltisi 1:10 (h/h) oranında karıştırıldı. Protein stok çözeltisi olarak kullanılan BSA'dan 0.0 mg/mL – 8.0 mg/mL aralığında 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat

tamponu çözeltisi ile hazırlanan dilüsyonlardan elde edilen SERS spektrumları şekil 4.6'da verilmiştir.



Şekil 4.6. Farklı derişimlerde (0 – 0.72 mg/mL) protein varlığında altın nanoçubuk ilavesiyle elde edilen SERS spektrumu ve 727 cm⁻¹ de gözlenen C – S gerilmesi.

Altın nanoçubuk varlığında oluşan OPA-protein yapısına ait karakteristik band saptanmıştır ve bu banttaki değişim yardımıyla kalibrasyon grafikleri hazırlanmıştır. Şekil 4.7’de artan protein derişimine karşılık elde edilen C-S bant şiddetlerinin bağıl değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı görölmektedir. Grafikler reaksiyona giren 0.054 – 0.720 mg/mL protein derişimleri için hazırlanmış ve bu aralıkta doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2 = 0.9927$) elde edilmiştir. Geliştirilen analiz yöntemi ile tüm alanlarda hassas sonuçlar verebilmesinin yanı sıra 10 saniye gibi kısa analiz süresi yöntemin en önemli üstünlüğüdür.



Şekil 4.7. Farklı protein (BSA) derişimlerinde OPA yöntemiyle elde edilen kalibrasyon eğrisi

SERS sinyalleri altın nanopartiküllerle ortamda reaksiyona giren protein derişim aralığına bağlı olarak doğrusal ilişki göstermiştir fakat yüksek derişimlerde doğrusallıktan sapmıştır. Bu sonuç protein-OPA reaksiyona girme oranı ve bu yapıyla konfigürasyon oluşturan nanopartikülün miktarı ile ilgili olduğunu göstermektedir. Ortamdaki altın nanoçubuk miktarı belli bir miktarda protein-OPA yapısından SERS sinyali alınmasına izin vermektedir.

Yöntemin Gerçek Örneklerle Uygulanması

Geliştirilen yöntem gerçek süt örneklerine uygulanarak test edilmiştir. Gerçekleştirilen analizde her beş süt örneği için elde edilen spektrumlarda elde edilen C-S gerilmesi bandının sahip olduğu şiddet değerleri saptanmış ve daha önce elde edilen kalibrasyon grafiği kullanılarak gerçek örneklerde nanopartikül tabanlı toplam protein miktarı hesaplanmıştır. Çizelge 4.1 farklı ticari inek sütünde

belirlenen toplam protein miktarlarını göstermektedir. İnek sütü ortalama % 3.0 – 3.5 oranında protein içermektedir.

Çizelge 6.1: Süt örneklerinde nanopartikül tabanlı OPA yöntemiyle elde edilen toplam protein miktarı tayini sonuçları

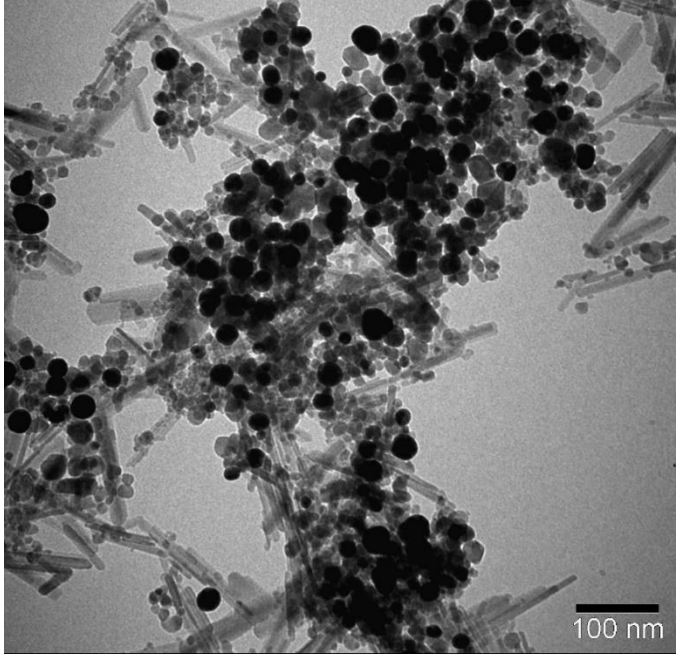
Gerçek Örnek No	SERS Sinyali	Bağıl SERS Sinyali	% Toplam Protein Miktarı
1	10593.8	2800.8	3.34
2	10227.7	2434.7	2.45
3	10403.0	2610.0	2.88
4	10514.6	2721.6	3.15
5	10440.4	2647.4	2.97

4.2. Klik Kimyası Temelli Yönteminin Bulguları

4.2.1. Altın nanopartiküllerin karakterizasyonu

Yüksek saçılma verimi ve dar hat özelliği partikül plasmon özelliğine dayanan optik uygulamalarda metal nanopartiküller önem kazanmaktadır. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) düzlemsel olmayan optik uygulamalara bir örnektir. Partikülün çevresindeki elektromanyetik alanın artmasıyla SERS verimi artmaktadır. Ayrıca altın yüzeyinde gerçekleştirilen modifikasyonlarla biyolojik örneklerde işaretli SERS ölçümleri yapılabilir. Tez çalışmasının ikinci bölümünde homojen analiz sisteminde klik kimyasını gerçekleştirilmek üzere altın nanoküreler sentezlenmiş ve daha sonra azid ile modifiye edilmiştir.

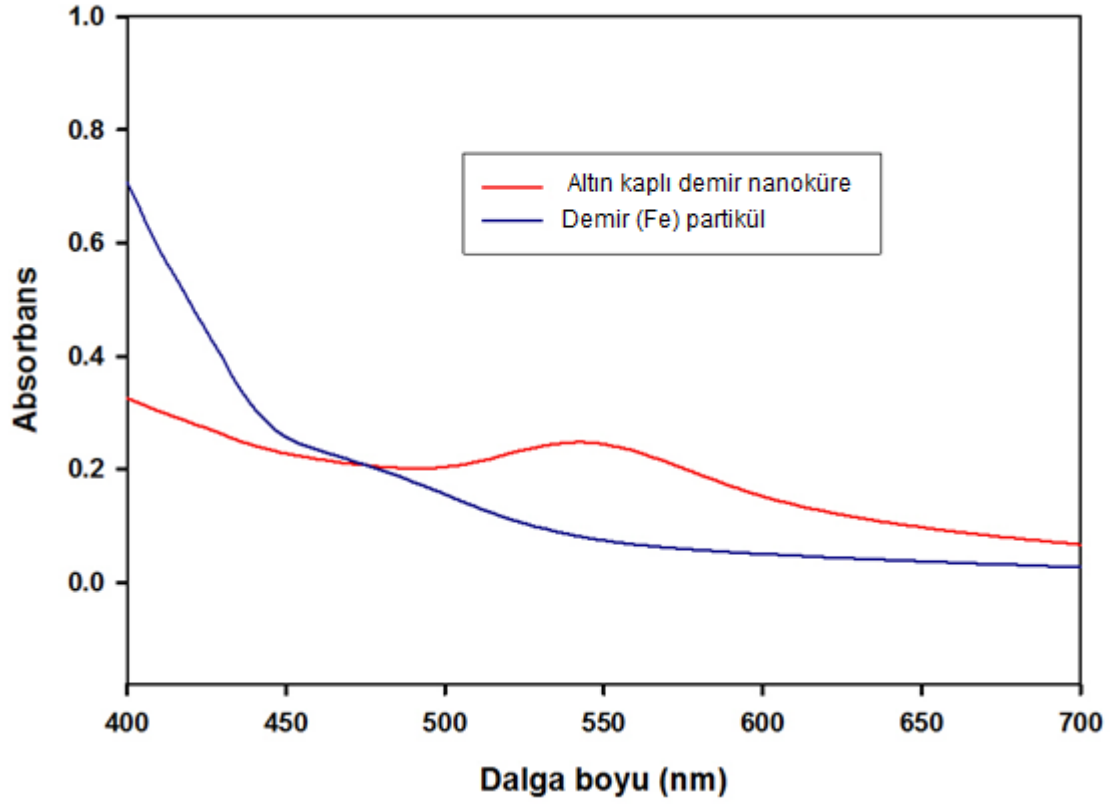
Resim 4.2’de Fe_3O_4 demir nanopartikülleri üzerine altın tabakası kaplanmış nanopartiküllerin TEM görüntüleri bulunmaktadır. Manyetik özelliklerinden dolayı partiküller topaklanmış bir görünüm sergilememektedir.



Resim 4.2. Altın kaplı Fe_3O_4 partiküllerin TEM fotoğrafı

TEM görüntülerinden kimyasal olarak sentezlenen Fe_3O_4 – Au partiküllerin küresel şekilde ve 10 – 35 nm aralığında farklı çaplarda olduğu görülmektedir. Altının elektron yoğunluğu ve demir elementine göre daha fazladır. Bu durum TEM görüntülerinde altın ile kaplanan demir kürelerin koyu siyah renk vermesine sebep olmaktadır.

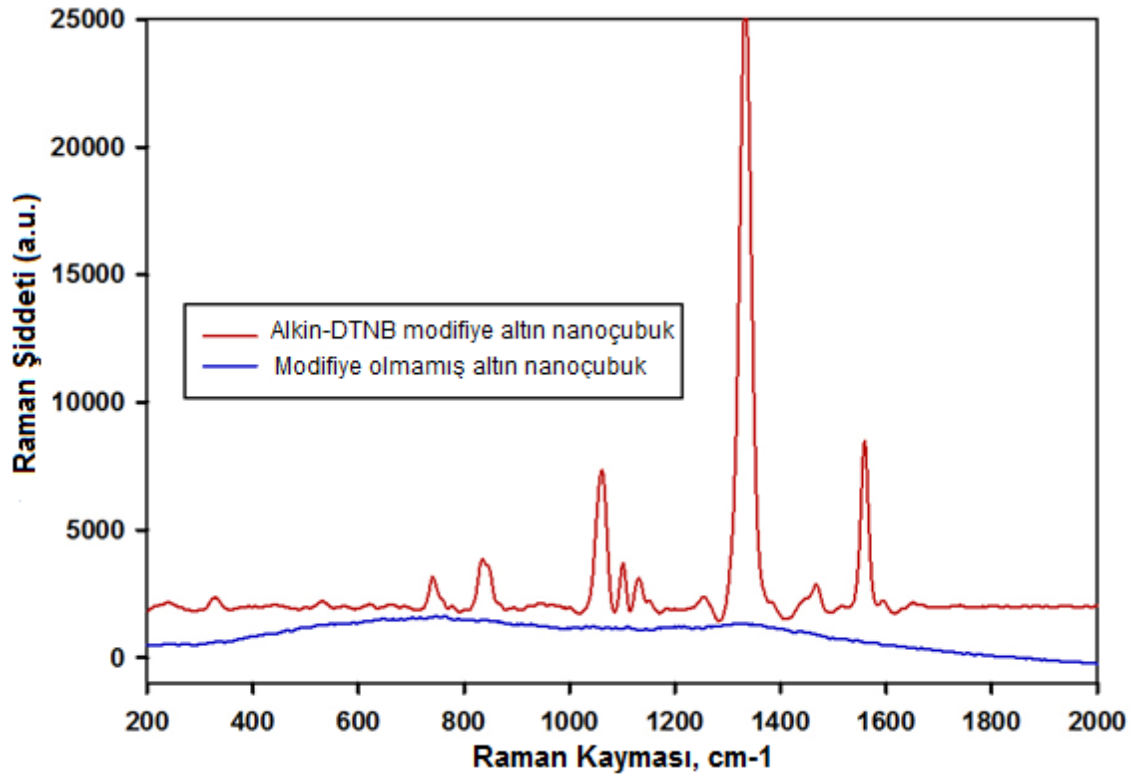
Altın veya gümüş nanopartiküller elektromanyetik radyasyonla girdiklerinde nanopartiküllerin ışığı absorblama ve saçma özelliği artmaktadır. Soy metallerin iletkenlik bandındaki elektronların toplam osilasyon hareketi sonucu oluşan elektrik alanı bu özelliğe sebep olmaktadır. Altın nanopartiküllerin UV-VIS spektrumları incelendiğinde 530 nm’de görülen bant küresel altın nanopartiküllerin absorpsiyonundan kaynaklanmaktadır. Şekil 4.8’de 530 nm’de görülen absorpsiyon ile demir partiküllerin üzerine altın kaplandığı anlaşılmaktadır.



Şekil 4.8. Altın kaplı Fe_3O_4 partiküllerin UV-VIS spektrumu

4.2.2. Nanopartiküllerin modifikasyonu

Klik kimya reaksiyonu için gerekli olan alkin – DTNB ve SERS sinyali takibi için kullanılan DTNB üretilen altın nanoçubukların sentezlenen alkin – DTNB ile modifiyesi sonucu yapıya kazandırılmıştır. Şekil 4.9’da modifiye altın nanoçubukların modifiye edilmemiş altın nanoçubuklarla karşılaştırılmalı SERS spektrumu verilmiştir.

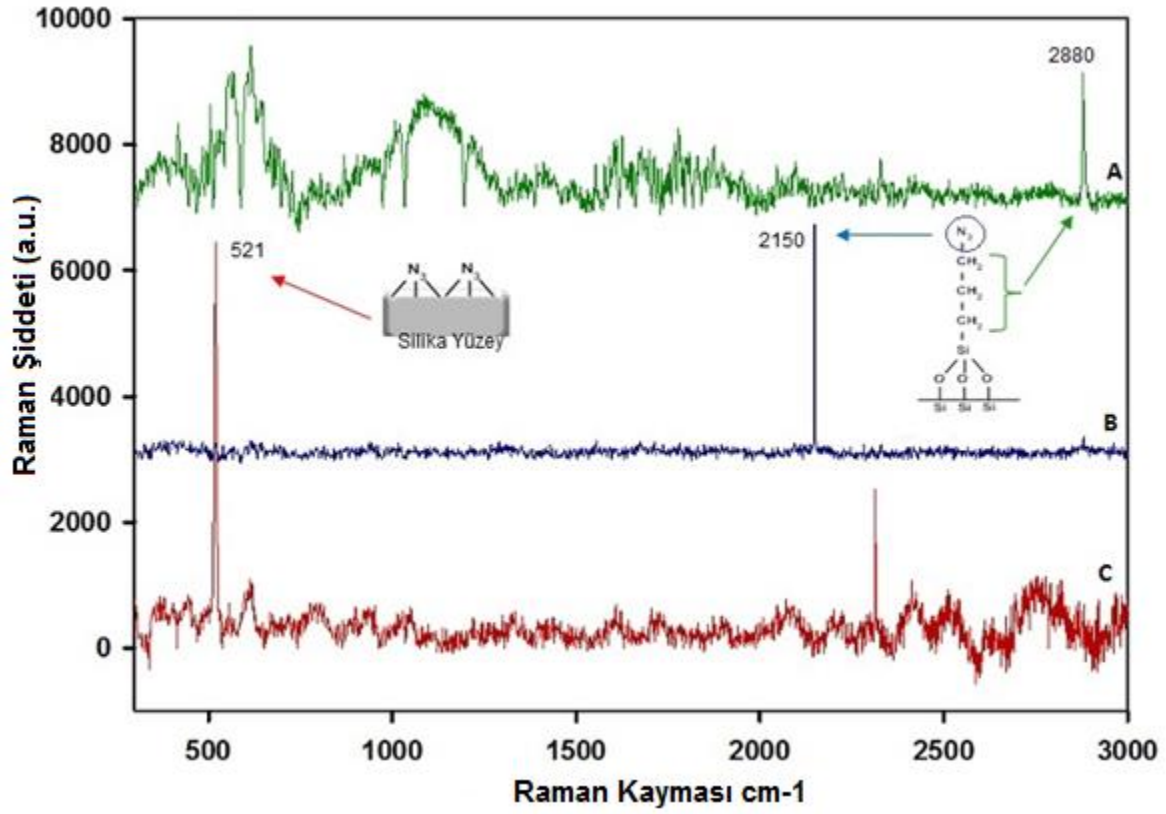


Şekil 4.9. Alkin – DTNB ile modifiye altın nanoçubukların SERS spektrumu

Modifiye altın nanoçubukların SERS spektrumu incelendiğinde 1330 cm^{-1} de gözlenen DTNB molekülünün en spesifik bandı –NO gerilmesi yapıya alkin-DTNB'nin kazandırıldığını doğrulamaktadır.

4.2.3. SERS substratları modifikasyon ve karakterizasyon

Klik kimyası temelli toplam protein tayininde heterojen sistem için azid modifiye edilen silika yüzeyler fiber optik Raman spektroskopisi cihazında 70 lazer enerji seviyesi ve 5 saniye süreyle prob yardımıyla karakterize edilmiştir. Yüzeyler üzerine 3 μL gümüş nanopartikül çözeltisi damlatılmış ve Şekil 4.10'daki SERS spektrumu elde edilmiştir.



Şekil 4.10. Azid modifiye edilmiş silika yüzeylerin SERS spektrumu ve spektral bant gösterimi; azid grubu içeren silika yüzeyler (A-B), modifiye edilmemiş yüzey (C).

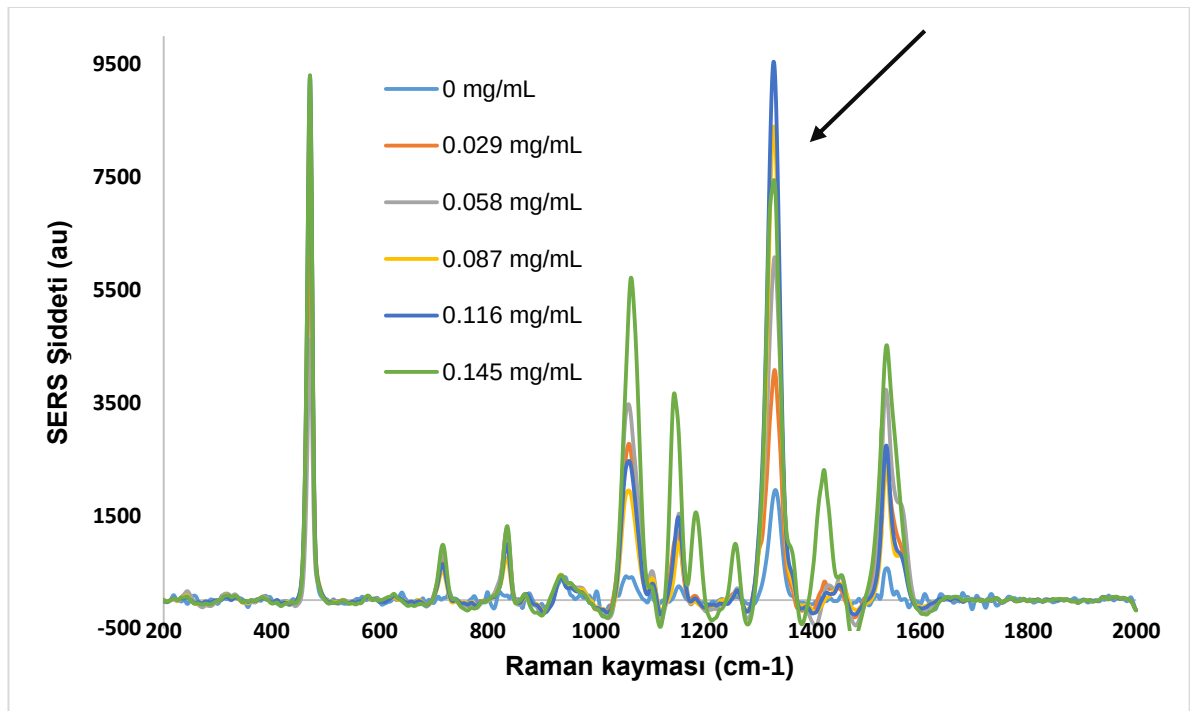
Şekil 4.10'da azid modifiye edilmiş silika yüzeylerden elde edilen üç spektrum incelendiğinde 2150 cm^{-1} de elde piklerin azid fonksiyonel gruplarına ait olduğu görülmüştür [66]. 521 cm^{-1} de gözlenen piklerin ise yüzey malzemesi silikaya ait olduğu belirlenmiştir [67]. Azid terminalleri yüzeye bağlayan C-H alkan bağları ise 2880 cm^{-1} bandında gözlenmiştir [68]. Elde edilen bu sonuçlarla silika yüzeylerin azid modifiyesi doğrulanmıştır.

4.2.4. Toplam protein miktarı belirleme çalışmaları

Nanopartikül yardımıyla toplam protein tayini çalışmasında klik kimyası yardımıyla bir heterojen sistem ve iki homojen sistemde ölçüm yapılmıştır. Her yöntemde öncelikle protein standart çözeltileriyle kalibrasyon doğrusu elde edilip kalibrasyon grafiği elde edilmiş ve daha sonra gerçek örneklerde deneme yapılmıştır.

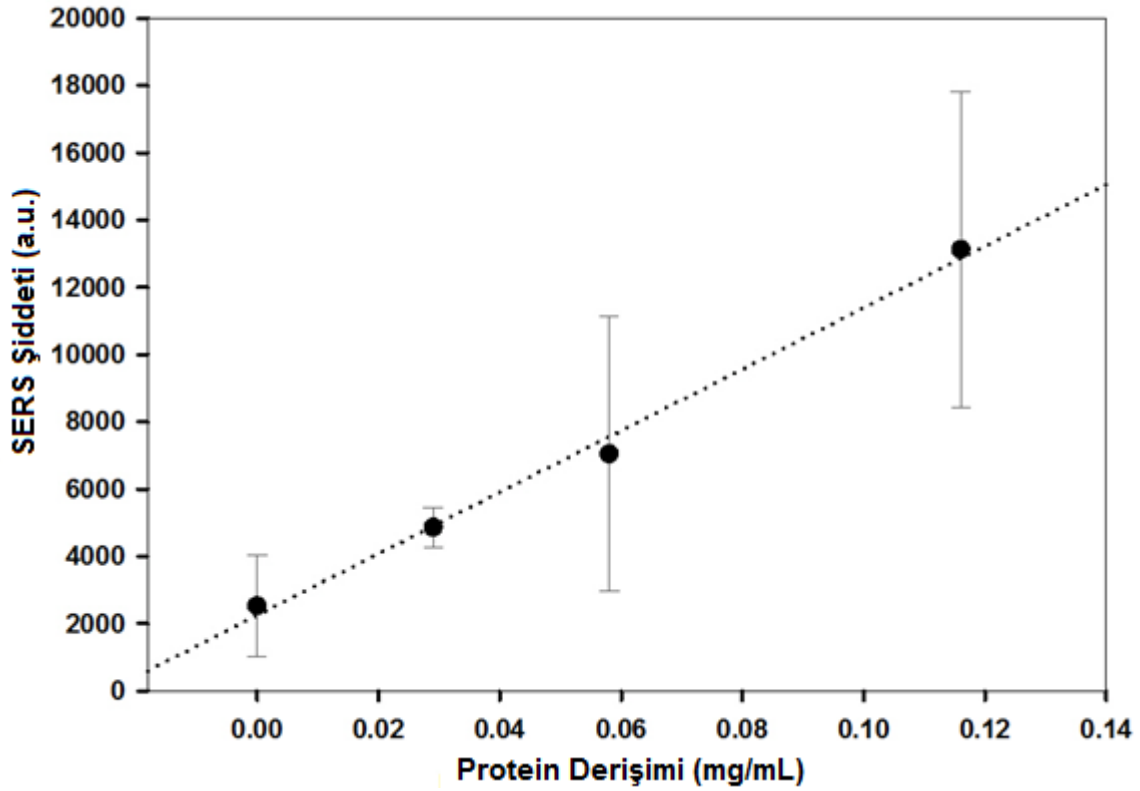
Heterojen sistemde toplam protein tayini

Klik kimyası yardımıyla toplam protein etkileşimini gerçekleştirmek için heterojen sistemde azid modifiye silika yüzeyler ile 600 μL alkin-DTNB ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk çözeltisi, 500 μL protein standardı (BSA) ve 600 μL biüret reaktif çözeltisi etkileşime bırakıldı. Protein stok çözeltisi olarak kullanılan BSA'dan 0.0 mg/mL – 0.145 mg/mL aralığında 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu çözeltisi ile hazırlanan dilüsyonlardan elde edilen SERS spektrumları şekil 4.11'de verilmiştir.



Şekil 4.11. Klik kimyası temelli toplam protein tayininde heterojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu

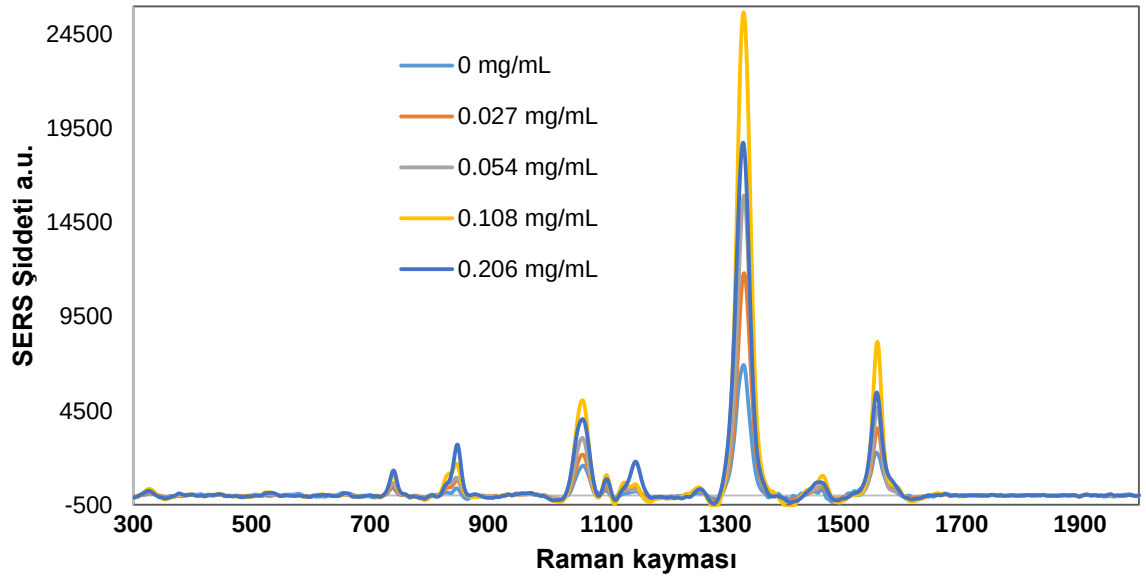
Alkin – DTNB modifiye altın nanoçubuk ve azid modifiye silika yüzey arasında gerçekleşen klik kimyası sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB molekülünün protein derişimine karşılık elde edilen 1330 cm^{-1} band şiddetlerinin [69] değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiği şekil 4.12.'te görülmektedir. Grafikler reaksiyona giren 0.0 – 0.145 mg/mL protein derişimleri için hazırlanmış ve 0.0 mg/mL – 0.116 mg/mL protein derişim aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği ($R^2 = 0.9926$) elde edilmiştir.



Şekil 4.12. Klık kimyasıyla toplam protein tayini amacıyla heterojen sistemde farklı protein derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiğı ($R^2=0.9934$, $y = 91595x + 2238.7$)

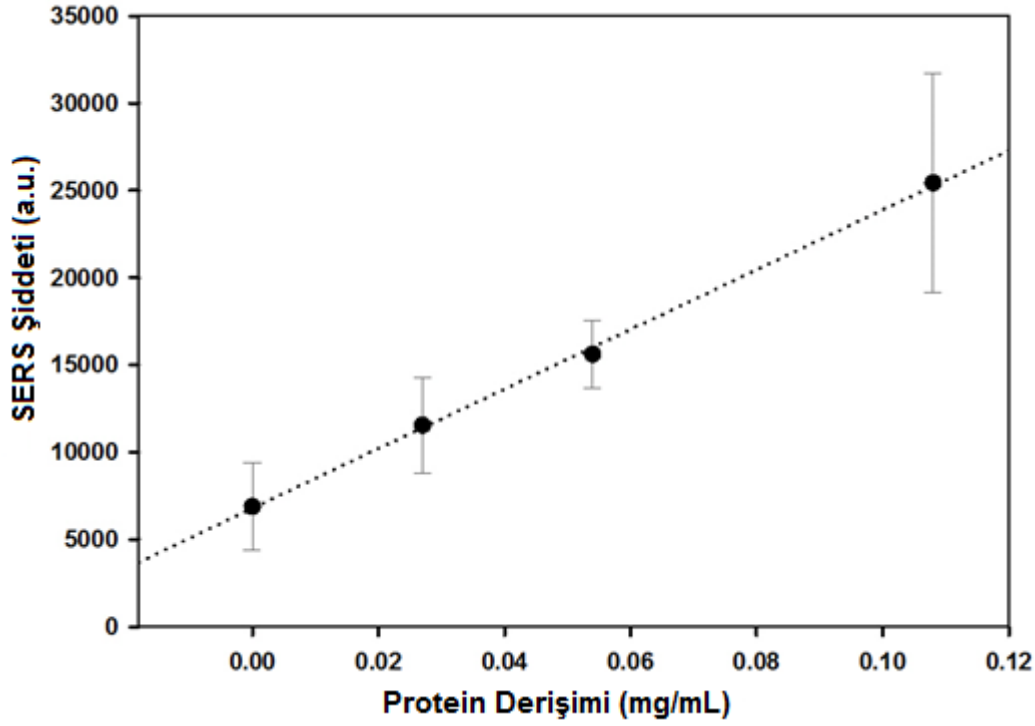
Homojen sistemde toplam protein tayini

Klık kimyası yardımıyla toplam protein etkileşimini gerçekleştirmek için homojen sistemde azid modifiye altın nanopartiküller ve silika nanopartiküller kullanılmıştır. Bu amaçla 650 μL alkin-DTNB ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk çözeltisi, 500 μL protein standardı (BSA), 650 μL azid modifiye nanoküre çözeltisi ve 500 μL biüret reaktif çözeltisi sırasıyla karıştırılmıştır. Protein stok çözeltisi olarak kullanılan BSA'dan 0.0 mg/mL – 0.206 mg/mL aralığında 0.1 M pH'sı 7.4 olan fosfat tamponu çözeltisi ile hazırlanan dilüsyonlardan elde edilen SERS spektrumları şekil 4.13'de verilmiştir.



Şekil 4.13. Klık kimyası temelli toplam protein tayininde homojen sistemde (silika nanoküre) farklı protein derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu

Alkin – DTNB modifiye altın nanoçubuk ve azid modifiye silika nanoküreler arasında kimyası sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB molekülünün protein derişimine karşılık elde edilen 1330 cm⁻¹ band şiddetlerinin değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı şekil 4.14'te görölmektedir. Grafikler reaksiyona giren 0.0 – 0.206 mg/mL protein derişimleri için hazırlanmış ve 0.0 mg/mL – 0.108 mg/mL protein derişim aralığında doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2 = 0.9996$) elde edilmiştir.



Şekil 4.14. Klık kimyasıyla toplam protein tayininde homojen sistemde modifiye silika nanokürelerle farklı protein derişimlerinde elde edilen kalibrasyon doğrusu ($R^2=0.9988$, $y = 171138x + 6778.2$)

Yöntemin gerçek örneklere uygulanması

Klık kimyası yardımıyla toplam protein etkileşimini gerçekleştirmek için heterojen sistemde azid modifiye silika yüzeyler ile 600 μ L alkin-DTNB ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk çözeltisi, 500 μ L seyreltilmiş süt örneği ve 600 μ L biüret reaktif çözeltisi etkileşime bırakıldı. Homojen sistemde ise 650 μ L alkin-DTNB ile modifiye edilmiş altın nanoçubuk çözeltisi, 500 μ L seyreltilmiş süt örneği 650 μ L azid modifiye nanoküre çözeltisi ve 500 μ L biüret reaktif çözeltisi sırasıyla karıştırılmıştır. Reaksiyonlar sonucu yapılan SERS ölçümleri ile elde edilen sinyal değerleri kalibrasyon doğru denklemi yardımıyla değerlendirilmiş ve çizelge 6.2’de verilmiştir.

Heterojen sistemde gerçek örneklerle elde edilen sinyaller şiddetleri 1232.3, 982 ve 1193 şeklindedir ve doğrusal derişim aralığının altında kalmıştır ve bu sebeple farklı ticari süt örneklerinde toplam protein tayini belirlenememiştir.

Çizelge 6.2. Farklı süt örneklerinde nanopartikül tabanlı klik kimyası yöntemiyle homojen sistemde elde edilen toplam protein miktarı tayini sonuçları

Seyreltme Oranı	Ortalama SERS Sinyali	% Toplam Protein Miktarı
10 kat	8763 ± 2004.9	0.53 ± 0.54
100 kat	11691 ± 1287.3	13.2 ± 3.8

Homojen sistemde yapılan denemelerde gerçek süt örneklerine uygulanan seyreltme işlemini takiben ultrasantrifüj yapılmıştır. Bu işlemler sonucu ölçüm yapılmış ve elde edilen sonuçlar sütteki toplam protein miktarıyla (%3.0-3.5) benzer bulunmamıştır.

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nanopartikül tabanlı toplam protein tayini geliştirmek amacıyla çalışmanın ilk bölümünde OPA molekülü kullanılmıştır. Tespit edilen toplam protein miktarını maksimum seviyede tutmak için OPA miktarı, ME miktarı ve pH değeri optimize edilerek en iyi sonucu veren değerler analiz yönteminde kullanılmıştır. Geliştirilen yöntem kapsamında öncelikle ME ile tamamlanmış OPA reaktif çözeltisi hazırlanmış ve protein ile etkileştikten sonra SERS ölçümleri için optimize edilmiş miktarda altın nanoçubuk çözeltisi eklenmiştir. Tamamlanmış OPA çözeltisi ile etkileşmiş proteinin oluşturduğu yapıdaki grup pikleri nanopartikül varlığında incelenebilmiştir ve artan protein derişimine paralel bu piklerdeki artış yardımıyla kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Doğrusal bölge 0.054-0.720 mg/mL aralığında belirlenmiş ve gözlenebilme sınırı 0.07 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen analiz yönteminin gerçek süt örneklerinde kullanılabilirliği test edilmiş ve literatürde verilen değerlere benzerlik gösterdiği saptanmıştır. SERS yardımıyla OPA ile gerçekleştirilen analiz yöntemi gerçek örneklerde hızlı, güvenilir ve hassas bir şekilde yapılabileceğini göstermiştir. İleriki çalışmalarda yöntemin hassasiyetinin artırılması ve diğer gerçek örneklerde etkin çalışması hedeflenmektedir.

Çalışmanın ikinci bölümünde ise toplam protein miktar tayinini gerçekleştirmek üzere klik kimyası temel alınmıştır. Geliştirilen yöntemde ortamda var olan protein biuret reaktifinden gelen Cu^{+2} yi Cu^{+1} e indirgediğinde alkin terminal taşıyan DTNB etiketli nanoçubuklar azid modifiye edilmiş nanopartikül ya da yüzey ile reaksiyona girmektedir. SERS yardımıyla reaksiyon takibi yapılarak protein derişimine paralel DTNB'deki sinyal artışı yardımıyla kalibrasyon doğruları çizilmiştir. Azid modifiye olarak yüzeyin kullanıldığı heterojen sistemde doğrusal bölge 0.029-0.116 mg/mL aralığında belirlenmiş ve gözlenebilme sınırı 0.090 mg/mL olarak hesaplanmıştır. Azid terminal olarak nanopartiküllerin kullanıldığı homojen sistemde ise doğrusal bölge 0.027-0.108 mg/mL aralığında belirlenmiş olup gözlenebilme sınırı 0.040 mg/mL'dir. Gerçek örnek denemelerinde klik kimyası temelli geliştirilen bu yöntemler sadece seyreltme işlemi ile denendiğinde, elde edilen sonuçlar kalibrasyon doğrusu aralığına girememiştir ve gerçek örnek miktarı belirlenememiştir. Bu durum en açık olarak heterojen sistem denemelerinde gözlenmiştir. Seyreltme işleminin yanısıra ultrasantrifüj işlemi yapıldığında sonuçlar tutarlılık göstermemiştir. Bu durum

homojen sistemde ise elde edilen toplam protein miktarlarından anlaşılmaktadır. Planlanan çalışmalarda yöntemin daha verimli ve gerçek numunelerde etkili olabilmesi koşullarının araştırılması hedeflenmektedir.

Geliştirilen bu yeni iki yöntemin geleneksel yöntemlerle karşılaştırılmasına ilişkin tablo Ek-1’de verilmiştir.

KAYNAKLAR

1. Johnson, B. C. and Swanson, A. M. (1952). Milk serum proteins. I. A quantitative biuret test for milk serum proteins. *Journal of Dairy Science*, 35(10), 6.
2. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1), 265-275.
3. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. and Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem*, 150(1), 76-85.
4. Myers, A. B. (1997). Resonance Raman intensity analysis of excited state dynamics. *Accounts of Chemical Research*, 30(12), 519-527.
5. Sasic, S. (2008). *Pharmaceutical applications of Raman spectroscopy*. London, Wiley
6. Kiran, M. S., Itoh, T., Yoshida, K. I., Kawashima, N., Biju, V. and Ishikawa, M. (2010). Selective detection of hba1c using surface enhanced resonance Raman spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 82(4), 1342-1348.
7. KahRaman, M., Sur, I. and Culha, M. (2010). Label-free detection of proteins from self-assembled protein-silver nanoparticle structures using surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 82(18), 7596-7602.
8. Han, X. X., Jia, H. Y., Wang, Y. F., Lu, Z. C., Wang, C. X., Xu, W. Q., Zhao, B. and Ozaki, Y. (2008). Analytical technique for label-free multi-protein detection-based on western blot and surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 80(8), 2799-2804.
9. McGoverin, C. M., Clark, A. S. S., Holroyd, S. E. and Gordon, K. C. (2010). Raman spectroscopic quantification of milk powder constituents. *Analytica Chimica Acta*, 673(1), 26-32.
10. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72, 248-254.
11. Han, X. X., Chen, L., Guo, J., Zhao, B. and Ozaki, Y. (2010). Coomassie brilliant dyes as surface-enhanced Raman scattering probes for protein-ligand recognitions. *Analytical Chemistry*, 82(10), 4102-4106.
12. Chen, L., Park, Y., Seo, H., Hong, W., Jung, Y. M. and Zhao, B. (2011). Zincon as resonance Raman probe for quantitative evaluation of proteins. *Journal of Raman Spectroscopy*, 42(11), 1963-1966.
13. Benson, J. R. and Hare, P. E. (1975). O-phthalaldehyde: Fluorogenic detection of primary amines in the picomole range. Comparison with fluorescamine and ninhydrin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(2), 619-622.

14. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. and Sharpless, K. B. (2002). A stepwise Huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, 41(14), 2596-2599.
15. Bylund, G. (1995). Dairy processing handbook. T. AB. *The chemistry of milk* Lund, Sweden, TetraPak Processing Systems AB. 21.
16. Saldamlı, I. (2005). *Gıda kimyası*. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları
17. Tripaldi, C., Martillotti, F. and Terramoccia, S. (1998). Content of taurine and other free amino acids in milk of goats bred in Italy. *Small Ruminant Research*, 30(2), 127-136.
18. Frau, M., Massanet, J., Rossello, C., Simal, S. and Canellas, J. (1997). Evolution of free amino acid content during ripening of Mahon cheese. *Food Chemistry*, 60(4), 651-657.
19. Miller, G. D., Jarvis, K. J. and McBean, L. D. (2000). Handbook of dairy foods and nutrition. R. G. Jensen and M. Kroger. *The importance of milk and milk products in the diet*. New York, CRC Press. 4-24.
20. Stoscheck, C. M. (1990). General methods for handling proteins and enzymes: Quantitation of protein. M. P. Deutscher. *Methods in enzymology: Guide to protein purification* New York, Academic Press. 4-24.
21. Dumas, J. B. A. (1831). Procédés de l'analyse organique. *Annales des Chimie et des Physique*, 247, 198-213.
22. Helrich, K. (1990). *Official methods of analysis of the association of analytical chemists*. Arlington, Association of official Analytical Chemists Inc.
23. Egli, H. (2008). Kjeldahl guide. *Introduction* Switzerland, Büchi Labortechnik AG. 12.
24. Molnar, M. (1948). The availability of the biuret reaction in the determination of protein. *Magyar Kem. Lapja*, (3), 428-430.
25. Gornall, A. G., Bardawill, C. J. and David, M. M. (1949). Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*, 177(2), 751-766.
26. Keppy, N. K. and Allen, M. W. (2009). Application notes. *The biuret method for the determination of total protein using an evolution array 8-position cell changer*, Thermo Fisher Scientific. 1.
27. (2010). Thermo scientific pierce protein assay technical handbook. *Modified lowry protein assay* United States, Thermo Fisher Scientific Inc., 15-30.
28. Yıldız, A., Genç, Ö. and Bektaş, S. (1997). *Enstrümental analiz yöntemleri*. Ankara, Hacettepe Üniversitesi Yayınları
29. Perkins, J. R. (2007). *Raman spectroscopy – in situ characterization of growth and surface processes*. PhD, North Carolina State University.
30. Smith, E. and Dent, G. (2005). *Introduction, basic theory and principles in modern Raman spectroscopy: A practical approach*. Chichester, Wiley, 1-20
31. Moldenhauer, J. and Yvon, P. (2005). *Journal of environmental monitoring: A comprehensive handbook*. River Grove, 249-260

32. Temür, E. (2010). *Bakteri tayini için nanopartikül tabanlı sensör geliştirilmesi*. MSc, Gazi University.
33. Efrima, S. and Zeiri, L. (2009). Understanding sers of bacteria. *Journal of Raman Spectroscopy*, 40(3), 277-288.
34. Skoog, D. A., Holler, F. J. and Nieman, T. A. (1998). Enstrümental Analiz İlkeleri. E. Kılıç, F. Köseoğlu and H. Yılmaz. *Raman spektroskopisi* Ankara, Bilim Yayıncılık. 441.
35. Champion, A. and Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chemical Society Reviews*, 27(4), 241-250.
36. <http://archive.nrc-cnrc.gc.ca/eng/projects/ibd/Raman-spectroscopy.html>.
37. LiChan, E. C. Y. (1996). The applications of Raman spectroscopy in food science. *Trends in Food Science & Technology*, 7(11), 361-370.
38. Braun, G., Lee, S. J., Dante, M., Nguyen, T. Q., Moskovits, M. and Reich, N. (2007). Surface-enhanced Raman spectroscopy for DNA detection by nanoparticle assembly onto smooth metal films. *Journal of the American Chemical Society*, 129(20), 6378-+.
39. Yazgan, N. N., Boyaci, I. H., Temur, E., Tamer, U. and Topcu, A. (2010). A high sensitive assay platform based on surface-enhanced Raman scattering for quantification of protease activity. *Talanta*, 82(2), 631-639.
40. Moskovits, M. (1985). Surface-enhanced spectroscopy. *Reviews of Modern Physics*, 57(3), 783-826.
41. Han, X. X., Huang, G. G., Zhao, B. and Ozaki, Y. (2009). Label-free highly sensitive detection of proteins in aqueous solutions using surface-enhanced Raman scattering. *Analytical Chemistry*, 81(9), 3329-3333.
42. Yue, Z. C., Zhuang, F. F., Kumar, R., Wong, I., Cronin, S. B. and Liu, Y. H. (2009). Cell kinase activity assay based on surface enhanced Raman spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 73(2), 226-230.
43. Gellner, M., Kustner, B. and Schlucker, S. (2009). Optical properties and sers efficiency of tunable gold/silver nanoshells. *Vibrational Spectroscopy*, 50(1), 43-47.
44. Guven, B., Basaran-Akgul, N., Temur, E., Tamer, U. and Boyaci, I. H. (2011). Sers-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for escherichia coli enumeration. *Analyst*, 136(4), 740-748.
45. Porter, M. D., Lipert, R. J., Siperko, L. M., Wang, G. and Narayanana, R. (2008). Sers as a bioassay platform: Fundamentals, design, and applications. *Chemical Society Reviews*, 37(5), 1001-1011.
46. Zheng, J. W., Zhou, Q., Zhou, Y. G., Lu, T. H., Cotton, T. M. and Chumanov, G. (2002). Surface-enhanced resonance Raman spectroscopic study of yeast iso-1-cytochrome c and its mutant. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 530(1-2), 75-81.
47. Yguerabide, J. and Yguerabide, E. E. (1998). Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications - i. Theory. *Anal Biochem*, 262(2), 137-156.

48. Perrault, S. D. and Chan, W. C. W. (2009). Synthesis and surface modification of highly monodispersed, spherical gold nanoparticles of 50-200 nm. *Journal of the American Chemical Society*, 131(47), 17042-+.
49. Mitamura, K. and Imae, T. (2009). Functionalization of gold nanorods toward their applications. *Plasmonics*, 4(1), 23-30.
50. Sau, T. K. and Murphy, C. J. (2004). Seeded high yield synthesis of short au nanorods in aqueous solution. *Langmuir*, 20(15), 6414-6420.
51. Gültekin, A. (2009). *Sentetik reseptörlere dayalı nano algılama sistemleri*. PhD, Trakya University.
52. Kolb, H. C., Finn, M. G. and Sharpless, K. B. (2001). Click chemistry: Diverse chemical function from a few good reactions. *Angewandte Chemie-International Edition*, 40(11), 2004-+.
53. Wu, P. and Fokin, V. V. (2007). Catalytic azide-alkyne cycloaddition: Reactivity and applications. *Aldrichimica Acta*, 40(1), 7-17.
54. Huisgen, R. (1989). Kinetics and reaction mechanisms: Selected examples from the experience of forty years. *Pure and Applied Chemistry*, 61, 613.
55. Ergin, M. (2008). *Thermally curable polystyrene via click chemistry*. MSc, Istanbul Technical University.
56. Gacal, B. (2011). *Complex macromolecular and electro-/photo-active structures by click chemistry*. PhD, Istanbul Technical University.
57. Krivopalov, V. P. and Shkurko, O. P. (2005). 1,2,3-triazole and its derivatives. Development of methods for the formation of the triazole ring. *Uspekhi Khimii*, 74(4), 369-410.
58. Manetsch, R., Krasinski, A., Radic, Z., Raushel, J., Taylor, P., Sharpless, K. B. and Kolb, H. C. (2004). In situ click chemistry: Enzyme inhibitors made to their own specifications. *Journal of the American Chemical Society*, 126(40), 12809-12818.
59. Speers, A. E., Adam, G. C. and Cravatt, B. F. (2003). Activity-based protein profiling in vivo using a copper(i)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), 4686-4687.
60. Zhu, K., Zhang, Y., He, S., Chen, W., Shen, J., Wang, Z. and Jiang, X. (2012). Quantification of proteins by functionalized gold nanoparticles using click chemistry. *Analytical Chemistry*, 84(10), 4267-4270.
61. Gündoğdu, Y. (2009). *Manyetik ve optik özelliklere sahip nanopartikül sentezi ve analitik kimya uygulamaları*. MSc, Gazi University.
62. Li, Q., Zhang, L., Bai, L., Zhang, Z., Zhu, J., Zhou, N., Cheng, Z. and Zhu, X. (2011). Multistimuli-responsive hybrid nanoparticles with magnetic core and thermoresponsive fluorescence-labeled shell via surface-initiated raft polymerization. *Soft Matter*, 7(15), 6958.

63. Jana, N. R., Gearheart, L. and Murphy, C. J. (2001). Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template. *Advanced Materials*, 13(18), 1389-1393.
64. Stuart, B. (2004). *Infrared spectroscopy: Fundamentals and applications*, John Wiley & Sons, Ltd
65. Kudelski, A. (2003). Chemisorption of 2-mercaptoethanol on silver, copper, and gold: Direct Raman evidence of acid-induced changes in adsorption/desorption equilibria. *Langmuir*, 19(9), 3805-3813.
66. Wu, T., Zhang, Q., Hu, J., Zhang, G. and Liu, S. (2012). Composite silica nanospheres covalently anchored with gold nanoparticles at the outer periphery of thermoresponsive polymer brushes. *Journal of Materials Chemistry*, 22(11), 5155.
67. Khorasaninejad, M., Walia, J. and Saini, S. S. (2012). Enhanced first-order Raman scattering from arrays of vertical silicon nanowires. *Nanotechnology*, 23(27), 275706.
68. <http://orgchem.colorado.edu/Spectroscopy/specttutor/irchart.html>.
69. Tamer, U., Boyaci, I. H., Temur, E., Zengin, A., Dincer, I. and Elerman, Y. (2011). Fabrication of magnetic gold nanorod particles for immunomagnetic separation and sensing application. *Journal of Nanoparticle Research*, 13(8), 3167-3176.

EKLER

EK-1. Nanopartikül varlığında Klık Kimyası (NP Klık) (homojen sistem) ve OPA (NP OPA) yardımıyla geliştirilen yöntemlerin geleneksel yöntemlerle karşılaştırılması.

	Kjeldahl	Biuret	Lowry	BCA	OPA	Bradford	NP Kilk	NP OPA
Prensip	Azot miktarı	Şelat oluşturma	Şelat oluşum	Şelat oluşum	Sentez	Boyacı	Kilk Kimyası	Sentez
Teknik	Titrasyon	UV-VIS Spektrofotometre	UV-VIS Spektrofotometre	UV-VIS Spek.	Floresans Spek.	UV-VIS Spek.	Raman S.	Raman S.
Duyarlılık	-	1-10 mg/mL	0.5 – 1.5 mg/mL	~ Lowry	0.01 - 0.5 mg/mL	0.05 – 1.4 mg/mL	0.03-0.12 mg/mL	0.05 – 0.72 mg/mL
Girişim	Tahsis azot kaynağı	Tris tampon, amonyak, indirgen şeker	Tampon tuzları, serbest tiyol grupları	EDTA	-	Tampon tuzları	~Biuret	-

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : ERYILMAZ, Merve
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 01/10/1988, Malatya
Medeni hali : Bekar
Telefon : 0 (312) 202 31 07
Faks: : 0 (312) 202 31 07
e-posta: : merve.eryilmaz@gazi.edu.tr



Eğitim Derecesi	Okul/Program	Mezuniyet Yılı
Yüksek lisans	Gazi Üni./Eczacılık Fak. Analitik Kimya ABD	Devam ediyor.
Lisans	AİBÜ/Gıda Mühendisliği	2010
Lise	Aydınlıkevler Lisesi/YDA,Fen Bilimleri	2006

İş Deneyimi,Yıl	Çalıştığı Yer	Görev
2011- devam ediyor	Gazi Üniversitesi	Arş.Grv.

Yabancı Dili

İngilizce (TOEFL IBT 83, IELTS AC 6.5)
Almanca

Yayınlar

1. Gupta, V. K., Atar, N., Yola, M., Eryilmaz, M., Torul, H., Tamer, U., Boyaci, I.H., Ustundag, Z. (2013). A novel glucose biosensor platform based on Ag@AuNPs modified graphene oxide nanocomposite and SERS application, **Journal of Colloid and Interface Science**, 406, 231-237

Hobiler

Seyahat etmek, Pilates



GAZİ GELECEKTİR...