İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNLERİN YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASIYLA TAYİNİ İÇİN YENİ YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Mehmet KAHRAMAN

Anabilim Dalı : Kimya

Programı : Kimya

KASIM 2011

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

PROTEİNLERİN YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASIYLA TAYİNİ İÇİN YENİ YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ
Mehmet KAHRAMAN
(509072207)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 07 Ekim 2011
Tezin Savunulduğu Tarih : 29 Kasım 2011

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Süleyman AKMAN (İTÜ)
Eş Danışman : Prof. Dr. Mustafa ÇULHA (YÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Birsen DEMİRATA ÖZTÜRK (İTÜ)
Prof. Dr. Mustafa ÜRGEN (İTÜ)
Prof. Dr. Naz Zeynep ATAY (BÜ)
Doç. Dr. Mustafa ÖZCAN (İTÜ)
Doç. Dr. Nilgün TOKMAN (TÜBİTAK UME)

KASIM 2011

Eşim Sevgi ve Kızım Defne'ye,

ÖNSÖZ

Tez çalışmam esnasında bana yol gösteren ve kıymetli fikirlerini benden esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Mustafa Çulha'ya,
Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgilerinden ve yardımlarından faydalandığım, sayın danışmanım Prof. Dr. Süleyman Akman'a,
Deneysel çalışmaların yürütüldüğü Yeditepe Üniversitesi'nin sağlamış olduğu olanaklardan Yeditepe Üniversitesi Mütevelli Heyeti'ne ve mali destekten dolayı İstanbul Teknik Üniversitesi'ne,
Tez dönemim boyunca deneylerimde katkısı bulunan çalışma arkadaşlarım, İlknur Sur'a ve Sercan Keskin'e,
Tez yazımı ve tez teslim aşamalarında yardımlarını benden esirgemeyen arkadaşım Aslı Baysal'a,
Öğrencilik hayatım boyunca, desteklerini benden esirgemeyen değerli aileme,
Bana hayatıma girdiğinden beri destek ve motivasyon veren sevgili eşim Sevgi Kahraman'a,
Ailemize katılan canım kızım Defne Kahraman'a,
Bana ve bu teze ufacıkta olsa emeği geçen herkese en içten teşekkürlerimi sunarım.

Kasım 2011

Mehmet KAHRAMAN
Kimyager

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ..... **v**
İÇİNDEKİLER ..... **vii**
KISALTMALAR ..... **ix**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **xi**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xiii**
SEMBOL LİSTESİ ..... **xvii**
ÖZET ..... **xix**
SUMMARY ..... **xxi**
1. GİRİŞ **1**
2. TEORİK BİLGİLER **7**
2.1 Spektroskopi 7
2.2 Raman Saçılması 8
2.1.1 Raman spektroskopinin teorisi 9
2.1.2 Raman ve Rayleigh saçılmasının dalga modeli 11
2.1.3 Raman ve IR karşılaştırma 12
2.3 Raman Cihazı 14
2.3.1 Işın kaynakları 15
2.3.2 Örnek ışınlama sistemi 17
2.3.3 Raman spektrometreleri 18
2.4 Plazmonik 20
2.4.1 Plazmonik nanoyapıların sentezlenmezi ve hazırlanması 28
2.5. Nanoyapıların Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler 30
2.6 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS) 31
2.7 Zetasizer Cihazı 36
2.7.1 Büyüklük teorisi 36
2.7.2 Moleküler ağırlık teorisi 38
2.7.3 Zeta potansiyel teorisi 39
2.7.4 Zeta potansiyel ve büyüklük dağılımına sıcaklık etkisi 41
2.8 Proteinler 42
3. MATERYALLER ve YÖNTEMLER **49**
3.1 Kullanılan Kimyasallar 49
3.2 Kullanılan Cihazlar 49
3.3 AgNPlerin Sentezlenmesi ve Karakterize Edilmesi 50
3.4 Pozitif Yüklü NPlerin Sentezlenmesi ve Karakterize Edilmesi 52
3.5 Protein Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi 55
3.6 Hazırlanan AgNPlerin Deriştirilmesi 57
3.7 Basit Karıştırma Yöntemi Karışımının Hazırlanması 57
3.8 İletim Derleme Yöntemi Karışımının Hazırlanması 57
3.9 Protein Karışımlarının Tayini İçin Karışımların Hazırlanması 58
3.10 Protein Karışımlarının Tayininde Sıcaklığın Etkisi 58

3.11 Biyolojik Moleküller Varlığında Protein Karışımlarının Tayini 59
3.12 YZRS Ölçümleri 59
3.13 Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümleri 59
3.14 TEM Ölçümleri 59
3.15 SEM Ölçümleri 60
3.16 AFM Ölçümleri 60
3.17 SPSS Yazılım Programı 60
4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA 61
4.1 Basit Karıştırma Yöntemi ile Proteinlerin Tayini 62
4.2 İletim Derleme Yöntemi ile Proteinlerin Tayini 67
4.3 İletim Derleme Yöntemi ile Protein Karışımlarının Tayini 81
4.4 Protein Karışımlarının Tayininde Sıcaklığın Etkisi 87
4.5 Biyolojik Moleküller Varlığında Protein Karışımlarının Tayini 94
4.6 Tartışma 96
KAYNAKLAR 101
ÖZGEÇMİŞ 129

KISALTMALAR

PAGE : Poliakrilamit Jel Elektroforez **(**Polyacrylamide Gel Electrophoresis)
HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromotagrafi **(**High Performance Liquid Chromatography)
CE : Kapiler Elektroforez (Capillary Electrophoresis)
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans **(**Nuclear Magnetic Resonance)
IR : İnfrared
YZRS : Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması/Spektroskopisi
NIR : Yakın İnfrared (Near-Infrared)
N.A : Numerical Aparture
SPs : Yüzey Plazmonları (Surface Plasmons)
SERS : Surface-Enhanced Raman Scattering/Spectroscopy
SPR : Yüzey Plazmon Rezonans (Surface Plasmon Resonance)
LSPR : Lokalize Olmuş Yüzey Plazmon Rezonans (Localized Surface Plasmon Resonance)
SPP : Yüzey Plazmon Polariton (Surface Plasmon Polaritons)
TEM : Geçirimli Elektron Mikroskopu (Transmission Electron Microscopy)
HRTEM : Yüksek Çözünürlüklü Geçirimli Elektron Mikroskopu (High-Resolution Transmission Electron Microscope)
EBL : Elektron Işın Litografi (Electron Beam Lithograpy)
FIBL : Odaklanmış İyon Işın Litografidir (Focused Ion Beam Lithograpy)
XRD : X-Işınları Kırınımı (X-Ray Diffraction)
EDX : Enerji Dispersif X-Işınları (Energy-Dispersive X-ray)
XPS : X-Işınları Fotoelektron Spektroskopi (X-Ray Photoelectron Spectroscopy)
SEM : Taramalı Elektron Mikroskopu (Scanning Electron Microscope)
AFM : Atomik Güç Mikroskopu (Atomic Force Microscope)
STM : Taramalı Tünelleme Mikroskopu (Scanning Tunneling Microscope)
DDA : Discrete Dipole Approximation
FDTD : Finite-Difference Time-Domain
DLS : Dinamik Işık Saçılması (Dynamic Light Scattering)
SLS : Statik Işık Saçılması (Static Light Scattering)
AgNP : Gümüş Nanoparçacık
PAH : Poli (Allilamin Hidroklorür)
MA : Moleküler Ağırlık
pI : İzoelektrik Nokta
BSA : Sığır Serum Albumin (Bovine Serum Albumin)
Hb : Hemoglobin
Ig A : İmmunoglobulin A
Mb : Miyoglobin
HSA : İnsan Serum Albumin (Human Serum Albumin)
nm : Nanometre

mm	**:** Milimetre
cm	**:** Santimetre
m	**:** Metre
mg	**:** Miligram
µg	**:** Mikrogram
mL	**:** Mililitre
µL	**:** Mikrolitre
s	**:** Saniye
mV	**:** Milivolt
mW	**:** Miliwatt
kV	**:** Kilovolt
Hz	**:** Hertz

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 2.1 : Elektomanyetik ışına dayanan yaygın spektroskopik yöntemler. 7
Çizelge 2.2 : Raman ve IR spektroskopisinin karşılaştırılması. 14
Çizelge 2.3 : Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları. 15
Çizelge 2.4 : Lazerlerin dalga boyuna bağlı olarak uygulama alanları. 16
Çizelge 2.5 : Kullanılan lazerin dalga boyuna ve objektife bağlı olarak lazerin çapının değişimi. 18
Çizelge 2.6 : Nanomalzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan teknikler. 30
Çizelge 3.1 : Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri. 56
Çizelge 3.2 : AgNP ve AgNP-protein karışımlarının pH değişimleri. 56
Çizelge 4.1 : Artan protein derişimine bağlı olarak hesaplanan ortalama yüzey pürüzlükleri 72
Çizelge 4.2 : Proteinlerden elde edilen YRZS spektrumlarının pik değerlendirmeleri. 80
Çizelge 4.3 : Proteinlerin erime/denatürasyon sıcaklıkları. 89

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Raman etkisinin şematik gösterimi [22]..... 8
Şekil 2.2 : Rayleigh ve Raman saçılmalarını gösteren Jablonski enerji diyagramı [21]..... 9
Şekil 2.3 : 488 nm lazer ile uyarılan CCl_4'ün Raman spektrumu [24]..... 10
Şekil 2.4 : Raman ve IR spektrumlarının karşılaştırılması [21]..... 12
Şekil 2.5 : CO_2'nin Raman ve IR aktivitelerinin karşılaştırılması [21]..... 13
Şekil 2.6 : Raman spektrometrenin şematik gösterimi [25]..... 15
Şekil 2.7 : Antrasen'in Raman spektrumu A: Klasik cihaz, 514,5 nm uyarımı, B: FT cihazı, 1064 nm lazer ile uyarımı [28]..... 17
Şekil 2.8 : Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı [28]..... 19
Şekil 2.9 : Bir CCD bulunan çok kanallı dispersif Raman spektrometre. BP, girişim bant-geçirimli filtre, BR, Rayleigh bant-reddeden filtre [29]..... 20
Şekil 2.10 : Metal yüzey üzerinde yayılan yüzey plazmonlarının (A) ve metal nanoküre etrafında lokalize olmuş (yayılmayan) yüzey plazmonlarının (B) şematik gösterimi [44]..... 21
Şekil 2.11 : NPlerin şekline, cinsine ve büyüklüğüne bağlı olarak ışığı saçma özellikleri [60]..... 22
Şekil 2.12 : Kanserli hücreler spesifik antikor ile modifiye edilmiş Au nanokürelerin ve nanoçubukların normal ve kanserli hücreler ile muamele edildikten sonra alınan karanlık-alan mikroskop görüntüleri [62]..... 23
Şekil 2.13 : Laktoz modifiye AgNPler ile 24 saat inkube edilen A549 kanser hücresinin lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü..... 24
Şekil 2.14 : Au nanoküre (a-e) ve Au nanoçubukların (f-j) artan parçacık büyüklüğüne ve görünüş oranına göre fotoğrafları ve geçirimli elektron mikroskop (TEM) görüntüleri. Altın nanoküreler 4-40 nm arasında iken nanoçubukların görünüş oranı 1,3-5 arasındadır [77]..... 25
Şekil 2.15 : Farklı büyüklerdeki AuNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumları (sol) ve bazı büyüklüklerinin TEM görüntüleri (sağ) [78]..... 26
Şekil 2.16 : Au nanoçubuk için tipik bir yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu [78]..... 26
Şekil 2.17 : Farklı görünüş oranlarına sahip Au nanoçubukların absorpsiyon spektrumları (sol) ve 2,4; 3,9 ve 5,6 görünüş oranına sahip Au nanoçubukların TEM görüntüleri (sağ) [78]..... 27
Şekil 2.18 : Metal tuzlarından kimyasal indirgeme yöntemi ile metalik NP hazırlanmasının şematik gösterimi..... 29
Şekil 2.19 : İki NP arasındaki tek bir molekülün şematik gösterimi [283]..... 32
Şekil 2.20 : Toplanmamış (alt) ve toplanmış (üst) AuNPlere tutunmuş crystal violet boyasının Stokes ve Anti-Stokes YZRS spektrumları [269]..... 33
Şekil 2.21 : Kolloidal AgNPler (A), AgNPler kullanılarak oluşturulan iki (B) ve üç (C) boyutlu nanoyapılar..... 34

Şekil 2.22 : Farklı şekillerdeki AgNPlerin uyarılma verimleri (a), küre (b), küp (c) ve piramit AgNPlerin etrafında oluşan yüzey plazmonlarının simulasyonu. Küre, küp ve pramit NPler için hesaplalan $|E|^2$ değerleri sırasıyla 54, 745 ve 9770'dir [45]. 35
Şekil 2.23 : Zamana bağlı olarak saçılan ışık şiddetin dağılımı [353]. 37
Şekil 2.24 : Düşük (sol) ve yüksek (sağ) iyonik şiddetli ortamlardaki parçacıkların hidrodinamik çaplarındaki değişimlerin şematik gösterimi [353]..... 38
Şekil 2.25 : Parçacık üzerinde oluşan tabakaların şematik gösterimi [353]. 39
Şekil 2.26 : Zeta potansiyelinin pH'ya bağlı olarak değişimi [353]. 41
Şekil 2.27 : Sıcaklıkla proteinin denatürasyonu sonucu büyüklük değişiminin şematik gösterimi [354]. 41
Şekil 2.28 : Ovalbüminin PBS içerisindeki sıcaklıkla denatürasyon eğrisi. 71 °C proteinin denatürasyon sıcaklığı olarak tayin edilmiştir [354]. 42
Şekil 2.29 : Amino asitin kimyasal yapısı. 42
Şekil 2.30 : Polipeptit oluşumunun şematik gösterimi. 43
Şekil 2.31 : Proteinlerin yapıları [355]. 44
Şekil 2.32 : Çizgisel ve yuvarlak protein yapıları. 45
Şekil 2.33 : Proteinin pH'ya bağlı olarak yük değişim grafiği [353]. 46
Şekil 3.1 : Sitrat indirgenmesiyle hazırlanan AgNPlerin TEM görüntüsü. 50
Şekil 3.2 : Sitrat indirgenmesiyle hazırlanan AgNPlerin büyüklük dağılım grafiği. . 51
Şekil 3.3 : AgNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu. 52
Şekil 3.4 : AgNPlerin pozitif yüklü polimer PAH ile kaplanmasının şematik gösterimi. 52
Şekil 3.5 : PAH ile modifiye edilen AgNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu. 53
Şekil 3.6 : Yüzey modifikasyonundan sonra çaptaki büyümenin şematik gösterimi. 54
Şekil 3.7 : AgNPler ve AgNP-PAH büyüklük dağılımları. 54
Şekil 3.8 : AgNPlerin (yeşil) ve AgNP-PAH (kırmızı) zeta potansiyel dağılımları. . 55
Şekil 3.9 : Bazı proteinlerin ve AgNPlerin büyüklük dağılım grafiği. 55
Şekil 3.10 : İletim derleme yönteminde kullanılacak cihazın fotoğrafı. 58
Şekil 4.1 : BSA ve lizozim'den alınan YZRS spektrumları. 63
Şekil 4.2 : AgNP-lizozim karışımının farklı protein derişimlerdeki SEM görüntüleri. 64
Şekil 4.3 : AgNP-BSA karışımının farklı protein derişimlerdeki SEM görüntüleri. . 64
Şekil 4.4 : AgNP-BSA, katalaz ve pepsin proteinlerinin (50 µg/mL) SEM görüntüleri. 65
Şekil 4.5 : AgNP-sitokrom c karışımının 10 farklı noktasından alınan YZRS spektrumları. 66
Şekil 4.6 : Derişime bağlı olarak sitokrom c proteininin YZRS spektrumları. 66
Şekil 4.7 : İletim derleme yönteminin şematik gösterimi ve oluşan yapının fotoğrafı. 67
Şekil 4.8 : Farklı derişimlerdeki BSA ve lizozim proteinleri ile hazırlanan yapıların fotoğrafları**.** 67
Şekil 4.9 : BSA (A) ve lizozim (B) proteinlerinin azalan protein derişimi ile hazırlanan yapıların 50X objektif ile alınan ışık mikroskop görüntüleri. 68
Şekil 4.10 : BSA (A) ve lizozim (B) proteinlerinin farklı derişimleri kullanılarak hazırlanan AgNP-protein yapılarının SEM görüntüleri. 69
Şekil 4.11 : AgNPler (A) ve 0,5 µg/mL BSA (B) ve katalaz (C) ile hazırlanan AgNP-protein yapılarının AFM görüntüleri ve çizgi analizleri. 70

Şekil 4.12 : 50 µg/mL BSA (A) ve katalaz (B) ile hazırlanan AgNP-protein yapılarının AFM görüntüleri ve çizgi analizleri 71
Şekil 4.13 : 5 µg/mL katalaz derişimi ile hazırlanan yapının çizgi yüzey pürüzlülüğü analizi. 72
Şekil 4.14 : 5X (A) ve 50X (B) objektif ile alınan ışık mikoskop görüntüleri. 73
Şekil 4.15 : AgNP-BSA karışımı (50 µg/mL) ile hazırlanan yüzeylerin X ekseni (A) ve Y (B) ekseni boyunca her bir bölgeden alınan 5 spektrumun ortalama YZRS spektrumları 74
Şekil 4.16 : AgNP-sikotrom c (50 µg/mL) karışımı ile hazırlanan yüzeylerin X ekseni boyunca her bir bölgeden alınan 5 spektrumun ortalama YZRS spektrumları (A) ve bir bölgeden rastgele alınan 10 YZRS spektrumları (B). 75
Şekil 4.17 : Aynı AgNPler kullanılarak farklı zamanlarda AgNP-insulin karışımı ile hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları. 76
Şekil 4.18 : Farklı zamanlarda sentezlenmiş AgNPler kullanılarak AgNP hemoglobin karışımı ile hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları. 76
Şekil 4.19 : Azalan derişime bağlı olarak proteinlerin YZRS spektrumları. 78
Şekil 4.20 : BSA ve lizozim derişimlerine bağlı olarak alınan YZRS şiddetlerinin eğrileri. 79
Şekil 4.21 : İletim derleme yöntemi ile cam yüzey üzerine hazırlanan AgNP-Hb ve AgNP-avidin yüzeylerinin fotoğrafları ve ışık mikroskop görüntüleri. . 81
Şekil 4.22 : Çalışmada kullanılan her bir proteinin YZRS spektrumu. 82
Şekil 4.23 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanmış sitokrom c-avidin (A) ve İg A-Hb (B) ikili protein karışımlarının oluşturdukları yapıların fotoğrafları ve bölünmüş alanları. 82
Şekil 4.24 : Ig A, Hb ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları. 83
Şekil 4.25 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği. 84
Şekil 4.26 : Avidin, sitokrom c ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları. 85
Şekil 4.27 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği. 85
Şekil 4.28 : HSA, avidin ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları. 86
Şekil 4.29 : İg A, HSA, sitokrom c ve üçlü protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları. 87
Şekil 4.30 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği 87
Şekil 4.31 : Proteinlerin sıcaklıkla denatürasyon profilleri. 88
Şekil 4.32 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-sitokrom c, AgNP-Hb ve AgNP-avidin yapılardan farklı sıcaklıklarda alınan YZRS spektrumları. 90
Şekil 4.33 : Proteinlerin farklı sıcaklıklardaki YZRS spektrumlarından üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği. 91

Şekil 4.34 : Farklı sıcaklıklarda protein karışımı ile hazırlanan AgNP-protein yüzeyinden alınan YZRS spektrumları. 92
Şekil 4.35 : Farklı sıcaklıklarda alınan karışım ve karışım içerisindeki proteinlerden alınan YRZS spektrumları ile elde edilen iki boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği. 93
Şekil 4.36 : Glikoz ve laktoz moleküllerinden alınan YZRS spektrumları. 94
Şekil 4.37 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-sitokrom c ve AgNP-sitokrom c-glikoz yüzeylerden alınan YZRS spektrumları. 95
Şekil 4.38 : AgNP-avidin-HSA-glikoz ve AgNP-insulin-sitkrom c-glikoz karışımları kullanılarak hazırlanan yüzeylerin farklı bölgelerinden alınan YZRS spektrumları ile elde edilen iki boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği. 96

SEMBOL LİSTESİ

Å	: Angstrom
μ	: Mikro
	: Dalga sayısı
Δ	: Dalga sayısındaki değişim
λ	: Dalga boyu
E	: Enerji
M	: Dipol moment
d(H)	: Hidrodinamik çap
k	: Boltzmann sabiti
T	: Sıcaklık
η	: Viskozite
D	: Çevrimsel difüzyon katsayısı
1/K	: Debye uzunluğu
A_2	: İkinci viral katsayısı
U_E	: Elektroforetik hareketlilik
Z	: Zeta potansiyel
E	: Dielektrik sabiti
f(ka)	: Henrry fonksiyonu
°C	: Santigrat derece
%	: Yüzde

YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASIYLA PROTEİNLERİN TAYİNİ İÇİN YENİ YÖNTEMLERİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılması (YZRS) biyolojik ve biyolojik olmayan moleküllerin ve yapıların tayini için kullanılan güçlü bir tekniktir. Özellikle su molekülünün zayıf Raman saçıcısı olmasından dolayı biyolojik moleküllerin ve yapıların karakterizasyonu için daha uygundur. Proteinlerin hızlı, hassas ve doğru tayini sadece klinik uygulamarda değil aynı zamanda endüstriyel uygulamalarda da önemlidir. Bu çalışmada, YZRS'ye dayalı proteinlerin tayini için yeni yöntemlerin geliştirilmesi araştırıldı. Öncelikle proteinlerin ve gümüş nanoparçacıkların (AgNPler) basit karıştırılması, örnek hazırlama yöntemi olarak değerlendirildi. Basit karıştırma yöntemi ile sadece pozitif yüklü proteinler 5 µg/mL derişimine kadar tayin edilebilmesine rağmen elde edilen YZRS spektrumların tekrarlanabilirliği tanı ve tayin için kabul edilebilir değildir. İkinci yaklaşım olarak, doğru tanı ve tayini sağlamak ve tekrarlanabilir YZRS spektrumları elde etmek için iletim derleme yöntemi, proteinlerin ve AgNPlerin toplanmaları kontol etmek için kullanıldı. İletim derleme yöntemi ile AgNP-protein karışımları cam yüzey üzerine biriktirildi ve oluşan yüzeylerden YZRS spektrumları alındı. Spektrumlar incelendiginde bu amaç için tekrarlanabilirliğin oldukça yüksek olduğu saptandı. Proteinlerin büyüklüğüne ve yüküne bağlı olmaksızın tayin sınırı 0,5 µg/mL'ye kadar kolaylıkla başarıldı. Bu değer literatürde rapor edilen tayin sınırından en az on kat daha düşüktür. Ayrıca, iletim derleme yöntemi ile protein karışımlarının ayrılması ve YZRS ile tayini araştırıldı. Bu amaç için aynı yüklü, farklı büyüklükte ve zıt yüklü, aynı büyüklükte proteinler AgNPler ile karıştırıldı. Protein-AgNPler karışımı iletim derleme yöntemi kullanarak cam yüzey üzerine biriktirildi. Hazırlanan yüzey beş eşit bölgeye ayrıldı ve ayrılan herbir bölgeden YZRS spektrumları alındı. Deney sonuçları aynı yüke sahip protein karışımının iletim derleme yöntemi ile kısmen ayrılabileceğini ve YZRS ile işaretleyici kullanmadan tayin edilebileceğini göstermektedir. Sıcaklığın spektrum kalitesine ve sinyal zenginliği üzerini etksi de araştırıldı. Proteinler tek tek ve karışımlar halinde AgNPler ile cam yüzeye depozit edildi ve hazırlanan yüzeylerden farklı sıcaklıklarda YZRS spektrumları alındı. Sonuçlar zıt yüklü protein karışımlarının YZRS ile ayrılması için sıcaklığın kullanılabileceğini göstermektedir. Son olarak, iletim derleme yöntemi sırasında biyolojik moleküllerin zıt yüklü protein karışımlarını ayırma etkinliği araştırıldı. Biyolojik molekülün varlığının ayırmaya yardımının olmadığı saptandı.

DEVELOPMENT OF A NOVEL PROTEIN DETECTION METHOD BASED ON SURFACE-ENHANCED RAMAN SCATTERING

SUMMARY

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a powerful technique for the detection of non-biological molecules, and biological molecules and structures. Since water is a weak Raman scatterer, it is even more suitable for the characterization of biological molecules and structure. The fast, sensitive and accurate detection of proteins have significance in not only clinical but also industrial applications. In this study, the development of a novel detection method for protein detection based on the surface-enhanced Raman scattering is investigated. First, a simple mixing of proteins and colloidal silver nanoparticles (AgNPs) is evaluated as a sample preparation method. Although the only positively charged proteins could be detected with a detection limit of 5 μg/mL with the simple mixing, the reproducibility of the SERS spectra is not acceptable for detection and identification. As a second approach, convective assembly method is used to control aggregation of proteins and AgNPs to obtain reproducible SERS spectra and achieve a healthy detection and identification. The mixture of AgNPs and proteins is deposited on the glass slide with the method and SERS spectra are obtained from the prepared surfaces. When the obtained SERS spectra are examined, the reproducibility of the SERS spectra is satisfactory for comparision. A detection limit down to 0.5 μg/mL regardless of the proteins' charge status and size is easily achieved. The minimum improvement in detection limit is more than 1 order of magnitude compared to the previously reported detection limits using the technique. Next, separation of protein mixtures with the convective assembly method and detection with the SERS have been investigated. For this purpose, different size of proteins with same charge and same size with different charge of protein are mixed with the AgNPs. The mixture of Protein-AgNPs is deposited on the glass slide using convective assembly process. The prepared surface is divided into five equal regions and SERS spectra are obtained from the each divided region. The experimental results demonstrate that the protein mixture having same charge can differencially be separated with the convective assembly method and detected with SERS without a label. The influence of temperature is also investigated on the spectral quality and signal enhancement. Each protein and protein mixtures are deposited on a glass slide with AgNPs and SERS spectra are obtained from the prepared surfaces at different temperatures. The results show that, the temperature could be used for the separation of oppositely charge proteins mixture with SERS. Finally, the influence of other biological molecules on the separation efficiency of oppositely charged proteins during convective assembly process is investigated. It is found that the presence of a biological molecule during the process does not help.

1. GİRİŞ

İçinde bulunduğumuz proteomiks çağında proteinlerin yapılarının ve işlevlerinin aydınlatılması yanında, diğer makro moleküller ve ilaç molekülleri ile etkileşiminin araştırılması son derece önemlidir. Ayrıca içinde bulundukları kompleks karışımlardan ayrılması veya ayrıştırıldıktan sonra tanı ve tayinlerinin yapılması hem klinik hem de endüstriyel manada büyük önem arz etmektedir. Proteinlerin tanı ve tayini klinik uygulamalarda hastalıkların belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca enzim olarak görev yapan proteinler ilaç sanayinde, gıda, temizlik ürünlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

Proteomiks çalışmalar yapısal ve fonksiyonel olarak iki gruba ayrılmaktadır. Geleneksel yöntemlerde proteinlerin tanısı ve tayini proteinlerin bir kromotografik yöntem ile (İki boyutlu poliakrilamit jel elektroforez (2D PAGE), yüksek performanslı sıvı kromotografi (HPLC) veya kapiler elektroforez (CE)) ayrılması ve saflaştırılmasından sonra enzimle parçalanıp kütle spektroskopi (MS) ile incelenmesinden oluşur. Kütlede alınan parmak izi spektrumlar, biyoinformatik kullanılarak proteinlerin dizilimi ve 3 boyutlu yapısı tahmin edilir. X-ışınları kristalografi ve nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopi de proteinlerin yapısının belirlenmesinde kullanılırlar [1]. Ayrıca proteinlerin küçük moleküller ile etkileşimleri de birçok biyolojik özellik için önem arz etmektedir. Bu etkileşimler kemiluminesans ve floreasans bazlı metotlar kullanılmaktadır [2].

Geleneksel tekniklerin yanında titreşimsel spektroskopi (İnfrared (IR) ve Raman) teknikleri de proteinlerin tanı ve tayininde kullanabileceği rapor edilmiştir. IR ve Raman spektroskopi teknikleri moleküllerin kimyasal yapısı hakkında bilgi vermesinden dolayı biyolojik moleküllerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır. Bu iki yöntem birbirinin tamamlayıcısı olan tekniklerdir. Ancak IR spektroskopi suyun girişimi nedeniyle biyolojik moleküllerin tanısında sıkıntılar yaratmaktadır. Raman spektroskopi ise sudan çok az etkilenir ve gaz, sıvı ve katı örnekler kolayca analiz edilebilir. Örnek hazırlamanın çok kısa olması ve sulu örneklerin incelenebilir olması bu tekniği biyolojik moleküllerin tanı ve tayininde kullanılmasının önünü açmıştır.

Fakat bu tekniğin iki dezavantajı vardır. Birincisi düşük dalga boylu lazerler kullanıldığında saçılma ile birlikte floresans spektrumunun da alınabilmesidir. İkincisi ise Raman saçılmasının zayıf olmasıdır. Bunun dışında elektronca fakir olan moleküler yapıları polarize (kutuplaşma) etmek için düşük dalga boylarında ışıma yapan lazerler kullanılmalıdır. Amino asitlerin ve oluşturdukları yapıların polarizasyonu için bu bölgedeki yüksek enerjili lazer ışınları yapıların parçalanmasına neden olmaktadır. İlk dezavantaj düşük enerjili uzun dalga boylu lazerler kullanılarak elimine edilebilmektedir. Öte yandan soy metallerin nanoyapılı yüzeylerinde Raman saçılmasını zenginleştirmesinin keşfiyle Raman spektroskopisi yeni bir boyut kazanmıştır. Bu yeni teknik Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması/Spektroskopi (YZRS) olarak isimlendirilmiştir. Bu teknik ile de ikinci dezavantaj ortadan kaldırılmıştır. Raman saçılmasının zenginleşmesi molekül ve nanoparçacık arasındaki yük transferinin (Kimyasal zenginleştirme) ve metal yüzeyinde oluşan lokalize olmuş yüzey plazmonlarının (Elektromanyetik zenginleştirme) bir sonucu olduğu yaygın olarak kabul görmektedir [3]. Kimyasal zenginleştirme az bir etki yapmakta ve zenginleştirmeye katkı oranının molekülün kimyasal yapısıyla alakalı olduğu düşünülmektedir. Elektromanyetik zenginleştirmenin YZRS zenginleştirmesinde büyük bir katkıya sahip olduğu yönündeki bulgulardan sonra, son yıllardaki çalışmalar yüzey plazmonları üzerine yoğunlaşmıştır. Bu gelişmeler sonucunda çalışmalar YZRS'nin hassasiyetini optimize edebilmek için soy metal nanoyapıların plazmonik özelliklerinin optimum kullanılmasına yönelmişlertir [4].

YZRS tek moleküle kadar inebilen hassasiyeti ve sağladığı moleküler seviyedeki bilgi nedeniyle MS ve floresans teknikleri ile yarışmaktadır ve biyolojik sıvılardaki düşük derişimlerdeki çok çeşitli biyolojik moleküllerin tanısı ve tayini için umut vaat edici bir teknik olmuştur. Amino asitlerin [5,6], peptitlerin [7,8], proteinlerin [9], ve nükleik asitlerin YZRS'leri çalışılmıştır [10].

MS işaretleyici olmadan tanı sağlayan tek tekniktir ve molekülün kimyasal doğası hakkında detaylı bilgi verebilir. Ancak bu teknik analite zarar verir ve çok az miktarda olan numuneler için numunenin parçalanması dolayısıyla, numune kaybına sebep olabilir. YZRS tekniği kullanılarak tek molekül tayini yapılabileceği 1990'ların ortasında Ag kolloidal nanoparçacıkların oluşturdukları rastgele nanoparçacık yığınları kullanılarak gösterilmiştir [11,12]. Bu çalışmalarda Raman

saçılmasındaki zenginleşmesinin 10^{14}'e kadar çıkabileceği ve bu zenginleştirme faktörü ile de tek bir molekül tayin edilebileceği ortaya atılmıştır. Bilindiği üzere moleküle zarar vermeden tek bir molekül tanısı yapabilecek tek teknik floresandır ve floresansda molekülün kimyasal yapısı hakkında çok az bilgi vermektedir. Ayrıca her molekül floresans yaymamakta, bu nedenle analit, floresans yapan bir molekül ile işaretlenerek uygulama yapılmaktadır. YZRS bir molekülün parmak izini sağladığından dolayı, ilgilenilen molekülü işaretleyici olmadan tanımlayabilir. Ayrıca floresans tekniği kullanarak çoklu analiz (birden fazla molekülü aynı örnek içerisinde tayin etmek) tayin yapmak, emisyon bandının çok geniş olması nedeniyle oldukça zordur ve ölçüm sırasında ışığın etkisiyle tayini yapılacak molekülün parçalanması (fotobleaching) sorunları vardır [3]. Buna ilaveten her floresans yapan molekülün uyarılma dalga boyunun farklı olması nedeniyle her molekül için farklı dalga boyunda bir ışık kaynağı gerekmektedir. Oysa Raman saçılması ışık dalga boyundan bağımsızdır ve herhangi dalga boyundaki ışık kaynağı kullanılabilir. Güçlü bir ışık kaynağına ihtiyaç duyulması nedeniyle laserler bu amaç için yegane kaynak olarak kullanılmaktadır. Bu bağımsızlık YZRS deneylerinde kullanılan altın nanoparçacıklar (AuNPler) veya AgNPler boyutlarına bağlı olarak yüzey plazmonlarının uyarılma dalga boyu değişmesi nedeniyle nispeten kısıtlıdır, fakat YZRS deneyinde kullanılacak nanoparçacık türü ve boyutları kullanılacak laserin dalga boyuna göre ayarlanabilmektedir. Örneğin süspansiyon içerisindeki ortalama 13 nm büyüklüğündeki AuNPlerin maksimum absorpsiyon dalga boyu 520 nm iken, ortalama 50 nm boyutlarında olan AgNPlerinki ise 420 nm civarındadır. Ayrıca, yüzey plazmonlarının absorpsiyon dalga boyu şekline, büyüklüğüne ve yığıntı oluşturup oluşturmamasına bağlı olarak da değişmektedir. AgNPlerin oluşturduğu yığıntıların maksimum absorpsiyonu yakın IR (NIR) bölgesine kaymakta ve bu nedenle de bu bölgede ışıma yapan bir lazer kullanımı doğru seçim olacaktır. YZRS ölçümleri için bugüne kadar birçok yeni yaklaşım kullanarak yüzeyler hazırlanmış ve bunlardan bazılarının çok iyi performans gösterdiği rapor edilmiştir. Oysa AgNP yığınlarının performansı da yadsınamayacak seviyededir.

YZRS'ye dayalı protein tanı/tayini, izlenen yönteme bağlı olarak ikiye ayrılabilir. İlk grupta tanı veya tayin bir işaretleme molekülü kullanılarak yapılır. Bu yol genellikle immunoassay türü yaklaşımlarda kullanılmış ve floresans yerine YZRS kullanılmıştır denebilir [14,15]. İkinci yaklaşımda ise doğrudan proteinden gelen spektrum parmak

izi olarak tanıda ve tayinde kullanılır. Bu yaklaşımın başarılı olarak gerçekleşmesi durumunda amaca ulaşmak için herhangi bir aracı moleküle gerek kalmayacaktır. Stokrom c, AuNPler ve AgNPler ile yapılan bir çalışmada, sitokrom c'nin yapısal bir değişikliğe uğramadan Ag:Sc:Au sandeviç yapısı oluşturulmuştur [16]. Bu yapıyı oluşturmak için önce stokrom c AuNPler ile etkileştirilmiş sonra da AgNPler ile etkileştirilmiştir. Bu yaklaşımın protein yapısına zarar vermediği rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmada elde edilen YZRS spekturumlarının protein tayininde kullanılabileceği de öngörülmüştür. 2008 yılında rapor edilen benzer bir çalışmada küçük globular proteinlerin (~2 nm) ~20 nm boyutlarındaki AgNPler arasına sandeviçlenerek tayinlerinin yapılabileceği gösterilmiştir [17]. Bu çalışmada proteinin iki nanoparçacık arasında sandeviçlenmesinin nedeni iki AgNP yüzeyine oluşan yüzey plazmonlarının üst üste çakışarak protein molekülünün "sıcak nokta" olarak tarif edilen bölgede kalması ve Raman saçılmasının daha da zenginleşmesini sağlamaktır. Lizozim, ribonükleaz B, avidin, katalaz ve hemoglobinin sitrat indirgenmesiyle elde edilmiş AgNPler içerisine sodyum sülfat eklenmesiyle yığınlaştırmanın başlatılmasıyla tayinleri yapılmıştır [18]. Bir başka çalışmada ise Western blot ile ayrıştırması yapılan protein karışımı YZRS ile tayin edilmiştir [19]. Sözü geçen çalışmada miyoglobin (Mb) ve sığır serum albumini (BSA) model proteinlerinin karışımı jel elektroforez ile ayrıştırılmış, bu ayrıştırmadan sonra, jel üzerindeki ayrışmış noktalar bir nitro selüloz membrana transfer edilmiş ve transfer edilen noktalara Ag kolloidal süspansiyon ekleyerek YZRS ile tayinleri yapılmıştır.

Proteinlerin hassas, doğru ve hızlı tanı ve tayini hem klinik hem de endüstriyel anlamda çok büyük öneme sahiptir. Bu nedenle yeni yöntemlerin geliştirilmesi proteomiks çalışmalarına alternatif olacaktır. Bu çalışmadaki amaç, YZRS tekniği ile proteinlerin tanı/tayini için tekrarlanabilirliği yüksek ve tayin sınırı düşük yöntemler geliştirmektir. Bu yöntemler diğer biyolojik kökenli olanlara göre çok daha ucuz, hızlı ve çoklu analiz özelliği olan yöntemler olacaktır.

Bu çalışmada farklı yöntemler kullanarak hazırlanan örneklerden YZRS ile protein tayini için yeni yöntemler geliştirilmeye çalışıldı. Öncelikle basit karıştırma yöntemi ile örnekler hazırlanarak YZRS ile proteinler tayin edildi. Bu yöntem için 3 negatif yüklü, 3 de pozitif yüklü proteinler kullanıldı. İkinci olarak iletim derleme (convective assembly) yöntemi kullanarak protein örnekleri cam yüzey üzerine biriktirildi ve YZRS spektrumları alınarak tayin edildi. Ayrıca, protein karışımlarının

iletim derleme yöntemi ile ayrılması ve YZRS ile tayin edilebilirliği araştırıldı. Bu amaç için aynı yüklü fakat farklı büyüklüklere sahip protein karışımları ve farklı yüklü ancak aynı büyüklükte protein karışımları AgNPler ile cam yüzeye iletim derleme yöntemi ile biriktirildi. Oluşan yüzeylerin farklı bölgelerinden spektrumlar alınarak protein karışımlarının tayini araştırıldı. Elde edilen sonuçlar zıt yüklü protein karışımlarının tayini için bu yöntemin uygun olmadığını göstermektedir. Sıcaklığın zıt yüklü protein karışımları tayini üzerine etkisi araştırıldı. İletim derleme yöntemi ile zıt yüklü protein karışımları ile AgNPler cam yüzeye biriktirildikten sonra hazırlanan yüzeylerin orta kısmından farklı sıcaklıklarda YZRS spektrumları alınarak protein karışımlarının tayin ediebiliriliği araştırıldı. Son olarak biyolojik moleküller kullanılarak zıt yüklü protein karışımlarının ayrılması ve YZRS ile tayini araştırıldı.

2. TEORİK BİLGİLER

2.1 Spektroskopi

Spektroskopi, çeşitli tipteki ışınların madde ile etkileşimi inceleyen bilim dalıdır [20]. Çizelge 2.1'de ışının dalga boyuna bağlı olarak kullanılan spektroskopik yöntemlerin listesi görülmektedir [21].

Çizelge 2.1 : Elektomanyetik ışına dayanan yaygın spektroskopik yöntemler.

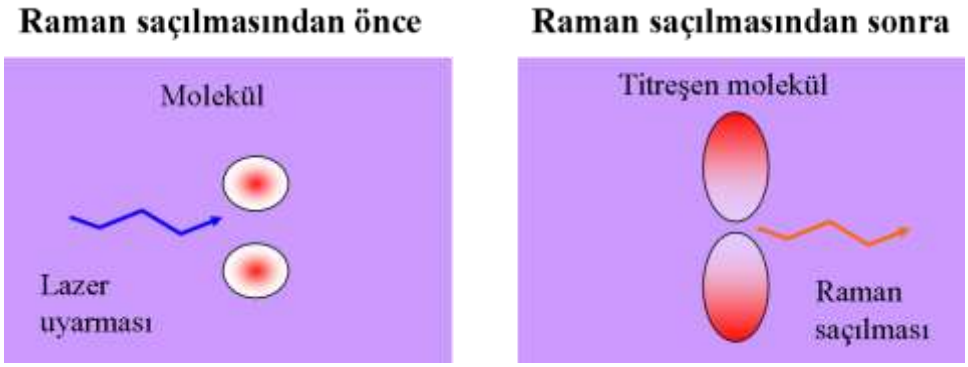
Spektroskopi Tipi	**Dalga boyu Aralığı**	**Kuvantum Geçiş Tipi**
Gama-ışını emisyonu	0,005-1,4 Å	Nükleer
X-Işını absorpsiyonu, emisyonu, floresansı ve kırınımı	0,1-100 Å	İç elektronlar
Vakum ultraviyole absorpsiyonu	10-180 nm	Bağ elektronları
Ultraviyole (UV)-görünür absorpsiyonu, emisyonu ve floresansı	180-780 nm	Bağ elektronları
IR absorpsiyonu ve Raman saçılması	0,75-300 μm	Moleküllerde dönme/titreşim
Mikrodalga absorpsiyonu	0,75-3,75 mm	Moleküllerin dönmesi
Elektron spin rezonansı	3 cm	Manyetik alanda elektron spini
NMR	0,6-10 m	Manyetik alanda çekirdek spini

Bir elektromanyetik ışın bir madde üzerine gönderildiğinde, ışın ile atom ya da molekül etkileşime girer. Bu kullanılan ışının fotonları madde tarafından absorplanır, yayılır veya saçılırlar. Spektroskopik yöntemin çeşidini kullanılan ışın kaynağının

dalga boyu belirler. Küçük dalga boylu ışın kaynakları yüksek enerjili olduklarından iç kabuk elektronlarını uyarılır. Görünür bölgede ise enerji biraz daha düşüktür ve dış kabuk elektronlarının geçişleri söz konusudur. IR bölgede ise ışının enerjisi çok düşüktür ve dış kabuk elektronları uyarmaya yetmez. Bu durumda titreşim ve dönme hareketleri söz konusudur. Bu tür spektroskopi türüne titreşimsel spektroskopi denir. IR ve Raman spektroskopi titreşimsel tekniklerdir.

2.2 Raman Saçılması

Raman saçılması veya Raman etkisi; atom veya moleküllerden fotonların elastik olmayan saçılmasıdır. Bu saçılma ilk defa Hintli ünlü fizikçi C.V. Raman tarafından 1928 yılında keşfetmiştir. Fotonların elastik olmayan saçılmaları üzerine yaptığı çalışmalardan dolayı 1930'da Nobel fizik ödülünü almıştır [22,23]. Genelde atom ya da moleküllerden çoğu fotonlar, kullanılan ışının aynı enerjili (dalga boyu) olarak saçılırlar. Bu olgu Rayleigh saçılması olarak bilinir. Ancak saçılmanın çok küçük bir kesri ($1/10^7$) kullanılan ışından farklı enerjilere sahiptirler. Bu saçılmalara Raman saçılması denmektedir. Raman saçılmasının prensibi şematik olarak Şekil 2.1'de gösterilmektedir.

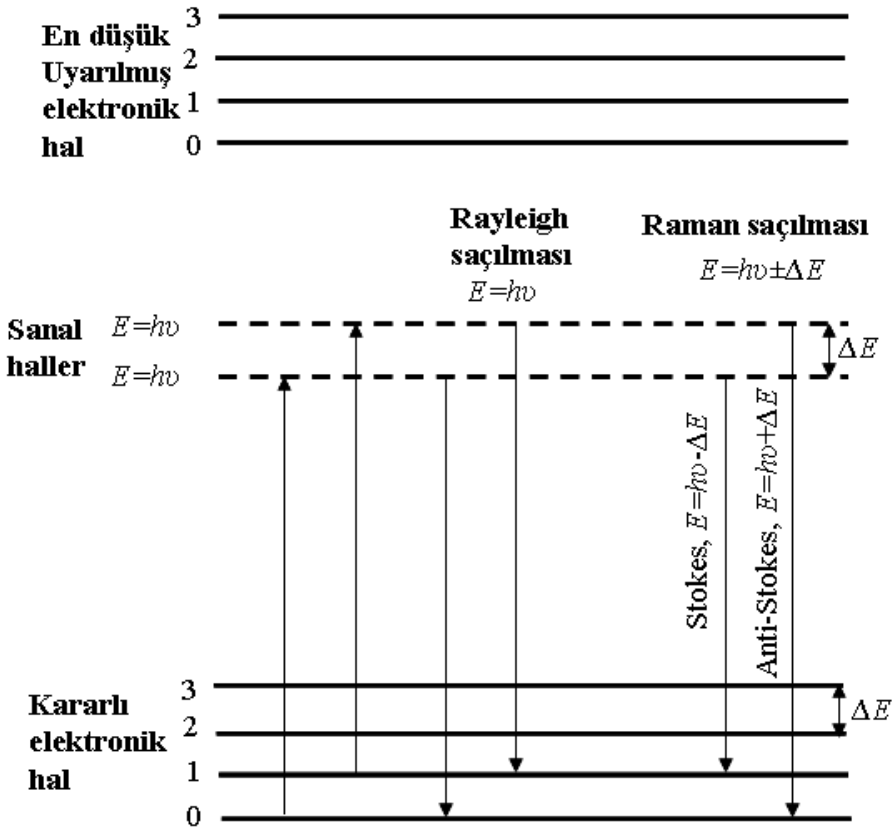


Şekil 2.1 : Raman etkisinin şematik gösterimi [22].

İnelastik olarak saçılan ışığın dalga boyundaki kayma (Raman kayması) molekülün yapısı hakkında bilgi verir. Saçılan Raman fotonları moleküllerin titeşim hallerine bağlı olarak ya düşük ya da yüksek enerjilidir. Stokes saçılması Rayleigh saçılması ile karşılaştırıldığında daha düşük enerjilidir. Oysaki Anti-Stokes saçılması Rayleigh saçılmasına göre daha yüksek enerjilidir. Bundan dolayı elde edilen Raman kaymaları (Stokes ve Anti-Stokes) moleküllerin titreşim enerjilerinin doğrudan olarak ölçülmesidir [23].

2.1.1 Raman spektroskopinin teorisi

Raman spektroskopisi bir sistem içerisindeki titreşim, dönme ve diğer düşük frekanslı modlarda kullanılan spektroskopik bir tekniktir. Raman saçılmasının kuantum tanımlaması Jablonski enerji diyagramında gösterilmektedir (Şekil 2.2). Bu diyagram Raman saçılmasını kuantum mekaniği olarak açıklar. Eğer kullanılacak ışın kaynağının enerjisi molekülü temel halden uyarılmış hale getirecek kadar enerjili değilse, elektronlar molekülün temel hali ile en düşük elektronik uyarılmış hal arasındaki sanal hallere uyarılırlar (Şekil 2.2).



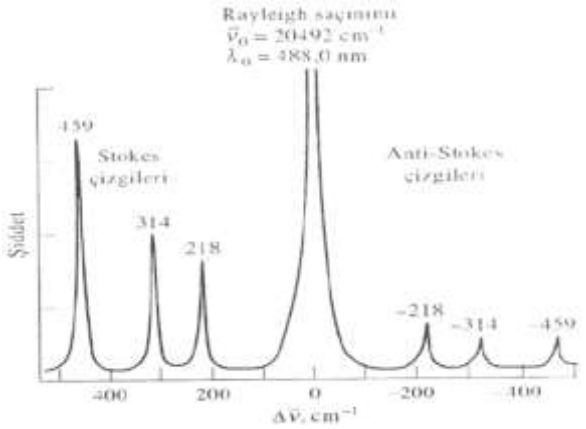
Şekil 2.2 : Rayleigh ve Raman saçılmalarını gösteren Jablonski enerji diyagramı [21].

Rayleigh saçılmasın enerjisi kullanılan ışığın enerjisi ile aynıdır. Herhangi bir enerji değişimi söz konusu değildir. Stokes saçılmasının enerjisi, kullanılan ışığınkinden düşük, Anti-Stokes saçılmasınınki ise yüksektir. Oda sıcaklığında moleküller prensip olarak en temel enerji sevivesindedir. Bundan dolayı Stokes saçılmaları daha şiddetlidir. Oda sıcaklığında Anti-Stokes saçılmalarının olasılığı düşük olduğundan şiddetleri daha düşüktür [23]. Raman kayması genellikle dalga sayısı (veya Δ)

olarak verilir. Raman kaymaları basit olarak aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplanabilir.

$$= (1/\lambda_{\text{kullanılan ışın}}) - (1/\lambda_{\text{saçılan ışın}}) \quad \textbf{(2.1)}$$

Stokes saçılmasında saçılan ışının dalga boyu kullanılan ışığın dalga boyundan büyük olduğundan, hesaplanacak olan dalga sayısı küçüktür. Dolayısıyla Raman kayması pozitif bir değer alır. Ancak Anti-Stokes saçılmasının dalga boyu daha küçük olduğundan Raman kayması negatif değerler alır. Şekil 2.3, bir karbon tetraklorür (CCl_4) numunesinin 488 nm (20492 cm^{-1}) dalga boylu argon iyonu lazer kullanılarak elde edilen Raman spektrumunun bir kısmını göstermektedir [24]. Raman spektrumlarında genellikle Şekil 2.3'te görüldüğü gibi yatay eksen, dalga kayması Δ olup, gözlenen ışının ve kaynağın dalga sayıları (cm^{-1}) arasındaki fark olarak tanımlanır (Eşitlik 2.1). Rayleigh pikinin her iki yanında üç adet Raman pikinin bulunması ve iki taraftaki kayma düzenlerinin özdeş olması dikkat çekicidir. Bir diğer deyişle stokes çizgileri Rayleigh pikinden 218, 314 ve 459 cm^{-1} daha küçük dalga sayılarında çıkarlar. Halbuki Anti-Stokes pikleri kaynağın dalga sayısından 218, 314, 459 cm^{-1} daha büyük dalga sayılarında görülür. Genel olarak Anti-Stokes çizgileri Stokes çizgilerinden çok daha az şiddetlidir. Bu nedenle sadece Stokes kısmı kullanılır. Floresans yapan moleküller için, Stokes değil, Anti-Stokes kaymaları kullanılması daha yararlıdır. Çünkü daha az enerjili olurlar ve floresans girişimi engellenebilmektedir. Raman şaçılmaları uyarıcı ışının dalga boyundan bağımsızdır. Şekil 2.3'te CCl_4 kayma düzenleri, uyarmanın kripton iyon (488 nm), lazeri ile helyum/neon (632.8 nm) lazeri ile veya Nd:YAG (1064 nm) lazer ile yapıldığından bağımsızdır [21].



Şekil 2.3 : 488 nm lazer ile uyarılan CCl_4'ün Raman spektrumu [24].

2.1.2 Raman ve Rayleigh saçılmasının dalga modeli

Belirli bir frekansa sahip bir uyarıcı ışın demeti (υ_{uy}) bir analit çözeltisi ile etkileştiğinde, ışının elektrik alanı (E) aşağıdaki eşitlik ile tanımlanır.

$$E = E_0\cos(2\pi\,\upsilon_{uy}t) \quad \textbf{(2.2)}$$

E_0 dalganın genliği olarak tanımlanır

Işının oluşturmuş olduğu elektrik alanı, analitin bağının elektron bulutuyla etkileştiğinde, bu bağda bir dipol moment (m) oluşturur ve bu eşitlik 2.3'te verilmektedir.

$$m = \alpha E = \alpha E_0\cos(2\pi\,\upsilon_{uy}t) \quad \textbf{(2.3)}$$

Bu eşitlikte α, bağın polarizlenebilirliği (kutuplaşabilirliği) olarak adlandırılan orantı sabitidir. Bu sabit söz konusu bağın elektrik alanı altında deforme olabilirliğinin bir ölçüsüdür. Bir molekülün Raman aktif olabilmesi için, bir bağın polarizlenebilirliğini gösteren α'nın, çekirdekler arası uzaklığının aşağıda tanımlandığı biçimde fonksiyonu olarak değişmesi gerekmektedir.

$$\alpha = \alpha_0 + (r-r_{eq})\,(\partial\alpha/\partial r) \quad \textbf{(2.4)}$$

Bu eşitlikteki α_0, dengedeki çekirdekler arası denge uzaklığı olan r_d değerinde bağın polarizlenebilirliğini ve r ise herhangi bir andaki çekirdekler arası uzaklığı göstermektedir. Çekirdekler arası uzaklığın değişimi, υ_v titreşim frekansıyla

$$r-r_{eq} = r_m(2\pi\,\upsilon_v t) \quad \textbf{(2.5)}$$

eşitliğine göre değişir. Buradaki r_m, denge konumuna göre çekirdekler arasındaki uzaklığın maksimum değerini ifade eder. Eşitlik 2.5'in 2.4'te yerine koyulmasıyla Eşitlik 2.6 elde edilir.

$$\alpha = \alpha_0 + (\partial\alpha/\partial r)\, r_m(2\pi\,\upsilon_v t) \quad \textbf{(2.6)}$$

Eşitlik 2.6'ı Eşitlik 2.3'te yerine koyduğumuzda indüklenmiş dipol moment (m) için yeni bir eşitlik yazılabilir.

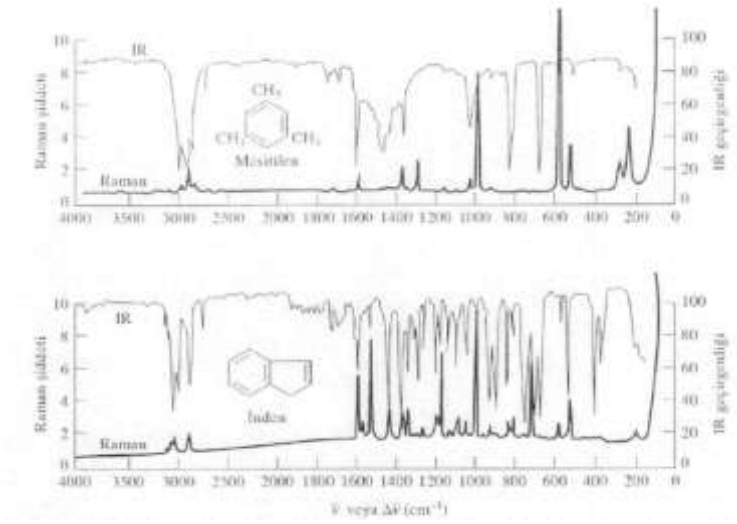
$$m = \alpha_0 E_0\cos(2\pi\,\upsilon_{uy}t) + (E_0/2)r_m(\partial\alpha/\partial r)\cos[2\pi\,(\upsilon_{uy}-\upsilon_v)t] + (E_0/2)r_m(\partial\alpha/\partial r)\cos[2\pi\,(\upsilon_{uy}+\upsilon_v)t] \quad \textbf{(2.7)}$$

Bu denklemdeki ilk terim, υ_{uy} uyarma frekansında gerçekleşen Rayleigh saçılmasını temsil eder. İkinci ve üçüncü terimler ise sırasıyla Stokes ($\upsilon_{uy}-\upsilon_v$) ve Anti-Stokes ($\upsilon_{uy}+\upsilon_v$) saçılma frekanslarına karşılık gelir. Burada uyarma frekansı, bağın titreşim

frekansı ile değişime uğramaktadır. Raman saçılması için bağın polarizlenebilirliğinin uzaklığın fonksiyonu olarak değişmesi gerekmektedir. Yani ($\partial\alpha/\partial r$) değişiminin sıfırdan farklı olması gerekmektedir [21].

2.1.3 Raman ve IR karşılaştırma

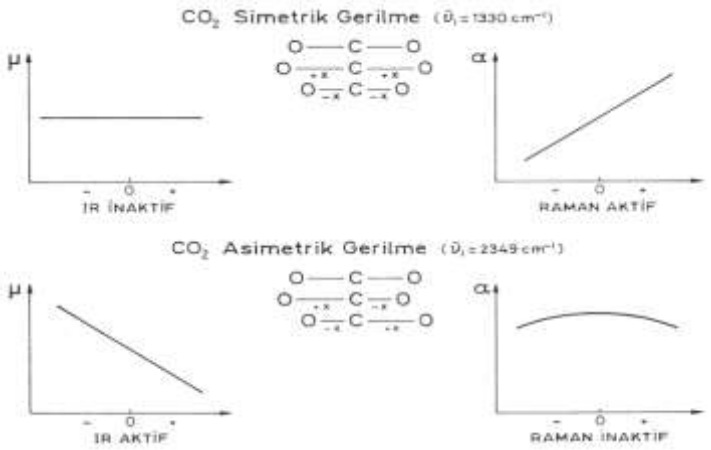
Belirli bağ için bir Raman deneyinde gözlenen enerji kaymaları, ilişkili titreşim modları hem IR absorpsiyonuna, hem de Raman saçılmasına karşı aktif olmak koşuluyla, bağın IR absorpsiyon bantlarının enerjisiyle genellikle benzerdir. Şekil 2.4, bu iki tip spektrumun benzerliğini ortaya koymaktadır [21].



Şekil 2.4 : Raman ve IR spektrumlarının karşılaştırılması [21].

İki bileşik için özdeş ve Δ değerlerine sahip çeşitli piklerin var olduğu görülmektedir. Ancak birbirlerine karşı gelen piklerin şiddetleri çoğu kez oldukça farklıdır; ayrıca bir spektrumda ortaya çıkan bazı pikler diğerinde görülmemektedir. Bir Raman spektrumuyla IR arasındaki farklılıklar, temel mekanizmaları aynı titreşim modlarına dayalı olduğu halde, mekanik olarak farklı işlemlerden kaynaklandıkları göz önüne alındığında, hiç de şaşırtıcı değildir. IR absorpsiyonu, molekülün bir titreşim modunun dipol momentte değişim veya bununla ilişkili bir yük değişikliğine sahip olmasını gerektirir. Bunun aksine saçılma, bir moleküldeki bağın etrafındaki elektronların dağılmasındaki anlık bozulması ve sonra, bağın normal haline geri dönüşü sırasında, ışın emisyonu ile ilişkilidir. Elektron dağılımı bozulmuş olan molekül, geçici olarak polarizlenmiştir; yani durulma ve yeniden emisyonla kaybolan bir anlık indüklenmiş dipol oluşur. Mekanizmadaki bu temel farklılıktan ötürü, verilen bir titreşim modunun Raman aktivitesi onun IR

aktivitesinden önemli ölçüde farklı olabilir. Raman aktif titreşimler infrared aktif titreşimlere çok benzerdir. Molekülün Raman ya da IR aktif olabilmesi o molekülün simetrisi ile ilgidir. Simetrik moleküller Raman aktif iken simetrik olmayan moleküller IR aktiftirler. Örneğin azot, hidrojen veya klor gibi homonükleer bir molekülün (simetrik) gerek denge konumunda, gerekse gerilme titreşimi iki çekirdek arasındaki uzaklıkta bir değişime yol açtığında dipol moment değişimi oluşmaz. Bu yüzden molekülün titreşim frekansında absorpsiyon gerçekleşemez ve molekül IR aktif değildir. Diğer taraftan bu tür bir molekülde iki atom arasında bağın polarizlenebildiği, periyodik olarak gerilme titreşimleri ile eş fazlı olarak değişir ve atomlar en fazla uzaklaştığında maksimum değerine, en fazla yaklaştığında ise minimum değerine ulaşır. Buna bağlı olarak titreşim modundakine karşılık gelen frekansta bir Raman kayması ortaya çıkar ve dolayısıyla molekül Raman aktiftir. Karbondioksit (CO_2) molekülü için ise IR ve Raman aktivitelerini kıyaslandığında yine molekülün simetrisinin etkisi görülmektedir. Simetrik gerilmede iki oksijen atomu, merkezdeki karbon atomundan uzaklaştığında veya yaklaştığında dipol momentte değişiklik olmaz; yani bu gerilme IR aktif değildir. Ancak polarizlenebilirlik, titreşimle eş fazlı bir değişim gösterir, çünkü bağlar uzadıkça bağların elektron dağılımı kolaylaşır ve kısaldıkça güçleşir.. Buna karşıt olarak, CO_2 dipol momenti asimetrik (simetrik olmayan) titreşim modu ile eşfazlı olarak dalgalanma gösterir ve bu moddan dolayı IR aktiftir . Buna karşılık bağlardan birinin polarizlenebilirliği bağ uzadıkça artar ve diğerinin polarizlenebilirliği azalır. Sonuç olarak polarizlenebilirlikte net bir değişim olmadığından molekülün asimetrik gerilme titreşimi Raman aktif değildir (Şekil 2.5)



Şekil 2.5 : CO_2'nin Raman ve IR aktivitelerinin karşılaştırılması [21].

Genellikle Raman ve IR spektrumlarının bazı kısımları, her biri bir moleküldeki farklı bir dizi titreşim bandı ile ilişkili olarak, birbirinin tamamlayıcısıdır [21]. IR ve Raman spektroskopisinin karşılaştırılması Çizelge 2.2'de görülmektedir.

Çizelge 2.2 : Raman ve IR spektroskopisinin karşılaştırılması.

IR	**RAMAN**
Absorpsiyon esasına dayanır.	Saçılma esasına dayanır.
Dipol moment değişimi gereklidir.	Polarite değişimi gereklidir.
Sulu örnekler analiz edilemez.	Sulu örnekler analiz edilebilir.
Floresanstan etkilenmez.	Floresanstan etkilenebilir.
Cam ve kuvars kullanılamaz.	Cam ve kuvars kullanılabilir.
Sadece KBr ve NaCl hücreleri kullanılır.	

2.3 Raman Cihazı

Şekil 2.6'da Raman spektrometrenin şematik gösterimi görülmektedir [25].

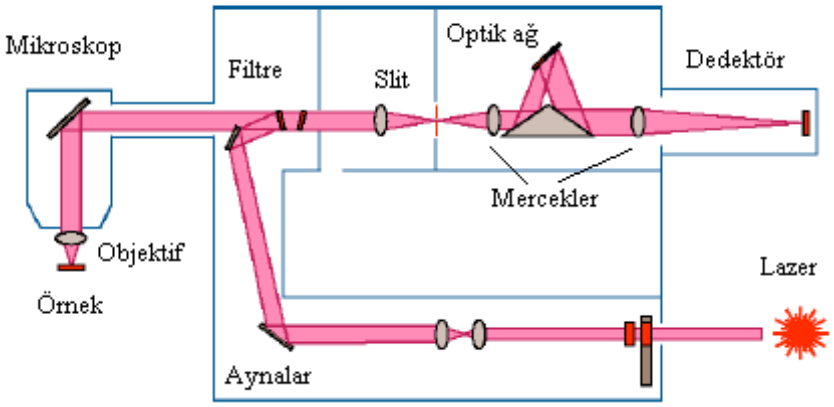
Modern Raman spektroskopide kullanılan cihazlar dört ana bileşenden oluşur [26].

1-Işın kaynağı

2-Numune ışınlama sistemi ve ışık toplama optiği

3-Dalga boyu seçiçi

4-Dedektör



Şekil 2.6 : Raman spektrometrenin şematik gösterimi [25].

2.3.1 Işın kaynakları

Modern Raman spektrometrede kullanılan ışın kaynakları genellikle lazerlerdir. Çünkü makul bir sinyal/gürültü oranıyla ölçülebilir yeterlilikte bir şiddete sahip Raman saçılması oluşturmak için yüksek şiddetli ışın kaynağı gerekir [27]. Lazerlerleri dalga boyuna bağlı olarak UV, görünür bölge ve IR lazerler olmak üzere 3 grupta toplayabiliriz. Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan lazer kaynakları Çizelge 2.3'te verilmektedir [21].

Çizelge 2.3 : Raman spektroskopide yaygın olarak kullanılan bazı lazer kaynakları.

Kaynak Tipi	**Dalga Boyu (nm)**
Argon iyonu	488,0 veya 514,5
Kripton iyonu	530,9 veya 647,3
Helyum/Neon	632,8
Diyod lazeri	785 veya 830
Nd/YAG	1064

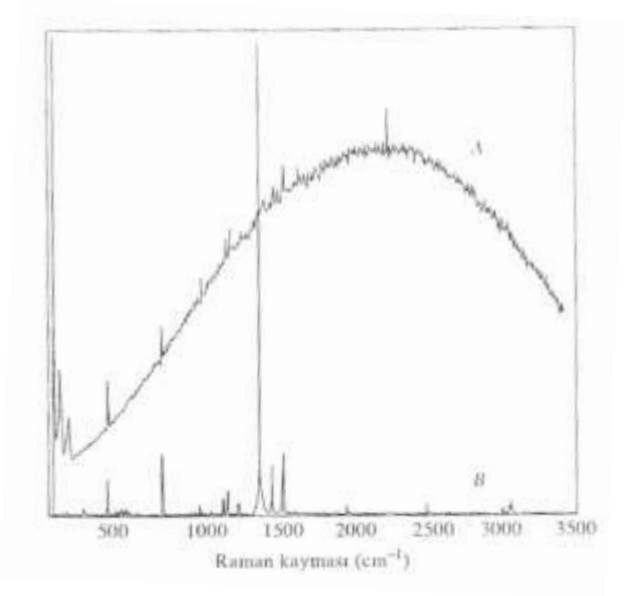
Raman spektroskopide kullanılan lazerlerin seçimi numuneden Raman saçılması toplanabilmesi için son derece önemlidir. Çizelge 2.4'te lazerlerin dalga boyuna bağlı olarak uygulama alanları verilmektedir [26].

Çizelge 2.4 : Lazerlerin dalga boyuna bağlı olarak uygulama alanları.

Lazer Dalga Boyu	**Uygulama Alanları**
244 nm	Biyolojik örnekler ve katalizörler
325 nm	Geniş bant aralıklı yarı iletkenler
488 ve 514 nm	Yarı iletkenler, katalizörler, biyolojik örnekler, polimerler, mineraller, karbon esaslı malzemeler, genel amaçlar
633 nm	Korozyon ve genel amaçlar
785 nm	Polimerler, biyolojik örnekler, genel amaçlar
830 nm	Biyolojik örnekler

Raman saçılma şiddeti frekansın dördüncü kuvveti ile orantılı olduğundan, spektrumun düşük dalga bölgesinde ışıma lazer kaynakları diğer kaynaklara göre daha avantajlıdır. Örneğin 488 nm'deki argon çizgisi, aynı giriş gücündeki helyum/neon kaynakları ile uyarılan Raman çizgilerinden neredeyse üç kat daha şiddetli çizgiler verirler. Ancak Raman spektroskopide kullanılan lazerlerin dalga boyunun küçülmesi aynı zamanda, floresans oluşturma, ve örneğe zarar verme riskini artırır, spektrometrenin fiyatını yükseltir. Son yıllarda, yakın-infrared ışınları, uyarıcı olarak giderek daha fazla kullanım bulmaktadır. Çünkü NIR kaynaklarının, daha kısa dalga boylu lazerlere göre iki önemli üstünlüğü vardır. Birincisi, numunenin foto parçalanmasına yol açmaksızın çok yüksek güçlerde çalıştırılabilmesidir. İkincisi ise, çoğu molekülde yeterli sayıda floresansa sebep olabilecek elektronları uyaracak kadar enerjiye sahip olmamasıdır. Bunun sonucu olarak bu lazerlerle floresans, çok düşük şiddetlidir veya hiç olmaz. 1064 nm'deki Nd/YAG çizgisi floresansın giderilmesinde özellikle etkilidir. Diyod serili lazerlerin 785 ve 830 nm dalga boylu çoğu durumda floresansı önemli ölçüde düşürmektedirler. Şekil 2.7, 1064 nm'deki Nd/YAG kaynağının zemin floresansını tamamen giderdiği bir örneği göstermektedir. Üstteki spektrum uyarma için argon iyon lazerinden gelen 514.5 nm çizgisini kullanan klasik dispersif Raman cihazıyla elde edilmiştir. Numune antrasendir ve kaydedilen sinyalin büyük kısmı bu bileşiğin floresansından gelmektedir. Alttaki spektrum ise aynı numunenin, Nd/YAG (1064 nm) lazeriyle donatılmış bir Fourier dönüşümlü (FT) spektrometre ile alınan spektrumudur. Burada

floresans zemin sinyali tamamen yok olmuştur [28]. Yani floresans oluşumunu engellemek için uzun dalga boylu lazerler kullanmak daha avantajlıdır.



Şekil 2.7 : Antrasen'in Raman spektrumu A: Klasik cihaz, 514,5 nm uyarımı, B: FT cihazı, 1064 nm lazer ile uyarımı [28].

2.3.2 Örnek ışınlama sistemi

Raman saçılması ölçümlerinde, örneklerin hazırlanması IR spektroskopisinden daha basittir. Çünkü pencereler, mercekler ve diğer optik bileşenler için daha kırılgan ve atmosferik olarak daha az dayanıklı kristal halojen yerine cam kullanılabilir. Buna ek olarak lazer kaynağı, örneğin küçük bir alanına kolaylıkla odaklanabilir ve saçılan ışın bir slit üzerine verimli olarak odaklanabilir. Bunun sonucunda çok ufak örnekler bile incelenebilir. Son yıllarda geliştirilen cihazlarda örnek ışınlama ve saçılan ışınları toplamak için optik mikroskoplar kullanılmaktadır. Bu optik mikroskoplar, kullanılan objektifler sayesinde numunenin çok küçük bir alanından Raman spektrumunun alınmasını sağlamaktadır. Kullanılan lazerin örnek üzerindeki çapı mikroskoplarda kullanılan objektiflere göre Eşitlik 2.8 kullanılarak belirlenebilmektedir [26].

$$d_l = (1{,}22*\lambda)/N.A. \quad \textbf{(2.8)}$$

Bu eşitlikte, d_l: lazerin çapı, λ: lazerin dalga boyu, N.A: Numerical Aparture

Çizelge 2.5'te bu eşitlik kullanılarak lazerin dalga boyuna ve objektiflere bağlı olarak hesaplanan lazerlerin çap değişimi verilmektedir.

Çizelge 2.5 : Kullanılan lazerin dalga boyuna ve objektife bağlı olarak lazerin çapının değişimi.

Objektifler (Büyütme)	N.A.	Lazerin Çapı (µm)	
		514 nm Lazer	785 nm Lazer
5X	0,12	2,72	4,15
10X	0,25	1,31	1,99
20X	0,40	0,82	1,25
50X	0,75	0,44	0,66
100X	0,90	0,36	0,55

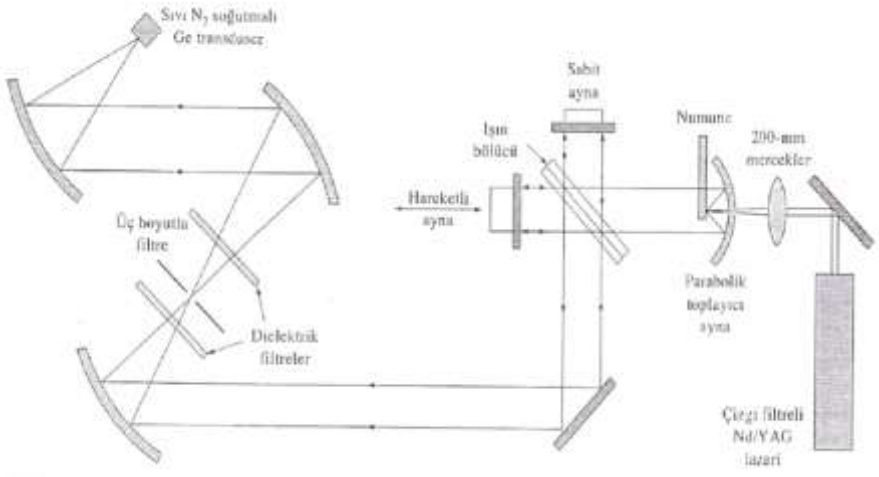
Son yıllarda mikroskopların yanında cihaza monte edilmiş hareketli düzenekler sayesinde bir numune yüzeyini haritalayabilir veya derinlik profili alınabilir. Bu düzenek sayesinde numune üzerinde seçilen bölgeleri belirli adımlarla tarayarak, her bir adımda Raman spektrumu alarak yüzey karakterize edilebilmektedir. Derinlik profilinde ise, hareketli düzenek aşağı, yukarı hareket ederek faklı derinlikle Raman spektrumu alınmaktadır. Özellikle ince film araştırmalarında yaygın olarak kullanılmaktadır. Raman spektroskopinin IR'ye göre örnek hazırlamada temel üstünlüğü, suyun zayıf bir Raman saçıcısı, fakat kuvvetli IR absorplayıcısı olma özelliğinden gelir. Böylece sulu çözeltiler, IR ile değil Raman spektroskopisiyle kolaylıkla incelenebilir. Bu üstünlük, biyolojik ve inorganik sistemler için ve su kirliliği sorunlarına ilişkin çalışmalarda özellikle çok önemlidir. Katı örneklerin Raman spektrumları, bir cam lam üzerine örnek konularak kolaylıkla Raman spektrumları alınır. Gaz örnekler için Raman spektrumu almak için, ışın yolu uzatılmış gaz hücrelerinin kullanılmaktadır [21].

2.3.3 Raman spektrometreleri

1980'li yılların başına kadar Raman spektometreleri klasik UV/görünür bölge dispersif cihazlarla aynı tür bileşenleri kullanmakta ve bunlara tasarım yönünden benzemekteydiler. Bunların çoğunda transdusere ulaşan yalancı ışını en alt düzeye indirmek için çift optik ağlı sistemler kullanıldı. Fotoçoğaltıcılar transduser olarak

kullanıldı. Ancak şu anda çoğu Raman spektrometreleri ya germanyum tranduseri ile donatılmış FT cihazlar olarak ya da yük eşleşmiş düzeneklere (CCD) dayalı çok kanallı cihazlar olarak satılmaktadır. Fotoçoğaltıcı tüplerin aksine bu tranduserler, ciddi floresansa yol açmaksızın çoğu bileşiğin Raman uyarımını sağlayan ve diyod lazerleri ile 785 nm'de üretilen ışığa karşı duyarlıdır. Ne yazık ki, CCD bir Nd/YAG lazerinden gelen 1064 nm ışınına duyarlı değildir.

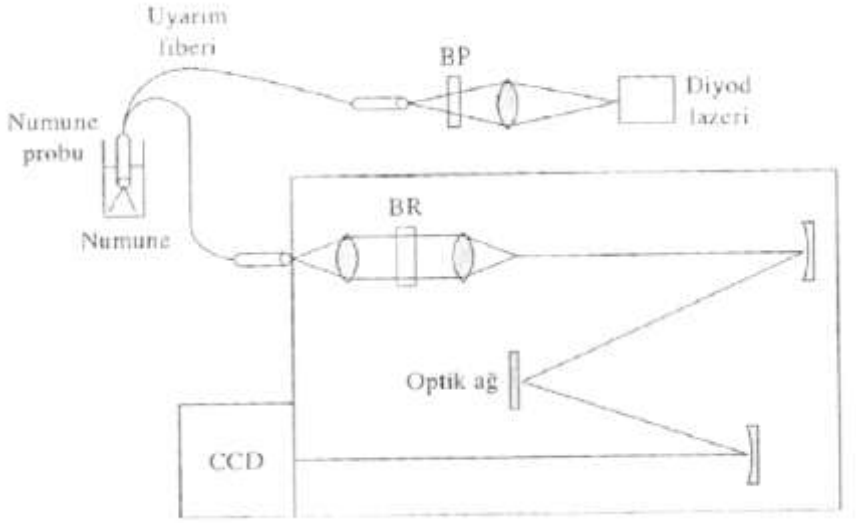
Günümüzde floresans gösteren örneklerde Raman ölçümleri için hangi tür cihazın daha iyi olduğu konusunda tam bir netlik yoktur. Fourier dönüşümlü cihazlar mı yoksa yük-eşleşmiş dedektörlere dayanan dispersif cihazlar mı daha iyi sonuç verir? Bu noktada bu cihaz türlerinin hangisinin gelecekte daha yaygınlıkta kullanılacağı açık değildir. Şekil 2.8, FT-Raman spektrometre cihazın şeması görülmektedir. İnterferometre, IR cihazlarda kullanılanlarla aynı tiptendir. Transduser ise sıvı azotla soğutmalı germanyum fotoiletkenidir. Rayleigh çizgisinin şiddeti, Raman çizgisine ait olandan bir kaç mertebe daha yüksek olduğundan, cihazda, transdusere kaynağınkinden daha uzun dalga boylu ışınının erişmesini sınırlandırmak için genellikle notch filtreleri denen holografik girişim filtreleri veya bir monokromatör kullanılır. Bazı FT cihazlarda ise sadece lazer kaynağının dalga boyunu gidermek üzere tasarlanmış filtreler kullanılır [28].



Şekil 2.8 : Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı [28].

Şekil 2.9, bir yük eşleşmiş dedektörü olan tipik bir Raman dispersif spektrometrenin şemasıdır. Kaynak 785 nm'de ışın veren bir diyod lazeri ve filtre sistemidir. Bu demet bir mercek aracılığıyla uyarım fiberinin ucuna odaklanır ve 19 toplayıcı fiberle

çevrili uyarım fiberinden oluşan bir fiber proba iletilir. Bu fiber prob ise, Raman şaçılmasını bir monokromatörün slitine taşır ki burada filtreden geçerken Rayleigh şaçılmış ışını yok edilir. Her mm'sinde 600 yiv içeren bir kırınım optik ağı ışını disperse eder ve onu 258'e 1152 pikselden oluşan bir yük eşleşmiş cihazın üzerine yansıtır. Son okumadan önce 258 düşey pikselden her biri toplanır [29].

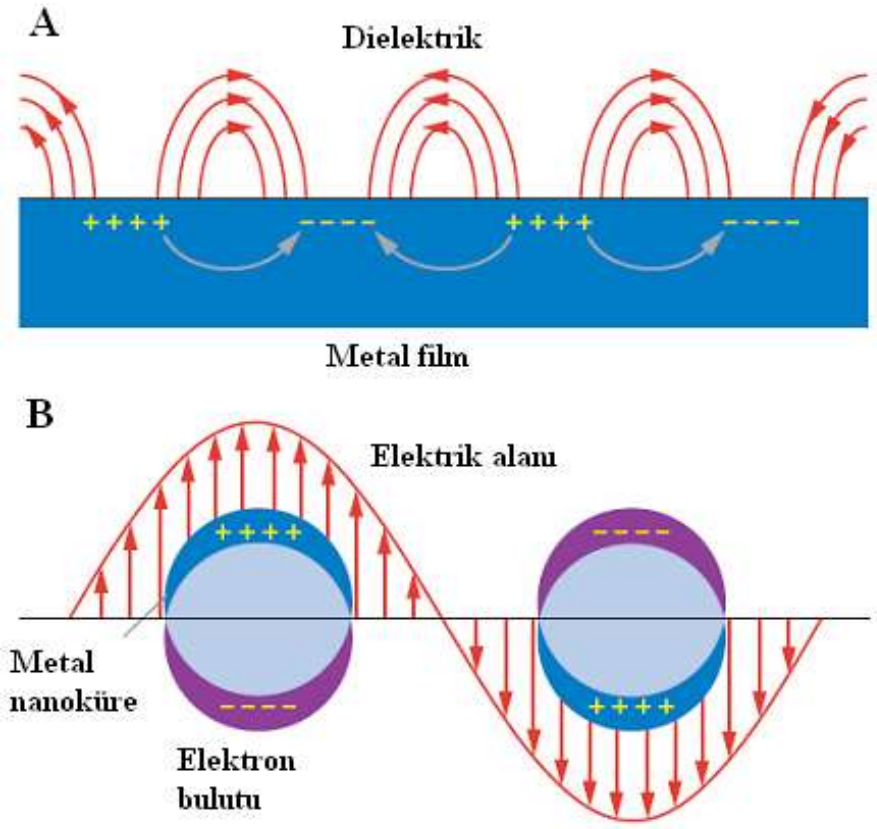


Şekil 2.9 : Bir CCD bulunan çok kanallı dispersif Raman spektrometre. BP, girişim bant-geçirimli filtre, BR, Rayleigh bant-reddeden filtre [29].

2.4 Plazmonik

Yüzey plazmonları (Surface Plasmons; SPs) metal-dielelektrik ara yüzeyinde elektromanyetik ışıma ile uyarılan soy metal film ya da nanoparçacık yüzeylerinde iletken elektronların tutarlı salınımlarıdır [30]. Bu metal-ışık etkilişimleri üzerine yapılan ve gelişen araştırma alanı "Plazmonik" (Plasmonics) olarak bilinir [31-33] ve nanofotoniğin bir alt dalıdır [34]. Plazmonik yapılar görünür ışığı nanometre mertebesinde kontrol edebilme ve yönlendirme özelliğine sahiptirler [35-37]. Bu özelliğinden dolayı bu zamana kadar bir çok plazmonik aygıt yapılmıştır. Bunlara örnek olarak filtreler [35], dalga kılavuzları/yönlendiriciler [35-37] ve nanoboyutta ışın kaynakları verilebilir [38]. Ayrıca geniş bir uygulama alanı olan plazmonik yapılar ve bu yapılara adsorbe olmuş moleküllerin etkileşimi üzerine yapılan araştırmaların anlaşılması üzerine büyük etki yapmıştır. Bu uygulama alanları ise nanoboyutta optiksel spektroskopi [39], yüzeyde zenginleşitirilmiş Raman spektroskopi (SERS) [40], yüzey plazmon rezonans spektroskopi (SPR) [41,42] ve lokalize olmuş yüzey plazmon rezonans (LSPR) spektroskopisidir [43].

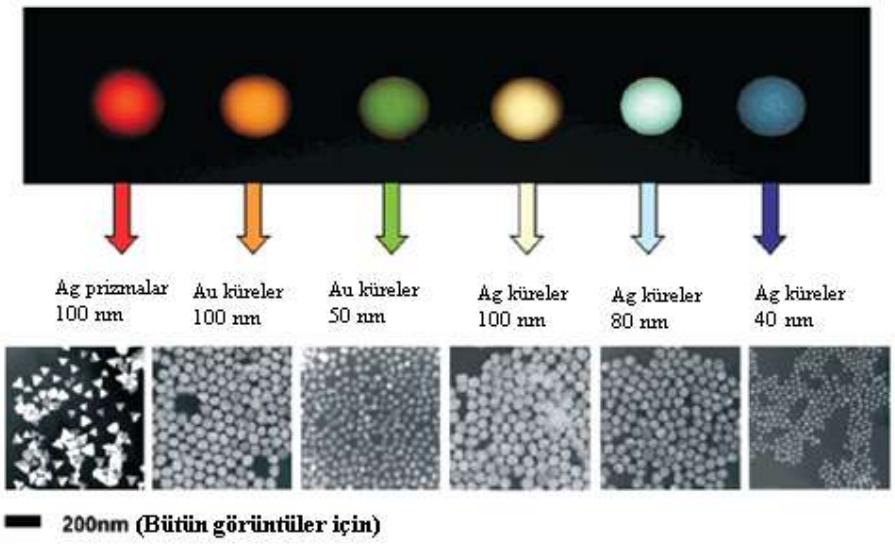
Yüzey plazmon rezonansı yayılan (propagating) ve yayılmayan (nonpropagating veya localized) olarak iki çeşittir [30,44]. Yayılmayan yüzey plazmonlarına yüzey plazmon polaritonları (Surface Plasmon Polariton; SPP), yayılmayan yüzey plazmonlarına ise lokalize olmuş yüzey plazmon rezonansıdır (Localized Surface Plasmon Resonance; LSPR). Şekil 2.10'da iki farklı yüzey plazmonları şematik olarak gösterilmektedir [44]. SPP soy metaller (özellikle Ag ve Au) ile hazırlanmış ince film (10-200 nm) yüzeylerde oluşmaktadır (Şekil 2.10A). Metal yüzeyinde oluşan elektromanyetik alan metalin cinsine, film kalınlığına ve yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak x ve y ekseni boyunca 10-100 µm yayılabilir. Z ekseninde ise 200-300 nm aralığında bir elektromanyetik alan oluşturur [34,45,46]. Yayılmayan yüzey plazmonları 10-200 nm aralığındaki AuNPler ve AgNPler etrafında oluşmaktadır [45] ve nanoparçacıkların etrafında oluşan elektromanyetik alanın büyüklüğü ince filmin aksine bir kaç nm mertebesindedir [47] (Şekil 2.10B). Nanoparçacık etrafında oluşan yüzey plazmonlarının özelliği (Plazmonik özellikler), nanoparçacığın cinsine, şekline, büyüklüğüne ve bileşimine ve dielektrik çevresine bağlıdır [48-51].



Şekil 2.10 : Metal yüzey üzerinde yayılan yüzey plazmonlarının (A) ve metal nanoküre etrafında lokalize olmuş (yayılmayan) yüzey plazmonlarının (B) şematik gösterimi [44].

Plazmonik nano yapılar ışık ile etkileşime girdiğinde hem ışığı absorplama (ve dolayısıyla plazmon oluşumu) hem de saçma özelliğine sahiptir [52]. Bu iki özellik ayarlanabilir olmasından dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılması öngörülmektedir. Özellikle biyofiziksel çalışmalar [53,54], biyomedikal algılamalar [55,56] ve görüntülemeler [57-59], medikal tanı [60] ve kanser tedavisi [61-67] üzerine son yıllarda pek çok çalışma yapılmıştır.

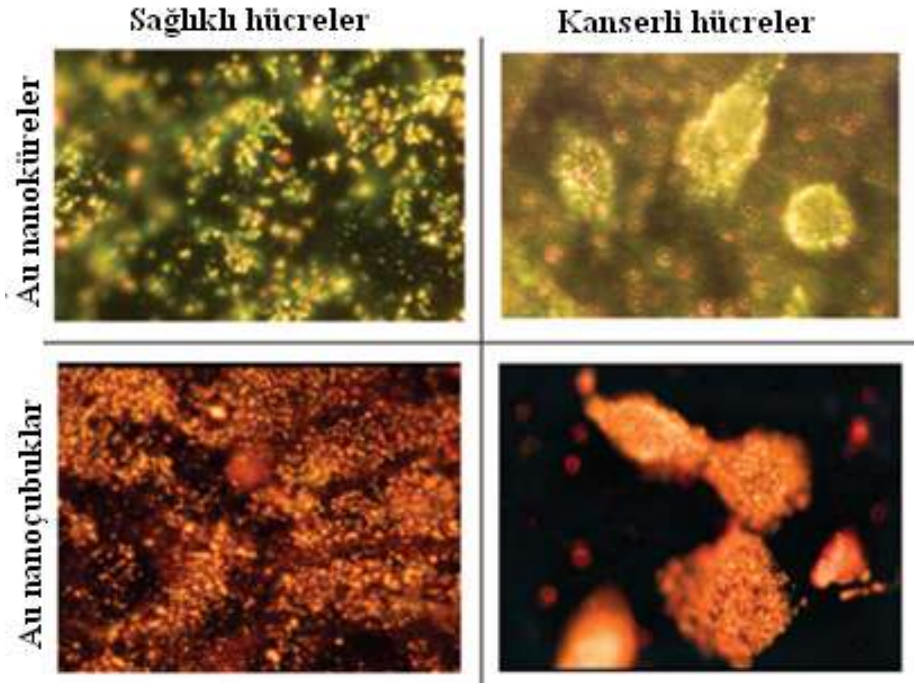
Nanoparçacıkların ışığı saçma özelliğinden dolayı [68] biyomedikal görüntülemede kullanılabileceği rapor edilmiştir [57,58]. Nanoparçacığın ışık saçma özelliği nanoparçacığın şekline, büyüklüğüne ve çeşidine bağlıdır. Şekil 2.11'de farklı büyüklük ve şekilde altın ve gümüş nanoparçacıkların saçtığı ışıkların renkleri görülmektedir [60]. Şekilde görüldüğü gibi her nanoparçacığın cinsine, şekline ve büyüklüğüne bağlı olarak saçtığı ışık farklıdır ve bu özelliğinden dolayı biyomedikal görüntülemede kullanılmaktadır. Görüntüleme sırasında genellikle karanlık-alan mikroskopları ve lazer taramalı konfokal mikroskoplar kullanılmaktadır [69].



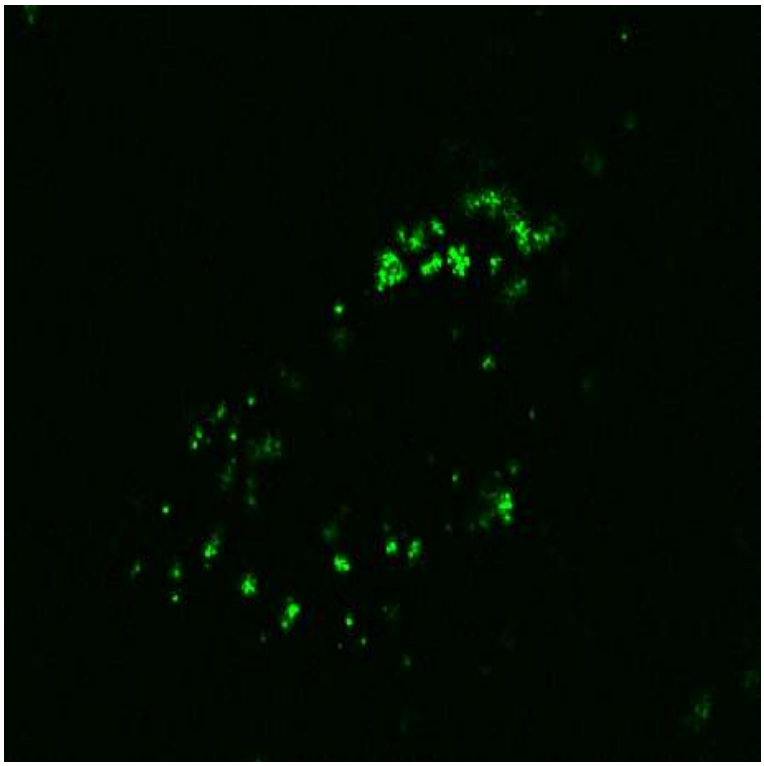
Şekil 2.11 : NPlerin şekline, cinsine ve büyüklüğüne bağlı olarak ışığı saçma özellikleri [60].

Plazmonik nanoparçacıkların görüntülemede kullanılmasının floresans bazlı görüntülemelere göre birçok üstünlüğü vardır [70]. Bunlardan birincisi nanoparçacığın saçtığı ışığın şiddeti, floresans boyalara göre çok daha yüksektir. Örneğin bir tane 80 nm AuNP saçtığı ışık şiddeti, yaklaşık 10^6 floresans boya olan fluorescein molekülünün yaptığı emisyon şiddetine eşittir [71,72]. İkincisi, saçılma renginin ve şiddetinin ayarlanabilir olmasıdır. Üçüncüsü ise floresans boyaların aksine uzun süre ve yüksek enerjili ışınlara maruz kaldığında foto parçalanma

olmamasıdır [73,74]. Son üstünlüğü ise birçok görüntüleme sistemlerinde kullanılan pahalı lazerler, optiksel parçalar, dedektörler ve karmaşık görüntü analiz prosesi gerektirirken NPlerden karanlık-alan görüntüsünü alabilmek için basit ışık mikroskopuna karanlık-alan kondensörü takılması yeterlidir. Böylelikle çok basit mikroskoplar yardımıyla NPlerin saçtığı ışık görüntülenebilmektedir. AuNPler ve Au nanoçubuklar kullanılarak kanserli hücrelerin görüntülenebileceği literatürde rapor edilmiştir [58,62]. Bunun için genellikle kanser hücresine özgü antikor NP yüzeyine bağlanır ve hücreler ile inkübe edilir. Şekil 2.12'de Au nanoküreler ve Au nanoçubuklar sağlıklı ve kanser hücreleri ile inkübe edildikten sonra alınan karanlık alan mikroskop görüntüleri görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi sağlıklı hücrelerdeki nanoparçacıklar rastgele dağılırken, kanserli hücrelerde sadece hücre yüzeyine tutunmuşlardır. Böylelikle sağlıklı ve kanser hücrelerinin ayırt edilebileceği ortaya konmuştur. Ayrıca çekirdek kabuk NPler de kullanılarak kanserli hücrelerin görüntülenebileceği rapor edilmiştir [75].



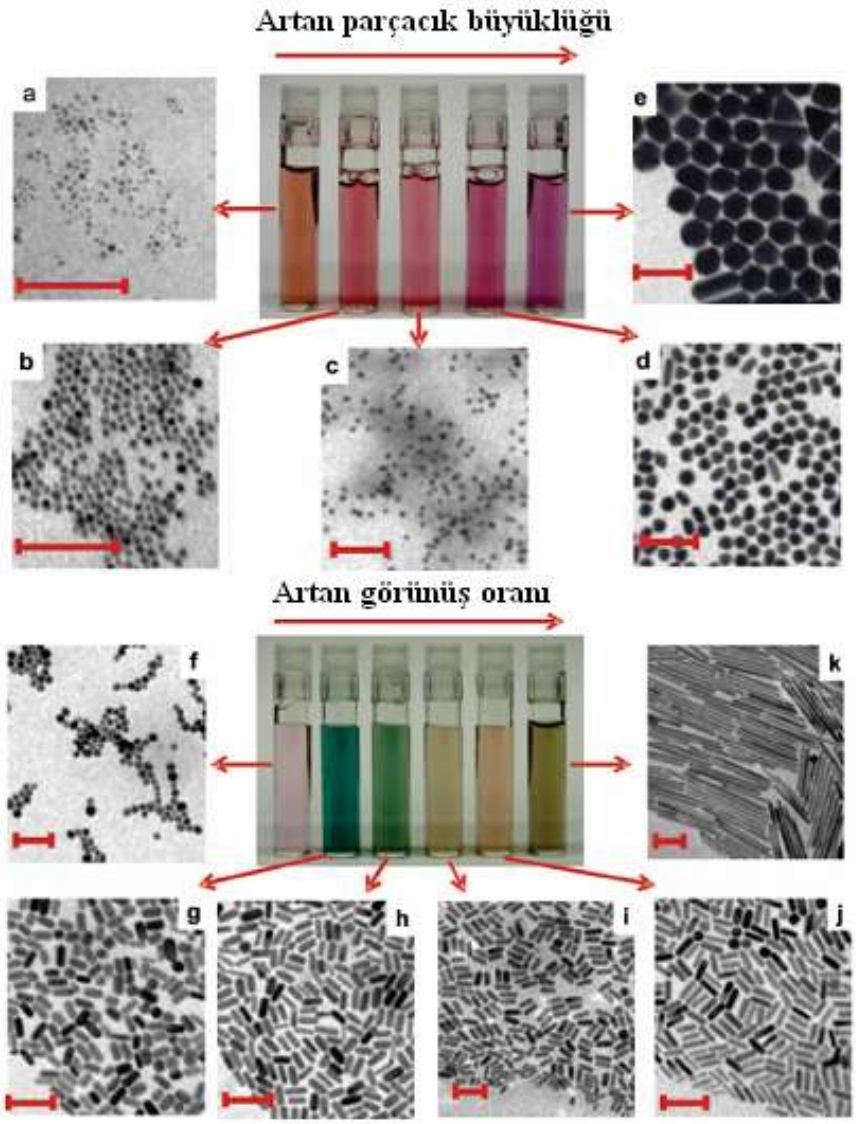
Şekil 2.12 : Kanserli hücreler spesifik antikor ile modifiye edilmiş Au nanokürelerin ve nanoçubukların normal ve kanserli hücreler ile muamele edildikten sonra alınan karanlık-alan mikroskop görüntüleri [62].



Şekil 2.13 : Laktoz modifiye AgNPler ile 24 saat inkube edilen A549 kanser hücresinin lazer taramalı konfokal mikroskop görüntüsü.

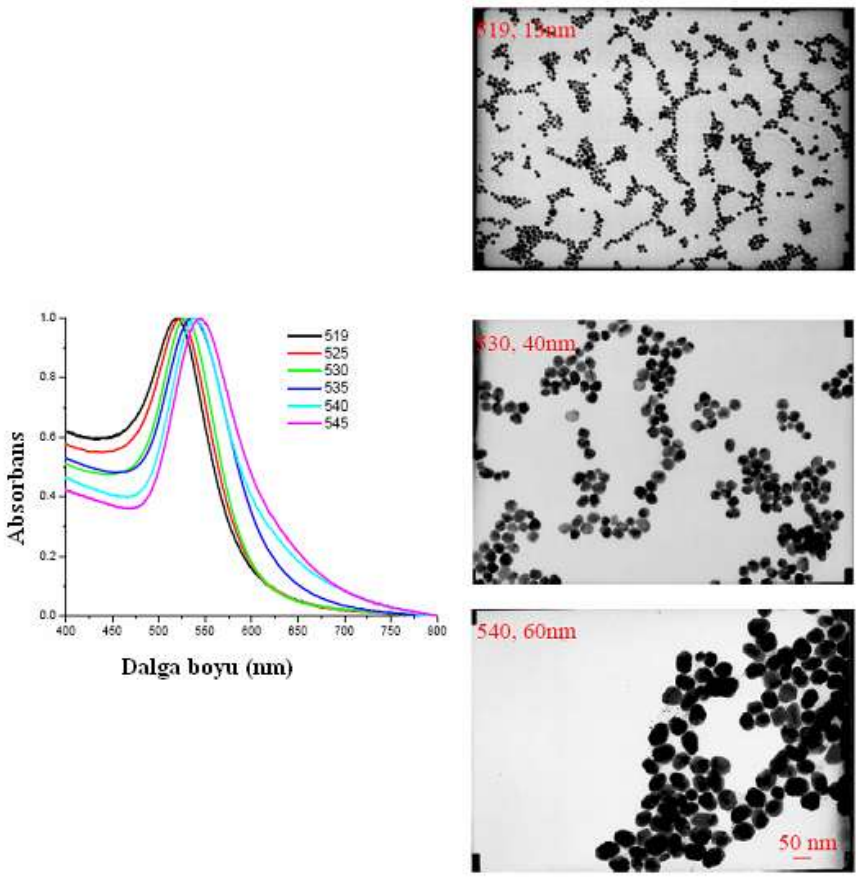
Bizim grubumuz tarafından yapılan bir çalışmada AgNPler ve karbonhidrat molekülleri ile modifiye edilmiş AgNPlerin hücre etkileşimi incelenmiş ve hücre içindeki nanoparçacıkların görüntülenmesi için taramalı konfokal mikroskopu kullanılmıştır. Şekil 2.13'te laktoz modifiye edilmiş AgNPlerin hücre ile inkübe edildikten sonra alınan konfokal mikroskop görüntüsü görülmektedir. NPlerin görüntüsünü alabilmek için yüzey plazmonlarını uyarılması gerekmektedir. AgNPleri görüntüsünü alabilmek için 488 nm dalga boylu lazer ile yüzey plazmonları uyarılmıştır.

NP içeren süspansiyonlarının renkli olması, NP etrafında yüzey plazmonları oluşurken ışığın belirli bir frekansının absorplanmasından kaynaklanmaktadır [76]. Bu yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyu parçacığın şekline, büyüklüğüne, cinsine ve bileşimine bağlı olarak değişmektedir (Şekil 2.14) [77].



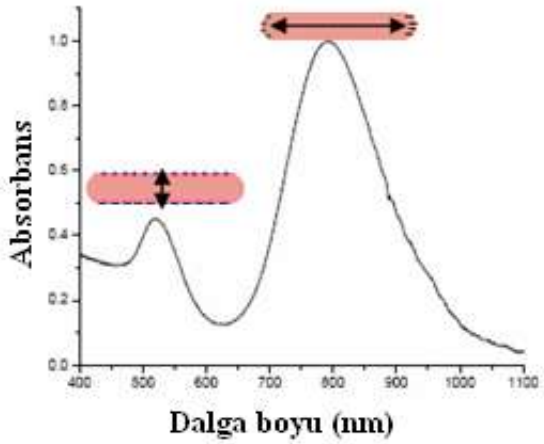
Şekil 2.14 : Au nanoküre (a-e) ve Au nanoçubukların (f-j) artan parçacık büyüklüğüne ve görünüş oranına göre fotoğrafları ve geçirimli elektron mikroskop (TEM) görüntüleri. Altın nanoküreler 4-40 nm arasında iken nanoçubukların görünüş oranı 1,3-5 arasındadır [77].

Şekilde görüldüğü gibi AuNPlerin büyüklüğü arttıkça rengi maviye doğru kaymaktadır. Bunun nedeni yüzey plazmonlarının absorbsiyon dalga boyunun parçacık büyüklüğü arttıkça kırmızıya kaymasıdır. Maddeler her zaman absorpladığı rengin tamamlayıcısı renk olarak görünürler. Bu nedenle AuNPnin absorpsiyon dalga boyu uzun dalga boyuna kaydıkça, süspansiyonun rengi kırmızıdan maviye kayar. Şekil 2.15'te AuNPlerin büyüklüğüne bağlı olarak absorpsiyon dalga boyundaki kaymalar görülmektedir [78]. 13 nm büyüklüğündeki AuNPnin yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyu 519 nm iken, 60 nm büyüklüğündeki AuNPnin dalga boyu 540 nm'dir.



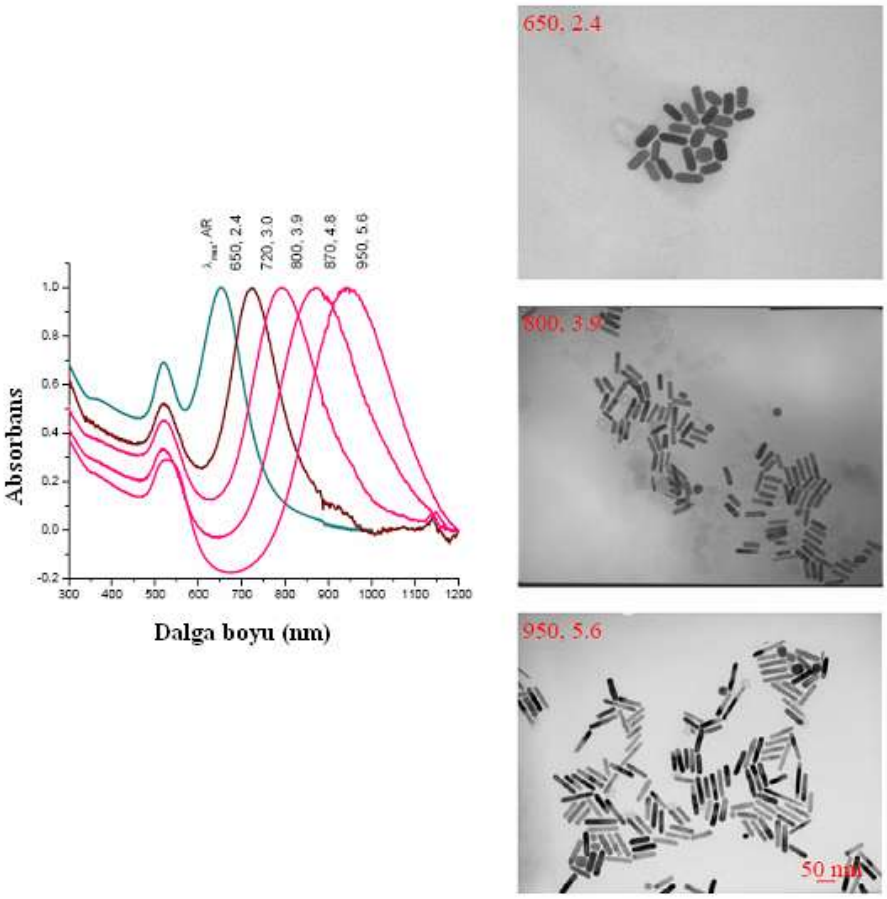
Şekil 2.15 : Farklı büyüklerdeki AuNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumları (sol) ve bazı büyüklüklerinin TEM görüntüleri (sağ) [78].

AgNPler ise 390-450 nm arasında yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyuna sahiptirler. Küçük AgNPler 390 nm civarı absorbans verirken renkleri sarımtıraktır. Ancak NPnin büyüklüğü arttıkça absorpsiyon dalga boyu 450 nm'ye doğru kaymakta ve rengi yeşilimtırak olmaktadır. Au ya da Ag nanoçubuklar ise iki farklı dalga boyunda yüzey plazmon absorpsiyonuna sahiptir (Şekil 2.16).



Şekil 2.16 : Au nanoçubuk için tipik bir yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu [78].

Au nanoçubuğun yüzey plazmon absorpsiyon spektrumdaki zayıf ve kısa dalga boylu olan, NPnin enindeki elektronların salınımı ile oluşan yüzey plazmonlarının absorpsiyon dalga boyu iken, kuvvetli ve IR bölgedeki ise boyundaki elektronlarının salınımı ile oluşan yüzey plazmonlarının absorpsiyon dalga boyudur [78]. Nanoçubuklardaki yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyunun değişimini, nanoçubuklardaki görünüş oranı (aspect ratio) belirlemektedir. Görünüş oranı nanoçubuğun boyunun enine oranıdır (boy/en). Şekil 2.17'de farklı görünüş oranlarına sahip AuNPlerin absorpsiyon spektrumları ve bazılarının TEM görüntüleri görülmektedir [78]. Nanoçubukların görünüş oranı arttıkça boyundan kaynaklanan yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyu kırmızıya kaymaktadır.



Şekil 2.17 : Farklı görünüş oranlarına sahip Au nanoçubukların absorpsiyon spektrumları (sol) ve 2,4; 3,9 ve 5,6 görünüş oranına sahip Au nanoçubukların TEM görüntüleri (sağ) [78].

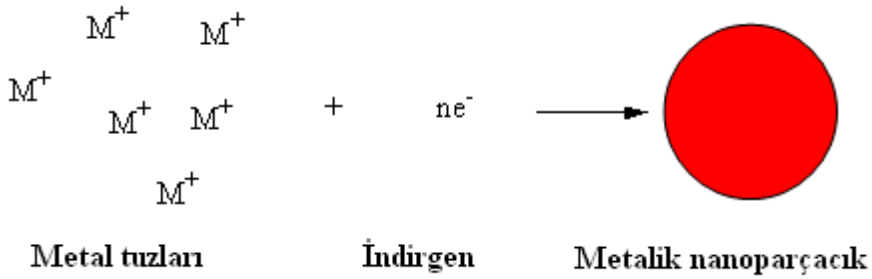
Plazmonik NPlerin bir araya geldiği zaman yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyu kırmızıya kaymaktadır. Nanoparçacıkların bu özelliği kullanılarak renge dayalı birçok maddenin ve biyolojik moleküllerin tayinin yapılabileceği rapor edilmiştir [83-87].

2.4.1 Plazmonik nanoyapıların sentezlenmezi ve hazırlanması

Fotonik, opto-elektronik [32,33,88-94] ve elektronik [94-97]) uygulamalarında kimyasal ve biyolojik algılamalarda [45,98-103] ve medikal tanı ve tedavi [62,65,104,105] uygulamalarındaki gelişen öneminden dolayı, nanoyapıların sentezlenmesi ve hazırlanması gelişen ve aktif olan bir araştırma alanıdır. Metal nanoyapıların büyüklüğü, şekli ve bileşimi kontrol edilerek optik, elektronik ve katalitik özellikleri ayarlanabilmektedir [49,106-110]. Literatürde birçok malzemeden izotropik ve izotropik olmayan farklı şekil ve büyüklükte nanoyapılanın sentezlendiği veya hazırlandığı rapor edilmiştir [109-115]. Nanomalzemelerin hazırlanmasında iki yaklaşım vardır. Bunlar aşağıdan-yukarıya (bottom-up) ve yukarıdan-aşağı (top-down) yaklaşımlarıdır [116]. Yukarıdan-aşağıya olan teknikler çeşitli litografik teknikler ile nanoyapıların düz bir yüzey üzerine hazırlanmasını içerir [117-120]. Oysaki aşağıdan-yukarıya nanoyapıların hazırlanması atomların, moleküllerin veya NPlerin çözeltide veya bir substrat yüzeyinde bir araya gelmesiyle ya da düzenlenmesiyle olur [120-126].

Aşağıdan-yukarı yaklaşımı ile çeşitli ortamlarda farklı büyüklük [127-132], şekil [110,112] bileşim [107,133-135] ve yapıda (metal, çekirdek-kabuk) [136,137] nanoyapılar hazırlanabilmektedir. Bu yöntemde genellikle, metal tuzlarının NPlerin toplanmasını engelleyen ve büyümeyi kontrol eden uygun bir stabilizatör içeren bir çözeltide indirgenmesini içerir. Yaygın olarak kullanılan stabilizatörler nanoparçacık yüzeyine adsorbe veya koordine olarak bağlananan ligandlar, yüzey aktif maddeler, iyonlar, organik asitler veya polimerlerdir. Bu stabilizatörler NPlerin toplanmasını ya kolombik itme kuvvetleriyle ya da sterik engel ile önlerler. Metal tuzlarının indirgenmesi elektrokimyasal [138-142], fotokimyasal [143-146], sonokimyasal [147-149] yöntemle veya kimyasal bir indirgen kullanılarak yapılabilir. Genellikle kimyasal indirgen olarak sitrat [129,132,150], hidrürler [151,152], alkoller [153,154], hidroksilamin [155,156], veya hidrazin [157,158] kullanılmaktadır. İndirgen seçimi, stabilizatör, sıcaklık ve kullanılan kimyasalların oranı NPlerin şeklini ve büyüklüğünü etkiler. Son yıllarda biyomoleküller ve biyolojik yapılar kullanarak NPlerin sentezlenebileceği rapor edilmiştir [159-165]. En yaygın yuvarlak altın nanoparçacık sentezlenmesi, $HAuCl_4$ sulu çözeltisinin sitrat indirgenmesiyle elde edilmiş ve. ilk defa 1951 tarihinde Turkevich tarafından rapor edilmiştir [166]. Bu yöntemde sitrat hem indirgen hem de stabilizatör olarak kullanılmaktadır. Au tuzu

derişimi ile indirgen derişimi oranını değiştirerek daha büyük NPler elde edilebilmektedir [167]. Sitrat indirgenmesiyle gümüş nanoparçacıklarda elde etmek mümkündür [168]. Metal tuzlarından indirgen bir kimyasal kullanılarak metalik NP oluşumu şematik olarak Şekil 2.18'de görülmektedir.



Şekil 2.18 : Metal tuzlarından kimyasal indirgeme yöntemi ile metalik NP hazırlanmasının şematik gösterimi.

Aşağıdan-yukarıya yaklaşımı ile nanoçubuklar da yaygın olarak sentezlenmektedir. Bu sentez yöntemlerinde ilk önce birkaç nanometre büyüklüğünde tohum (seed) NPler sentezlenmektedir. Daha sonra yüzey aktif maddeler kullanılarak tohum üzerine atomların düzenlenmesi sağlanarak nanoçubuklar elde edilmektedir [169,170]. İki metal tuzunun birlikte indirgenmesiyle NP alaşımları sentezlenebilmektedir [133]. Ayrıca çekirdek-kabuk NPler de aşağıdan-yukarı yaklaşımı ile sentezlenmektedir. Çekirdek-kabuk NPlerin çekirdekleri silika, titanyum dioksit ve polistren gibi polimerler [171-173] veya metalik NPlerdir [174-177]. Bu çekirdek NP üzerine ikinci bir metalin kaplanmasıyla çekirdek-kabuk NP elde edilmektedir. Metalik çekirdek-kabuk NPler hazırlanırken çekirdek olacak metalin tuzu indirgenerek öncelikle metalik NPler elde edilir. Bu çekirdek NP üzerine ikinci bir metal tuzu indirgenmesiyle kabuk oluşturulur. Literatürde farklı uygulamalar için Au@Ag veya Ag@Au çekirdek-kabuk NPleri sentezlendiği rapor edilmiştir [178-183].

Yukarıdan-aşağı yaklaşım kullanılarak hazırlanan nanomalzemeler genellikle elektron ışın litografi (Electron Beam Lithograpy; EBL) [184-189] ve odaklanmış iyon ışın litografidir (Focused Ion Beam Lithograpy; FIBL) [190-195]. Bu yöntemler yapıların kontrol edilmesinde önemli bir üstünlüğü vardır. Ancak bu tekniklerin dezavatajları: pahalı, sınırlı örnek büyüklüğü üretebilmesi ve yavaş olmasıdır [196]. EBL 10 nm'lere kadar düşebilen hassasiyeti ve tekrarlabilirliği vaat eder.

2.5 Nanoyapıların Karakterizasyonunda Kullanılan Teknikler

Nanomalzemelerin yapılarının ve yüzeylerinin atomik boyutta karakterizasyonu, nanoyapıların özelliklerinin ve işlevlerinin anlaşılması için büyük öneme sahiptir [197]. Nanomalzemelerin yüzey özelliklerinin ve yapılarını karakterizasyonu için pek çok güçlü teknik mevcuttur. Bu teknikleri genel olarak spektroskopik ve mikroskopik olarak ikiye ayırabiliriz. Spektroskopik teknikler, X-ışınları kırınımı (XRD), enerji dispersif X-ışınları (EDX), X-ışınları fotoelekton spektroskopisi (XPS), IR, Raman ve UV/görünür bölge absorpsiyon spektroskopisi'dir. Buna ek olarak dinamik ışık saçılması tekniği (DLS-Zetasizer)) nanomalzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Mikroskopik teknikler ise taramalı elektron mikroskopu (SEM), TEM, atomik güç mikroskopu (AFM) ve taramalı tünellemeli mikroskopu'dur (STM) [198-204]. Çizelge 2.6'da nanomalzemelerin karakterizasyonunda kullanılan teknikler ve bu tekniklerden alınan bilgilerin kısa bir özeti verilmektedir.

Çizelge 2.6 : Nanomalzemelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan teknikler.

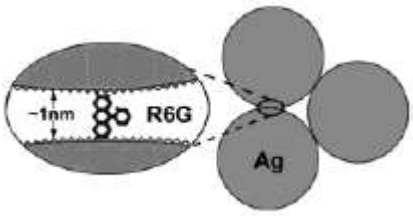
TEKNİK	**ALINAN BİLGİ**
TEM/SEM	Büyüklük/Şekil/Büyüklük Dağılımı
UV/Görünür	Büyüklük/Şekil/Büyüklük Dağılımı
AFM/STM	Büyüklük/Şekil/Büyüklük Dağılımı
X-Işınları	Bileşim/Büyüklük/Büyüklük Dağılımları
Zetasizer	Büyüklük/Büyüklük Dağılımı
IR/Raman	Bileşim

2.6 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (YZRS)

YZRS, kolloidal metal NPler (gümüş, altın ve bakır) yüzeyine veya bu metaller kullanılarak oluşturulan ince film yüzeylerine adsorplanmış örneklerin, Raman spektrumlarını elde etmeye ilişkindir [205,206].

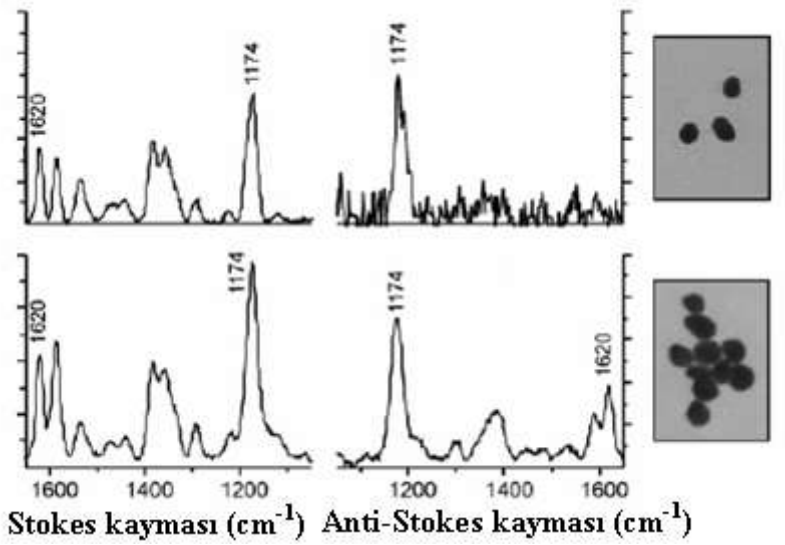
YZRS ilk olarak 1974 yılında Fleischmann ve arkadaşları tarafından piridin molekülünün pürüzlendirilmiş Ag elektrot yüzeyindeki Raman saçılmasının zenginleşmesiyle keşfedilmiştir [207]. Ayrıca Jeanmaire ve Van Duyne (1977) [208] ve Albercht ve Creighton (1977) [209] birbirlerinden bağımsız olarak pürüzlü Ag elektrot yüzeyinde Raman saçılmasında bir zenginleşme elde etmişlerdir. O yıllarda Jeanmaire ve Van Duyne saçılmadaki zenginleşmenin elektik alan zenginleşmesiyle olduğunu, ancak Albercht ve Creighton metal yüzey ile molekülün elektronik seviyeleri arasındaki etkileşimden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir [210]. Şu an ise genel kabul gören iki mekanizma vardır. Bu mekanizmaladan birincisi elektromanyetik zenginleştirme [211,212] ikincisi ise kimyasal zenginleştirmedir [213,214]. Elektromanyetik zenginleştirmeye sebep olan, NPlerin kendi etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlarından kaynaklanmaktadır. Raman saçıcılar bu yoğun elektromanyetik alan ile etkileştikleri zaman, indüklenmiş dipol moment büyüklüğü artar ve buna bağlı olarak ta elastik olmayan Raman saçılmasının şiddeti artar [215]. Kimyasal zenginleştirmeye sebep olan ise metal ile moleküller arasındaki yük transferidir. Bu zenginleştirmenin etkisi ($10\text{-}10^2$) elektromanyetik zenginleştirmenin etkisinden ($10^{4\text{-}7}$) çok daha düşüktür [210,215]. YZRS deneylerinde kullanılan nanometal malzemelere YZRS substratı denmektedir. Kolloidal NPler [216-220], buharlaştırma yöntemi ile hazırlanmış yüzeyler [221-223], elektrot yüzeyleri [224-228], litografik yöntemlerle hazırlanmış iki ve üç boyutlu yüzeyler veya yapılar [229-236] ve özel derleme yöntemleri ile hazırlanan yüzeyler ve yapılar [237-241] yaygın olarak YZRS substratı olarak kullanılmaktadır. Genellikle yapılan YZRS deneylerinde zenginleştirme faktörü 10^4-10^8 arasındadır [242-248]. Ancak tek bir molekülün tayin edilebileceği bazı gruplar tarafından rapor edilmiştir [249-252]. Tek bir molekülün tayini için hesaplanan zenginleştirme faktörü 10^{14}'tür. Zenginleştirmeye ana katkısı elektromanyetik zenginleştirme olduğundan, nanomalzemelerin plazmonik özellikleri yeni YZRS subtratı tasarımında kilit noktadır. Yüksek zenginleştirme faktörüne sahip YZRS substratları hazırlamak için NPlerin cinsinin [253,254], büyüklüğünün [255-259], şeklinin [260-268], toplanma

durumlarının ve özelliklerinin [269-272], NPnin ve analitin yüzey yükünün [272-276] çok iyi düşünülmesi gerekmektedir. Son yıllardaki yapılan çalışmalar, parçacıklar arasındaki mesafenin de YRZS deneylerinde önemli rol oynayan bir parametre olduğunu ortaya koymuştur [277-283]. NPlerin bir araya gelmesi dolayısıyla yüzey plazmonlarının birbiriyle çakışmasıyla oluşan bölgeye sıcak-nokta (hot-spot) adı verilmektedir. Bir sıcak-nokta oluşumu için parçacıklar arasında belirli bir mesafe olması gerekmektedir. Bu mesafe genellikle 1-4 nm aralığındadır [284,285]. Parçacıklar arasındaki mesafe azaldıkça zenginleştirme faktörü artmaktadır [278,283]. Bu mesafe 1 nm olduğunda ise tek bir molekülün tayin edilebileceği rapor edilmiştir (Şekil 2.19) [283,285].



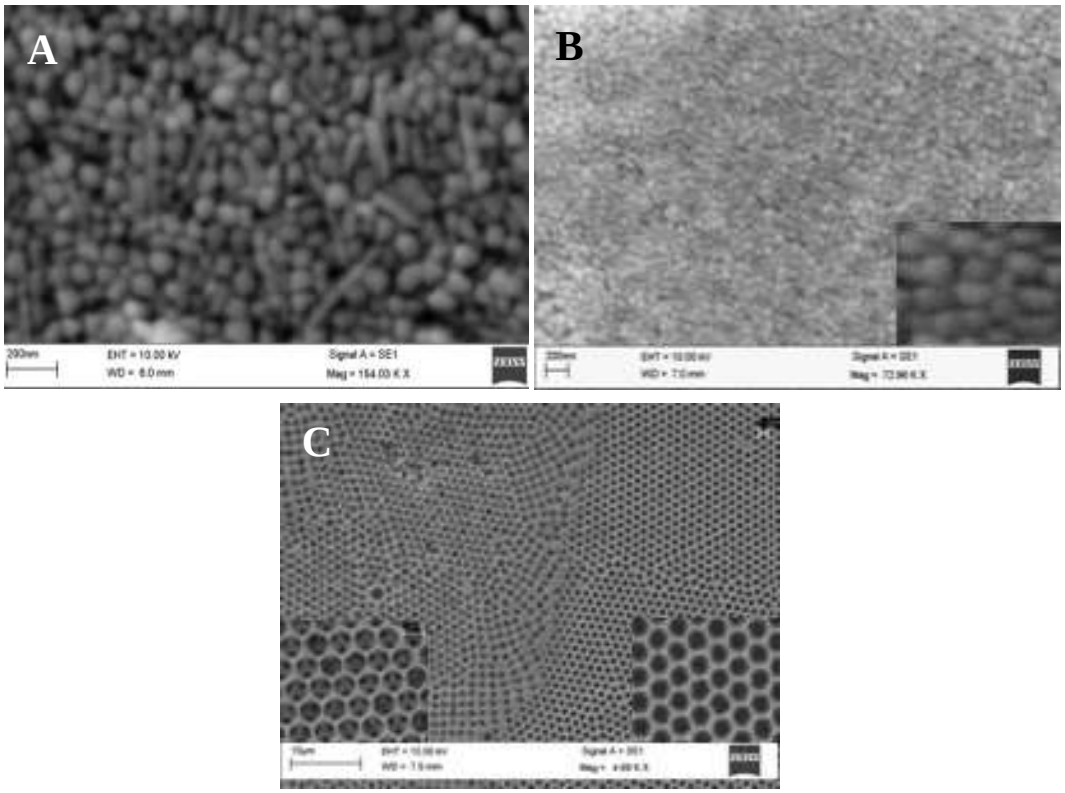
Şekil 2.19 : İki NP arasındaki tek bir molekülün şematik gösterimi [283].

Yukarıda bahsedilen YZRS performansını etkileyen parametrelerden bir tanesi de kullanılan ışın kaynağının dalga boyudur. Çünkü yüzey plazmonu oluşumu için ışın kaynağına ihtiyaç vardır. Parametreleri tek tek ele aldığımızda, NP cinsi, AgNPler, AuNPlere göre ortalama zenginleştirme faktörü aynı büyüklük ve şekilde 10-100 kat daha fazladır [253,287]. Bu nedenle genellikle AgNPler tercih edilmektedir. NPnin büyüklüğüne baktığımızda ise küçük NPlerin zenginleşirme faktörü düşük iken büyük NPlerin zenginleştirme faktörü büyüktür. Genellikle optimum YZRS deneylerinde 50 nm'den büyük Au ve AgNPler kullanılmaktadır. NPlerin toplanma özelliklerine baktığımızda toplanan NPlerden alınan spektrumun, serbest haldeki NPlerden alınan spektrumlardan 10^7 kere daha şiddetli olduğu deneysel olarak bulunmuştur (Şekil 2.20) [269].



Şekil 2.20 : Toplanmamış (alt) ve toplanmış (üst) AuNPlere tutunmuş crystal violet boyasının Stokes ve Anti-Stokes YZRS spektrumları [269].

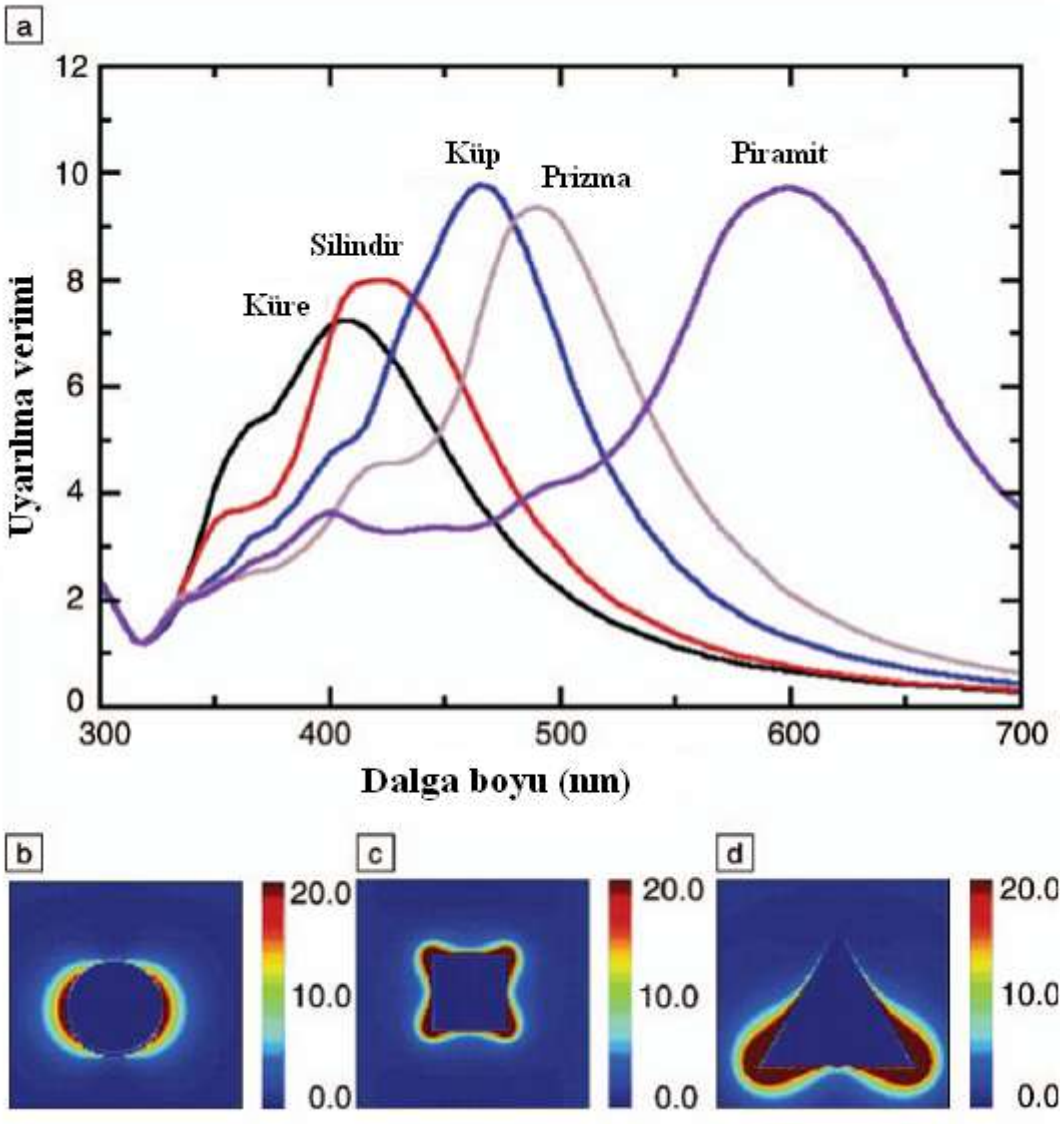
NPlerin toplanma durumlarında ise yığıntı boyu ve yığıntı içerisindeki nanoparçacıkların oryantasyonunun çok önemli parametreler olduğu rapor edilmiştir [270,271]. En son yapılan çalışmada yığıntı boyutu küçüldükçe YZRS zenginleşme faktörünün arttığı gözlemlenmiştir [271]. NPnin veya analitin yüzey yükleri analit ile metal yüzeyi arasındaki etkileşimi belirlediğinden önemli parametrelerdir. Literatürde yapılan çalışmalarda NP ile aynı yüke sahip olan analit ile zıt yüke sahip analit incenmiş ve zıt yüklere sahip olan analitin Raman saçılması hem NP ile analitin etkileşimi, hem de bu etkileşim sonucu azalan yüzey yükü nedeniyle oluşan yığıntılar sebebiyle çok daha zengindir [272]. Lazerin dalga boyu ise yüzey plazmonlarını oluşturduğu için kullanılan substrata göre lazerlerin seçimi çok büyük önem arz etmektedir. NPnin büyüklüğü arttıkça yüzey plazmonların absorbsiyon dalga boyunun kırmızıya kaydığı, dolayısıyla iyi bir Raman saçılması elde etmek için büyük NPler için uzun dalga boylu lazerlerin kullanılması gerektiği rapor edilmiştir [288]. Ayrıca, NPler yığıntılar oluşturduğu zaman ise yüzey plazmonların absorpsiyon dalga boyu plazmon-plazmon eşleşmesinden dolayı kırmızıya kaymaktadır [289]. Bu nedenle yine uzun dalga boylu lazerler kullanılarak YZRS spektrumu alınması gerektiği rapor edilmiştir [249,269]. Bizim laboratuarlarımızda hazırlanan ve kullanılan YZRS subtratlarının bir kısmı Şekil 2.21'de gösterilmektedir.



Şekil 2.21 : Kolloidal AgNPler (A), AgNPler kullanılarak oluşturulan iki (B) ve üç (C) boyutlu nanoyapılar.

NPlerin optiksel özelliklerini ilk defa 1908'de Gustov Mie tarafından Maxell eşitlikleri çözülerek hesaplanmıştır [290]. Bu hesaplamada yuvarlak NPler (d<30 nm) NPnin ve çevresindeki ortamın homojen olduğu varsayılmıştır. Ancak yuvarlak olmayan ve büyük NPlerin optik özelliklerinin hesaplanması (rezonans frekansları, NP yüzeyindeki yerel alan zenginleştirmesi, absorpsiyon, saçılma ve uyarılma verimleri) için T-matrix metodu [291], discrete dipole approximation (DDA) [292,293] veya finite-differences time-domain simulations (FDTD) [294,295] gibi nümerik yöntemler kullanılmaktadır. Özellikle YZRS deneylerinde NP etrafında oluşan yüzey plazmonlarının özelliği zenginleştirme faktorü ile doğrudan ilişkilidir. Zenginleştirme faktörü yaklaşık olarak NP etrafında oluşan elektrik/elektomanyetik alanın (E) dördüncü kuvveti $|E|^4$ ile doğrudan orantılıdır [45]. Bu nedenle NPlerin etrafında oluşturdukları elektrik alanın şiddetinin hesaplanması, YZRS deneylerini etkileyen tüm parametrelerin optimize edilmesini sağlamaktadır. Yukarıda bahsedilen teorik modellemelerle optik özellikleri belirlenerek maksimum zenginleştirme faktörü elde edilebilecek deneysel koşullar sağlanabilmektedir.

Şekil 2.22'de farklı şekillerde hazırlanan AgNPlerin yüzey plazmonlarının uyarılma verimliği ve plazmon dalga boyları ve etrafında oluşturdukları elektrik alan şiddeti DDA metodu ile hesaplanmıştır [45].



Şekil 2.22 : Farklı şekillerdeki AgNPlerin uyarılma verimleri (a), küre (b), küp (c) ve piramit AgNPlerin etrafında oluşan yüzey plazmonlarının simulasyonu. Küre, küp ve pramit NPler için hesaplalan $|E|^2$ değerleri sırasıyla 54, 745 ve 9770'dir [45].

Şekil 2.22'de görüldüğü gibi her bir NP kendine özgü bir yüzey plazmon dalga boyuna sahiptir. NPlerin maksimum yüzey plazmon absorpsiyon dalga boyunda uyarıldıklarında etrafında oluşan elektrik alanının şiddeti hesaplanmış ve teorik simülasyon olarak Şekil 2.22 b-d'de verilmektedir. Hesaplanan $|E|^2$ değerleri küre için 10^2 iken piramit için 10^4'tür. Zenginleştirme faktörünü hesapladığımızda ($|E|^4$) ise zenginleştirme faktörünün piramit NPler için en yüksek (10^8) olduğunu buluruz.

Ayrıca şekilde görüldüğü gibi yüzey plazmonlarının oluştuğu yerler ve şekilleri farklılık göstermektedir.

YZRS biyolojik ve biyolojik olmayan moleküllerin ve yapıların tanısı, tayini, karakterizasyonu ve görüntülenmesi için kullanılan güçlü bir tekniktir. Özellikle suyun zayıf Raman saçıcısı ve örnek hazırlamanın kolay ve hızlı olmasından dolayı, biyolojik moleküllerin ve organize olan biyolojik yapıların karakterizasyonunda umut verici bir tekniktir. Literatürde amino asitlerin [296-298], peptitlerin [298-301], proteinlerin [302-308], oligonükleotitlerin ve DNA'nın [309-317], karbonhidratların [318,319], virüslerin [320,321], bakterilerin [322-340], mayaların [341,342], hücrelerin [343-350] ve dokuların [351,352] YZRS ile tanısı, tayini, karakterizasyonu veya görüntülenmesi üzerine bir çok çalışma rapor edilmiştir. Bu çalışmalar ya doğrudan moleküllerin parmak-izi özelliğinden Raman spektrumları kullanılarak yapılmış, ya da NPlerin yüzeyi Raman aktif bir molekül ile beraber oligonükleotitler, peptitler veya antikorlar ile modifiye edilerek tayin, karakterizasyon veya görüntüleme yapılmıştır. Elde edilen Raman spektrumu her bir moleküle özgü olduğundan, Raman spektroskopisinde çoklu analiz (multiplexing) yapılabilmektedir. Literatürde YZRS ile bir çok biyolojik molekül ve yapının çoklu analiz edilebileceği rapor edilmiştir [316,317,339].

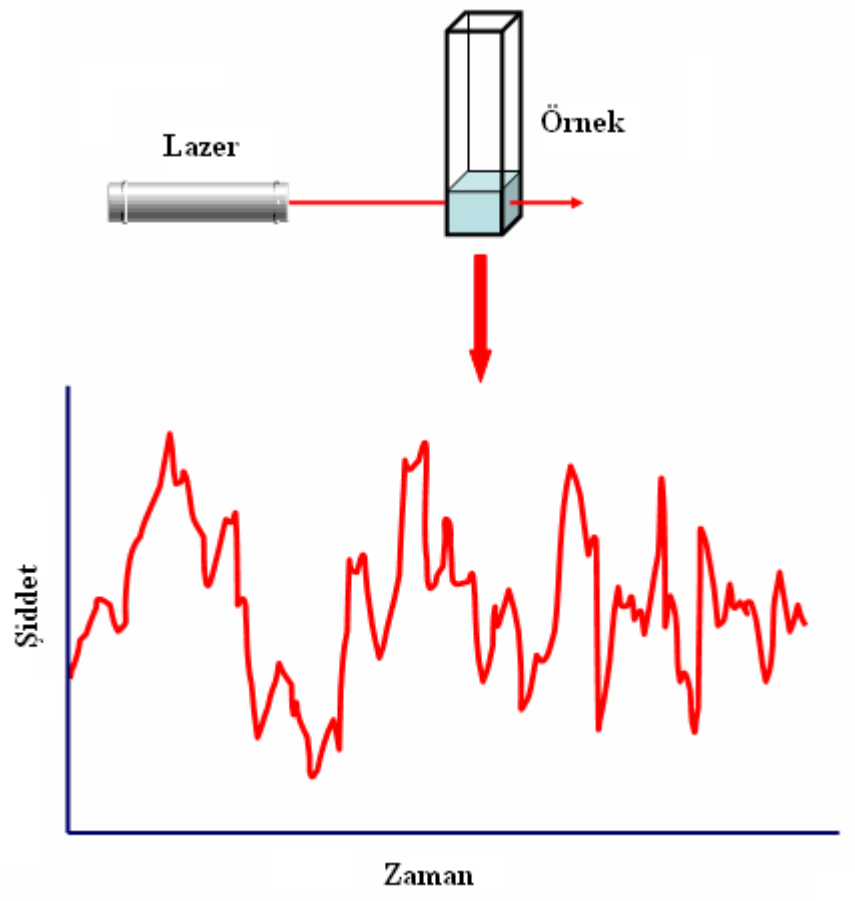
2.7 Zetasizer Cihazı

Zetasizer cihazı sıvı ortamlardaki parçacıkların veya moleküllerin üç karakteristik özelliğini ölçmek için kullanılır. Bu üç temel özellik; kolloidal süspansiyonlardaki parçacıkların veya moleküllerin büyüklük dağılımları, yüzey yükleri (zeta potansiyel) ve moleküler ağılıklarıdır. Büyüklük dağılımlarını dinamik ışık saçılması (Dynamic Light Scattering, DLS), moleküler ağırlıklarını ise statik ışık saçılması (Static Light Scattering, SLS) tekniği ile yapmaktadır. Zeta potansiyel ölçümlerini de lazer doppler elektroforez (Laser Doppler Electrophoresis, LDE) ölçüm tekniği ile yapmaktadır [353].

2.7.1 Büyüklük teorisi

Bir çözelti içerisindeki parçacıklar, etrafını çevreleyen çözücü moleküllerinin bombardımanı nedeniyle rastgele hareket halindedir. Bu harekete Brownian hareketi (Brownian motion) denir. Küçük parçacıklar daha hızlı hareket ederken, büyük

parçacıklar daha yavaş hareket etmektedir. Bu hareketin hızı "çevrimsel difüzyon katsayısı" (translational diffusion coefficient) (D) olarak tanımlanır. Dinamik ışık saçılması, saçılan ışık şiddetinin zamana bağlı dalgalanmalarını ölçerek (D) katsayısının belirlenmesinde kullanılır (Şekil 2.23).



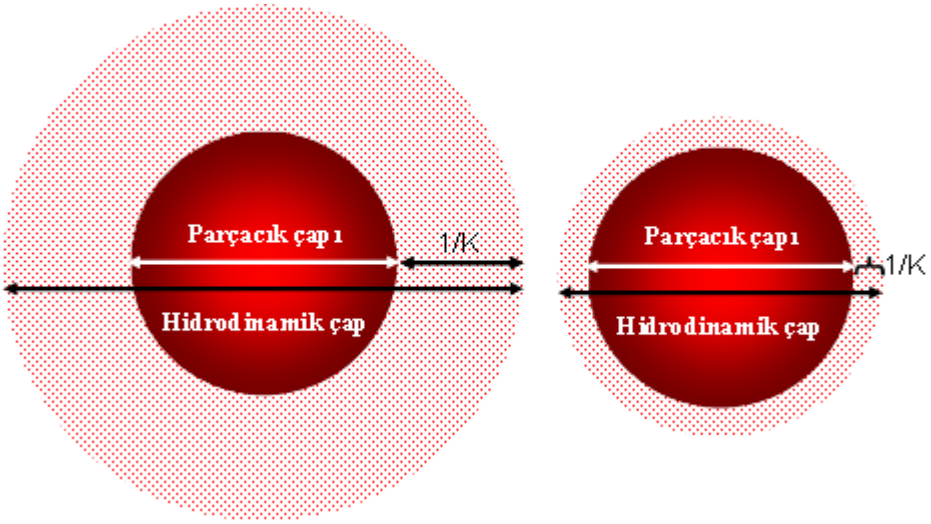
Şekil 2.23 : Zamana bağlı olarak saçılan ışık şiddetin dağılımı [353].

Dolayısı ile bir süspansiyon içerisindeki maddelerin Stokes-Einstein eşitliğini (Eşitlik 2.9) kullanarak hidrodinamik çapının bulunmasını sağlar.

$$d(H)= kT/3\pi\eta D \qquad \textbf{(2.9)}$$

- d(H): Hidrodinamik çap.
- k: Boltzmann sabiti.
- T: Sıcaklık.
- η: Viskozite.
- D: Çevrimsel difüzyon katsayısı.

Hidrodinamik çap, parçacığın etrafında oluşan elektriksel çift tabaka ile birlikte oluşturduğu büyüklüktür. O yüzden her zaman hidrodinamik çap, parçacık boyutundan daha büyüktür. Şekil 2.24'te hidrodinamik çapın ortamın iyonik şiddetine bağlı olarak değişiminin şematik gösterimi görülmektedir.



Şekil 2.24 : Düşük (sol) ve yüksek (sağ) iyonik şiddetli ortamlardaki parçacıkların hidrodinamik çaplarındaki değişimlerin şematik gösterimi [353].

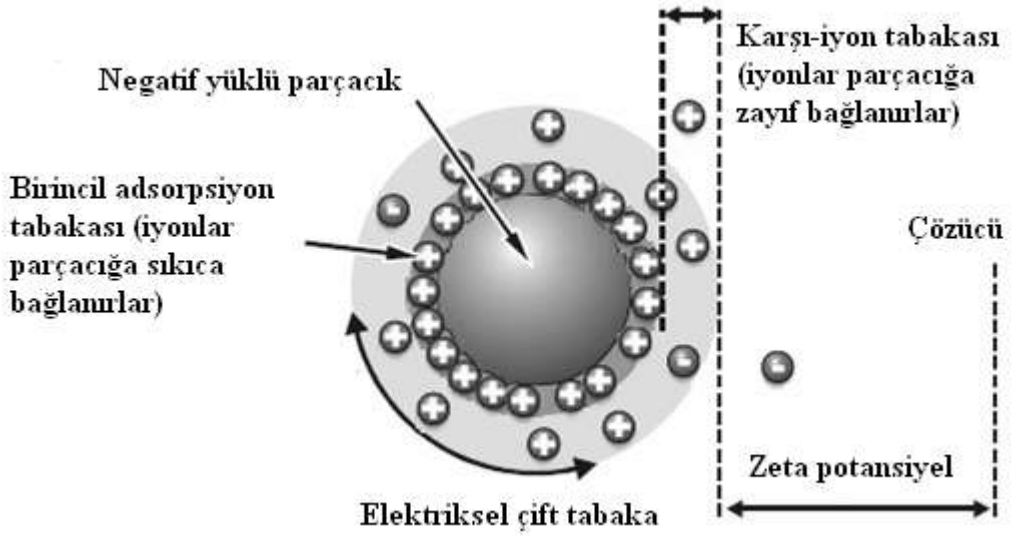
1/K (Debye uzunluğu) elektriksel çift tabakanın kalınlığıdır. Bu kalınlık çözeltinin iyonik şiddetine bağlı olarak değişmektedir. Düşük iyonik şiddetli (örn. su) ortamlarda bu kalınlık daha fazladır.

2.7.2 Moleküler ağırlık teorisi

Moleküler ağırlık ölçümleri SLS tekniği ile yapılır. Bu teknikte de lazer ışını örnek üzerine gönderilir. Bu teknikte saçılan ışının zamana bağlı dalgalanmaları değil de zaman-ortalanmış (time-averaged) saçılan ışık şiddetleri ölçülür. Bu ölçümler sonucunda parçacıkların moleküler ağırlıkları (M_A) ve 2. viral katsayısı (A_2) belirlenebilir. İkinci viral katsayısı çözücü veya dispartant ile parçacıkların arasındaki etkileşim gücünü/kuvvetini tanımlayan bir özelliktir. Eğer $A_2>0$ ise, parçacık kendinden çok çözücü molekülerini çok seviyor demektir. Dolayısıyla kararlı kalma eğilimindedir. $A_2<0$ ise, parçacık çözücüden çok kendini sevmektedir ve toplanma eğilimindedir. $A_2=0$ ise de parçacık-parçacık etkileşimi ile parçacık-çözücü etkileşim derecesi eşittir. Böyle durumlarda çözücü teta çözücü olarak tanımlanır.

2.7.3 Zeta potansiyel teorisi

Çoğu sıvı iyonlar içerir ve bu iyonlar anyon veya katyon olarak adlandırılan negatif veya pozitif yüklü atomlardır. Yüklü bir parçacık bir sıvı içerisinde süspanse edildiğinde, sıvı içerisindeki zıt yüklü iyonlar parçacık yüzeyi tarafından çekilecektir. Negatif yüklü parçacıklar sıvıdan pozitif yüklü iyonları, pozitif yüklü parçacıklar ise negatif yüklü iyonları kendisine çekerler. Bir parçacığın sıvı ortamdaki iyonlarla etkileşimi şematik olarak Şekil 2.25'te gösterilmektedir. Negatif yüklü bir parçacık, iyonlar içeren bir sıvı ortamında süspanse edildiğinde parçacığın yanında olan zıt yüklü iyonlar parçacığı sıkıca bağlanırlar. İkinci tabaka olarak da zayıf bağlanan iyonlardan oluşur. Bu iki tabaka elektriksel çift tabakayı oluştururlar. Çözücü sıvı ile parçacık arasında bir potansiyel ortay çıkar. Bu potansiyel, parçacık ile çözücü sıvısı arasındaki mesafeyle değişir. Bu potansiyel zeta potansiyel olarak adlandırılır.



Şekil 2.25 : Parçacık üzerinde oluşan tabakaların şematik gösterimi [353].

Zetasizer cihazı, zeta potansiyel değerini parçacıkların elektroforetik hareketliliğini (mobility) belirleyerek ve Henry eşitliğini kullanarak hesaplar. Elektroforetik hızları örnek üzerinde elektroforez deneylerinin yapılması ve parçacıkların hızlarının LDE ile ölçümü ile elde edilir. Bir çözelti içerisindeki veya bir süspansiyon içerisindeki yüklü parçacıklara bir elektrik alanı uygulandığında moleküller veya parçacıklar zıt yüke sahip elektrotlara doğru hareket ederler. Ancak viskozite güçleri bu parçacıkların hareketlerin tersine rol oynar. Bu iki zıt güç dengeye geldiklerinde parçacıklara sabit bir hızla hareket ederler. Bu hareket eden parçacıkların hızı aşağıdaki parametrelere bağlıdır.

- Uygulanan elektrik alan şiddetine
- Ortamın dielektrik sabitine
- Ortamın viskozitesine
- Zeta potansiyeline

Bu parçacıkların hızına genellikle elektroforetik hareketlilik denir. Henry eşitliği (Eşitlik 2.10) kullanılarak parçacıkların zeta potansiyeli elde edilir.

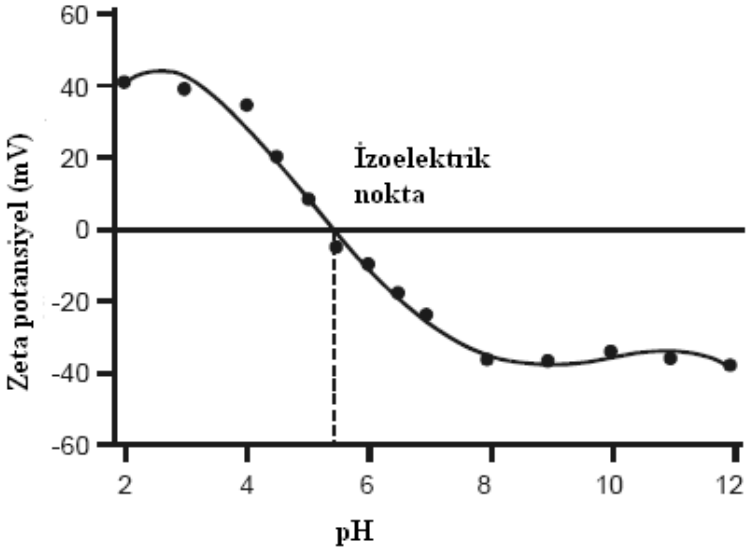
$$U_E = \frac{2\varepsilon z f(ka)}{3\eta} \quad \textbf{(2.10)}$$

- U_E : Elektroforetik haraketlilik
- z: Zeta potansiyel
- η: Viskozite
- ε: Dielektrik sabiti
- f(ka): Henry fonksiyonu

K: elektiksel çift tabakanın kalınlığındaki (1/K)'dır. A ise paraçacığın yarıçapıdır. Ka fonsiyonu parçacığın yarıçapının elektriksel çift tabaka kalınlığına oranıdır. Bu Henry fonksiyonu ortamın polaritesine bağlı olarak ya 1,0 ya da 1,5'tur. Eğer polar bir ortam var ise f(Ka) değeri 1,5,, apolar bir ortam var ise 1,0 olarak hesaplamalarda kullanılır.

Zeta potansiyelin büyüklüğü kolloidal sistemlerde kararlılığın bir göstergesidir. Eğer süspansiyon içerisindeki parçacıklar çok büyük negatif veya pozitif zeta potansiyele sahipse birbirlerini iterler ve çökme eğilimi göstermezler. Eğer küçük zeta potansiyel değerlerine sahipler ise bir araya gelme eğilimleri ve çökme olasılıkları yüksektir. Bir süspansiyonun kararlı kalabilmesi için zeta potansiyelinin ±30 mV'den büyük olması gerekmektedir. Zeta potansiyel değerini etkileyen en önemli faktör pH'dır. Mesela zeta potansiyeli eksi olan bir süspansiyon içerisine baz eklemesi yapılırsa, süspansiyon daha negatif bir değer alır. Eğer asit eklenirse yüzey yükü nötürleşecek ve bir noktada nötr olur. Eğer asit eklemeye devam edilirse süspansiyon pozitif yüke sahip olur. Bu yüzden kolloidal sistemler genellikle zeta potansiyel yüksek pH'larda negatif veya düşük pH'larda pozitif değer alır. Zeta potansiyelin sıfır olduğu yere

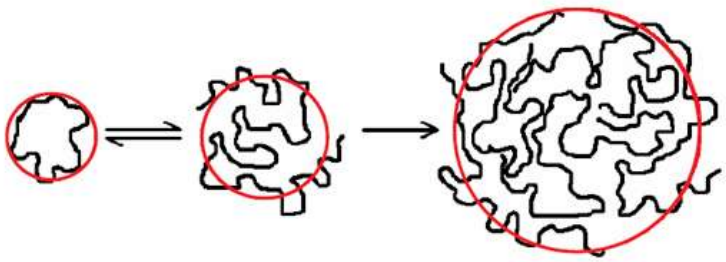
izoelektrik nokta denir ve süspansiyonun en kararsız olduğu pH'dır. Zeta potansiyelinin pH'ya bağlı olarak değişim grafiği Şekil 2.26'da görülmektedir.



Şekil 2.26 : Zeta potansiyelinin pH'ya bağlı olarak değişimi [353].

2.7.4 Zeta potansiyel ve büyüklük dağılımına sıcaklık etkisi

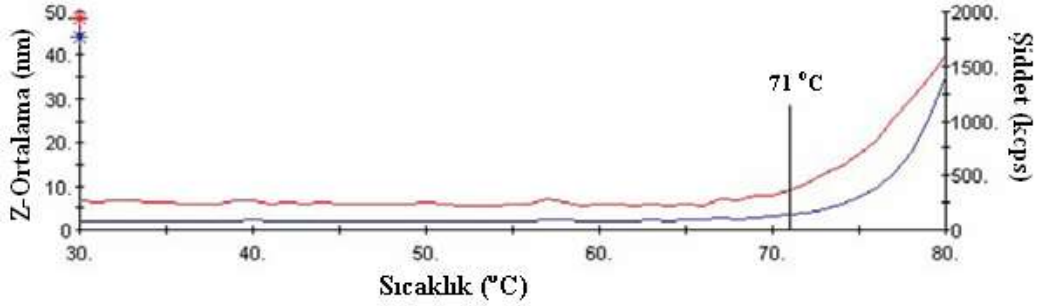
Zetasizer cihazı sıcaklığa bağlı olarak hem büyüklük dağılımı hem de zeta potansiyel değişimi ölçebilmektedir. Özellikle sıcaklığa bağlı olarak büyüklük değişimi gösteren polimerler ve proteinler bu cihaz ile test edilebilmektedir. Proteinlerin erime/denatürasyon sıcaklıklarının bulunması bu cihaz ile çok kolay yapılabilmektedir. Proteinler denatürasyonu sırasında zayıf olan bağlar koptuğundan, daha sıkı halden daha geniş hacimlere geçerler. Şekil 2.27'de proteinlerin sıcaklıkla zayıf bağların koparak hidrodinamik çapındaki büyüme şematik olarak gösterilmiştir [354].



Şekil 2.27 : Sıcaklıkla proteinin denatürasyonu sonucu büyüklük değişiminin şematik gösterimi [354].

Denatürasyon sırasında molekülde bir büyüme gerçekleştiğinden, bu teknik ile proteinlerin sıcaklığa bağlı denatürasyon profili belirlenebilmektedir. Zetasizer ile

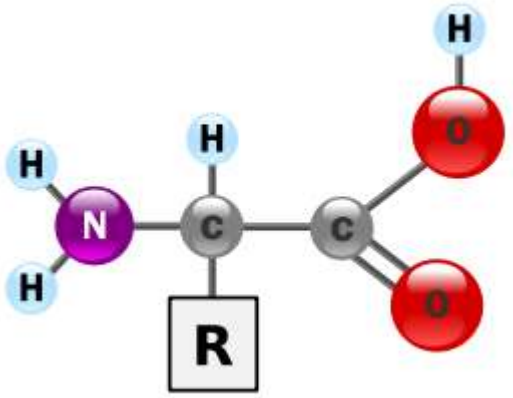
ovalbüminin PBS çözeltisi içerisindeki sıcaklığa bağlı olarak denatüre olması Şekil 2.28'da verilmiştir ve görüldüğü gibi sıcaklık değişimine bağlı olarak boyut ve şiddet değişmektedir. 71 °C'ye ulaşıncaya kadar herhangi bir boyut ve saçılma şiddeti değişimi gözlenmezken, 71 ^{o}C'den sonra aniden molekülün büyüklüğü ve dolayısla saçılma şiddeti artmaktadır. İşte bu nokta proteinin denatürasyon noktası olarak belirlenmektedir [354].



Şekil 2.28 : Ovalbüminin PBS içerisindeki sıcaklıkla denatürasyon eğrisi. 71 °C proteinin denatürasyon sıcaklığı olarak tayin edilmiştir [354].

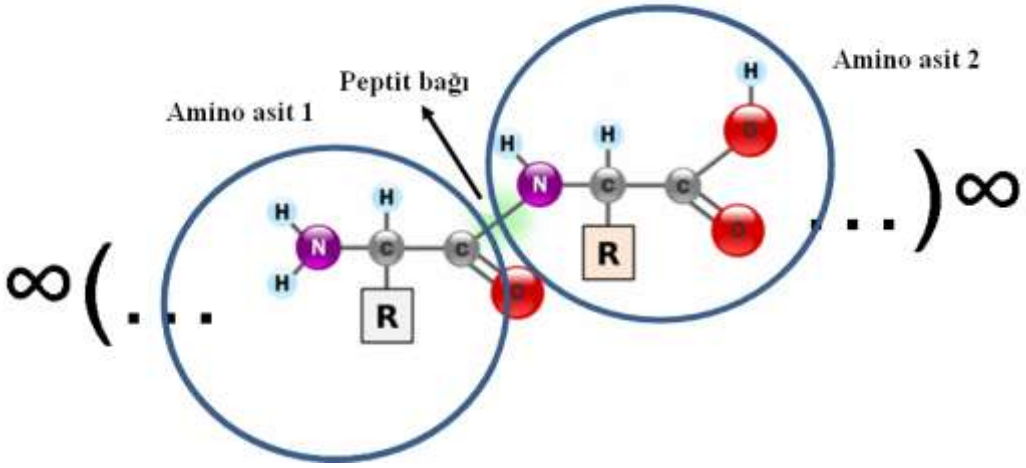
2.8 Proteinler

Proteinler canlılığın yürümesinde hayati öneme sahip biyomakromoleküller olup 20 farklı L-α-amino asitten (Şekil 2.29) oluşan uzun zincir halindeki polimerlerdir [355].



Şekil 2.29 : Amino asitin kimyasal yapısı.

Polimer zinciri (polipeptit), amino asitlerin peptit bağı olarak isimlendirilen ve bir amino asitin amin grubunun diğer amino asitin karboksil grubuna katılımıyla oluşmuş bağ ile bağlanmıştır (Şekil 2.30).

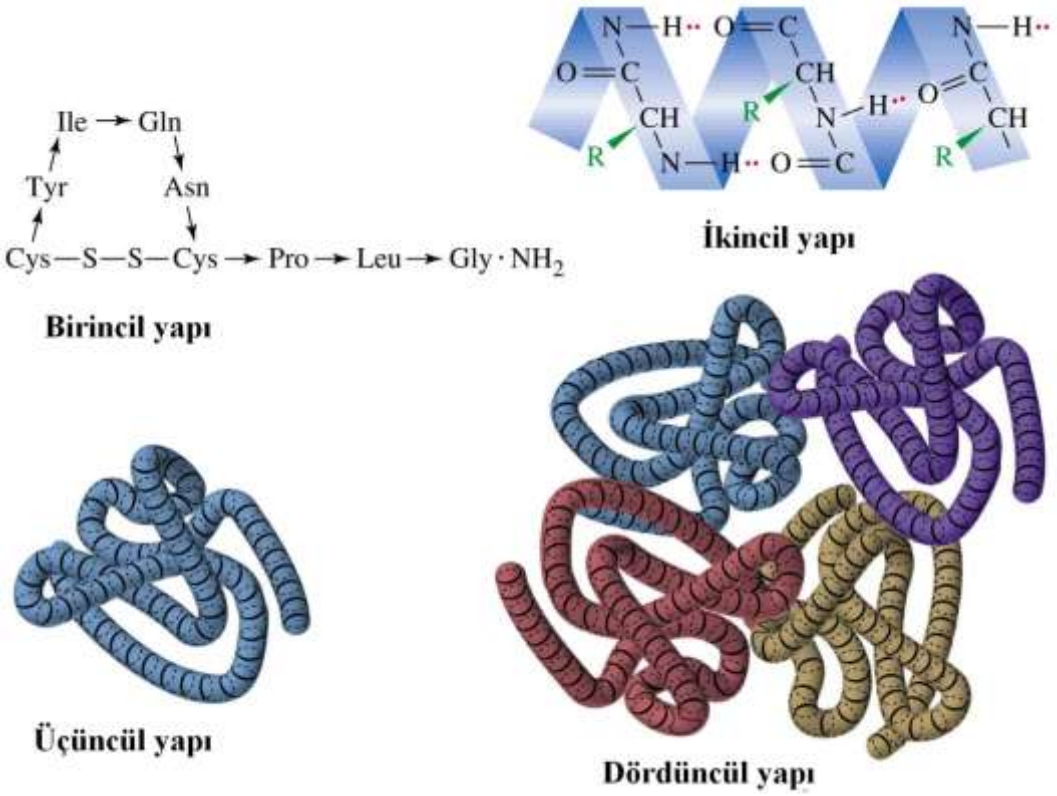


Şekil 2.30 : Polipeptit oluşumunun şematik gösterimi.

Proteinleri oluşturan amino asitlerin yan gruplarının kimyasal yapılarındaki çeşitlilik nedeniyle amino asit dizilimi bir proteinin işlevleri belirlenirken aynı zamanda proteinin üç boyutlu yapısının oluşmasına karar vermektedir. Proteinler canlı organizmaların çok önemli işlevlerini üstlenirler. Proteinler aşağıdaki işlevlerine göre sınıflandırabiliriz.

1. Enzim olarak görev alanlar (Pepsin, Amilaz)
2. Taşımada görev alanlar (Hemoglobin, Serum Albumin)
3. Besin ve depo proteinleri (Kazein (besin), Ferritin (depo))
4. Kasılma-gevşemede veya harakette rol oynayan proteinler (Aktin, Miyosin)
5. Yapısal proteinler (Kollajen, Keratin)
6. Savunmada rol alan proteinler (İmmunoglobulinler)
7. Düzenleyici proteinler (Hormonlar)

Yukarıda görüldüğü gibi proteinlerin hayati önemi olan birçok göreve sahiptir. Bir proteinin fizyolojik aktivitesinin belirlenmesinde amino asit sayısı ve diziliş sırası yanında üç boyutlu yapısı da son derece önemlidir. Proteinlerin yapısını 4 grupta inceleyebiliriz. Şekil 2.31'de proteinlerin yapılarını göstermektedir.



Şekil 2.31 : Proteinlerin yapıları [355].

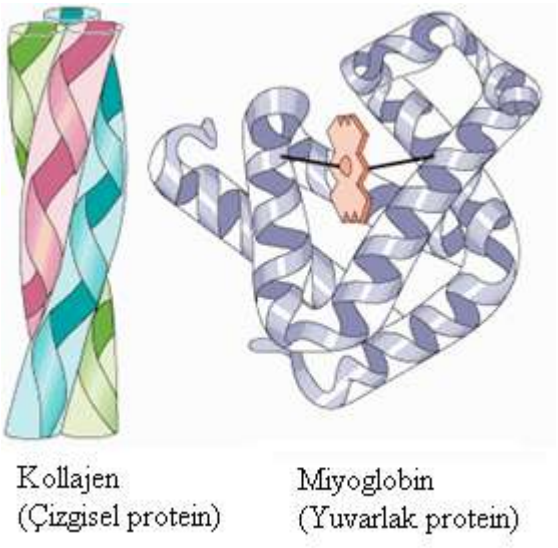
Birincil yapı: Bir proteini oluşturan amino asitlerin sayısı, türü ve diziliş sırasıdır ve proteine özgüdür. Bu proteinin biyolojik ve fizikokimyasal özelliklerini belirler.

İkincil yapı: Ana zincirdeki amin ve karboksil grupları arasındaki hidrojen bağlarıyla oluşan α-heliks veya β-levha yapılarıdır.

Üçüncül yapı: Proteinin tamamının şeklidir ve proteini oluşturan amino asitlerin yan zincirinde bulunan gruplar etkilidir. Üçüncül yapı oluşumunda bir çok zayıf etkileşimler rol oynar. Bunlara iyonik etkileşimler, hidrojen bağları ve hidrofobik etkileşimler örnek verilebilir..

Dördüncül yapı: Bazı proteinler iki ve daha fazla polipeptit zincirinden oluşmaktadır.

Proteinler iki faklı şekilde katlanırlar. Buna bağlı olarak proteinler yuvarlak (globular) ya da çizgisel (fibrous) yapıdadırlar (Şekil 2.32). Bu yapının oluşması dizide bulunan amino asitin cinsine bağlıdır. Genelde katlanmalar olurken biyolojik ortam su olduğundan suyu seven (hidrofilik) amino asitler dışarı doğru, suyu sevmeyen (hidrofobik) amino asitler içeri doğru katlanırlar.



Şekil 2.32 : Çizgisel ve yuvarlak protein yapıları.

Proteinlerin 3 boyutlu yapısının kararlılığı proteinin aktivitesini etkiler. Proteinlerini ikincil, üçüncül veya dördüncül yapılarının bozulmasına protein denatürasyonu denir. Proteinin denatürasyonuna neden olan parametreler aşağıda belirtilmiştir.

- Sıcaklık
- Organik çözücüler
- Kuvvetli asit ya da bazlar
- Deterjanlar (yüzey aktif maddeler)
- UV radyasyon
- Yüksek tuz derişimleri
- Ağır metal iyonları

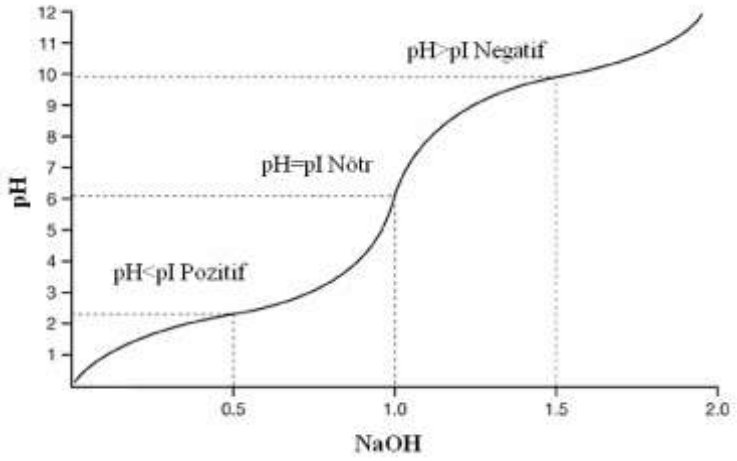
Proteinler denatürasyon derecesini belirlemek için bir takım testler yapılmaktadır. Yapılan bu deneylerdeki kriterler;

- Çözünürlüğün azalması
- Biyolojik aktivite kaybı
- Şekil ve boyut değişimi
- Absorpsiyon ve floresans spektrumundaki değişimlerdir.

Protein denatürasyonunun belirlenmesinde kullanılan kriterleri tek tek ele alalım. Protein denatürasyonu sırasında iç kısımlarda bulunan hidrofobik amino asitler

ortaya çıktığından, proteinlerin kendi aralarındaki hidrofobik-hidrofobik etkileşimlerden dolayı proteinlerin çözünürlüğünde bir azalma gözlenir. Bu azalma denatürasyon derecesine bağlı olarak değişir. Özellikle enzimler denatüre olduğu zaman aktiviteleri azalır. Çünkü denatüre oldukları zaman substrat için spesifik olan aktif bölgenin üç boyutlu yapısı değişmektedir. Buna bağlı olarak ta enzim aktivitesinde bir azalma gözlenir. Proteinler denatüre olduğu zaman ikinci ve üçüncül yapıyı oluşturan zayıf bağlar koptuğundan şekil ve boyut değişimleri gözlenir. Bu değişimler bir takım yöntemlerle tespit edilerek denatürasyon özellikleri belirlenir. Proteinlerin derişimi belirlenirken UV/Görünür bölge spektrofotometreleri kullanılır. Bu cihazlarda 280 nm'de absorbans ölçümleri yapılır. Bu dalga boyunda absorbans veren halkalı amino asitlerdir. Genellikle bu halkalı amino asitler hidrofobik özelliklidir ve proteinlerin iç kısmında yer alırlar. Proteinler denatüre olduğunda ise bu aminoasitler açığa çıkacağından absorpsiyon ve floresans spektrumunda artma gözlenir.

Proteinler üzerlerinde iyonlaşabilen işlevsel gruplar taşıdıklarından ortamın pH'sına bağlı olarak farklı yüklere sahiptirler. Proteinlerin yüklerini belirleyen ise her proteine özgü olan izolektrik noktadır (pI). Bu noktada proteinler nötr haldedirler. Bu pH proteinin yapısındaki amino asitlerin bileşimi ile doğrudan ilişkilidir. Eğer bazik karakterli amino asit (örn, lizin) oranı yüksek ise proteinin pI daha yüksektir. Ancak asidik amino asitler (örn, aspartik asit) oranı yüksek ise pI düşüktür. Proteinler pI'ya bağlı olarak anyonik, katyonik ya da nötr halde bulunabilirler. Şekil 2.33'te proteinin pH değişimine bağlı olarak yük değişimi gösteren grafik verilmektedir.



Şekil 2.33 : Proteinin pH'ya bağlı olarak yük değişim grafiği [353].

Şekilde görüldüğü gibi proteinler pI'dan düşük pH'larda pozitif yüklü iken, yüksek pH'larda negatif yüklüdür. Düşük pI sahip proteinler fizyolojik pH'da (~7) negatif yüklü iken, yüksek pI sahip olanlar pozitif yüklüdür.

3. MATERYALLER ve YÖNTEMLER

3.1 Kullanılan Kimyasallar

- Gümüş Nitrat ($AgNO_3$) (Fluka)
- Tri-Sodyum Sitrat dihidrat ($C_6H_5Na_3O_7.2H_2O$) (Merck)
- Sığır Serum Albumin (BSA) (Sigma-Aldrich)
- İnsan Serum Albumin (HSA) (Sigma-Aldrich)
- Sitokrom c (Sigma-Aldrich)
- Lizozim (Sigma-Aldrich)
- Pepsin (Sigma-Aldrich)
- Katalaz (Sigma-Aldrich)
- Avidin (Sigma-Aldrich)
- Hemoglobin (Sigma-Aldrich)
- İmmunoglobulin A (Sigma-Aldrich)
- İnsulin (Sigma-Aldrich)

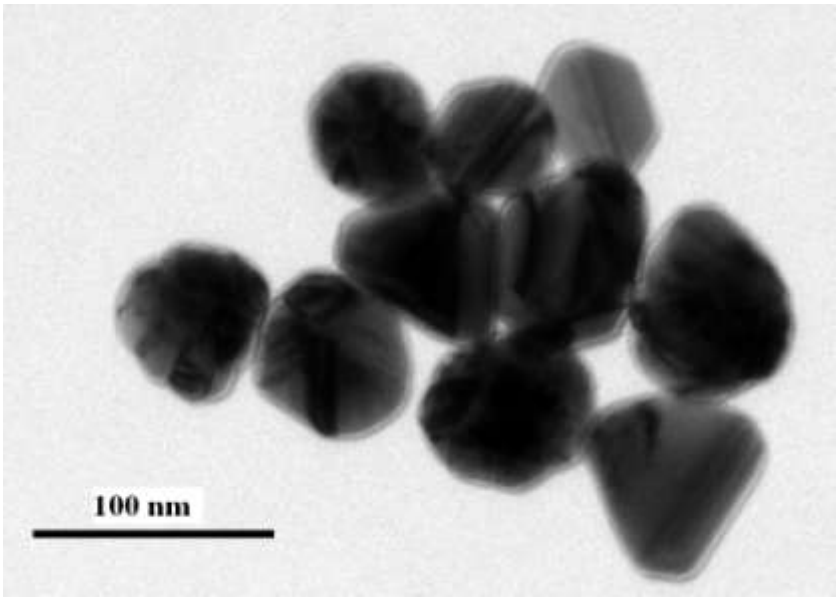
3.2 Kullanılan Cihazlar

- Raman Spektrometre (Renishaw)
- AFM (Park Systems XE-100)
- SEM (Carl Zeiss Evo 40)
- TEM (JEOL)
- UV/Görünür Bölge Spektrofotometre (Perkin Elmer Lamda 25)
- Zetasizer (Malvern Nano ZS)
- Saf Su Cihazı (Millipore)

- İletim Derleme Düzeneği (PI)
- pH Metre (Mettler Toledo)
- Santrifüj (Beckman)
- Manyetik Karıştırıcı (Heidolph)
- Hassas Terazi (OHAUS)
- Buzdolabı (Arçelik)

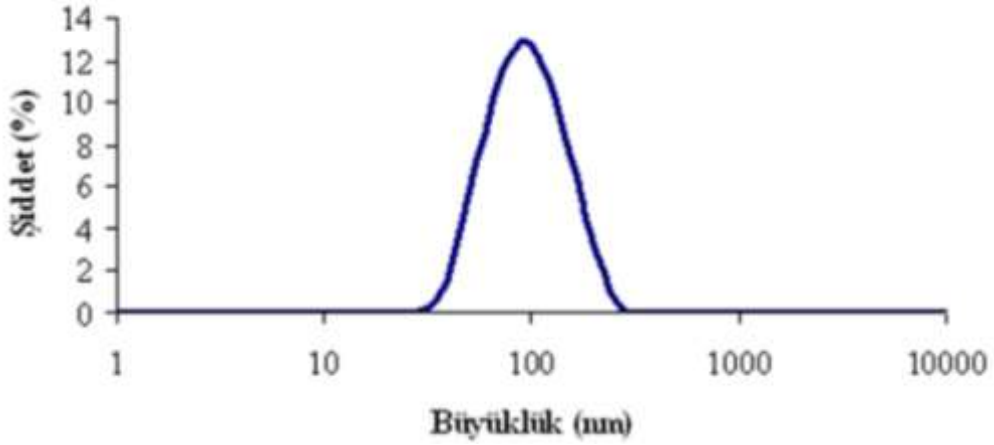
3.3 AgNPlerin Sentezlenmesi ve Karakterize Edilmesi

AgNPler literatürde yaygın olarak kullanılan Lee ve Meisel yöntemine göre sentezlendi [168]. Bu yönteme göre 90 mg $AgNO_3$ tartılarak 500 mL saf su içerisinde çözüldü. Bir balık yardımı ile manyetik karıştırıcıda 1000 rpm'de karıştrıldı. Karıştırılan çözelti kaynayıncaya kadar ısıtıldı. Isıtılan çözelti üzerine damla damla 10 mL sodyum sitrat (%1) çözeltisi eklendi ve süspansiyonun hacmi yarıya düşene kadar kaynatılmaya devam edildi. Oluşan AgNP süspansiyonu 1X olarak nitelendirildi. Oluşan NPleri karakterize etmek için TEM, Zetasizer ve UV/Görünür bölge spektrofotometresi kullanıldı. Şekil 3.1'de hazırlanan NPlerin TEM görüntüsü verilmektedir. Görüldüğü gibi sentezlenen NP ortalama 60 nm büyüklüğündedir.



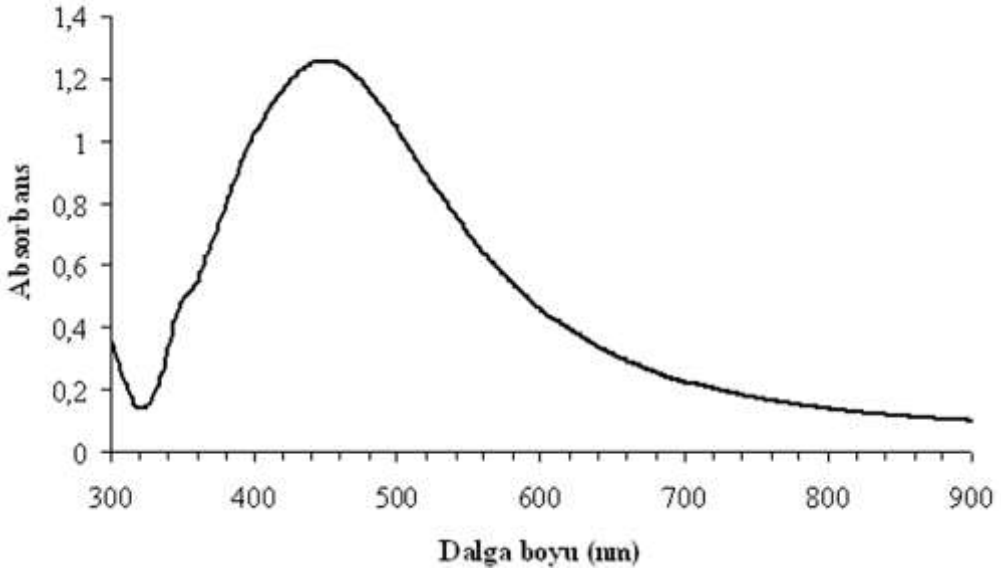
Şekil 3.1 : Sitrat indirgenmesiyle hazırlanan AgNPlerin TEM görüntüsü.

DLS tekniği de süspansiyon içerisindeki NPlerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu tekniğin çalışma prensibi ve detayları bir önceki bölümde verilmiştir. Şekil 3.2'de sentezlenen NPlerin büyüklük dağılım grafiği görülmektedir. Hazırlanan NPlerin büyüklük dağılım grafiğinde z-ortalama değeri 78,34±1,66 nm'dir. DLS tekniği ile ölçülen NPlerin büyüklüklerinin mikroskop görüntülerinden büyük olmasının nedeni ölçülen büyüklüğün hidrodinamik çap olmasından dolayıdır. Yine hidrodinamik çap ve özellikleri bir önceki bölümde anlatılmıştır.



Şekil 3.2 : Sitrat indirgenmesiyle hazırlanan AgNPlerin büyüklük dağılım grafiği.

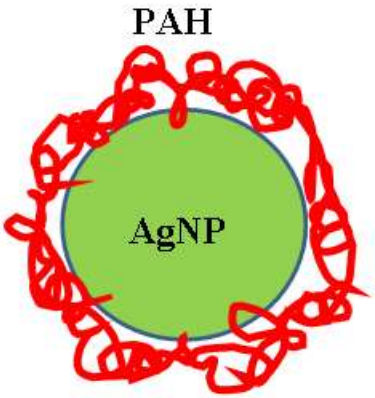
Metal NPler etrafında oluşturdukları lokalize olmuş yüzey plazmonlarından dolayı görünür bölgede ışığı absorplama özelliğine sahiptirler. Bu özelliğinden dolayı UV/görünür bölge spektroskopisi yaygın olarak NPlerin karakterizasyonunda kullanılmaktadır [203]. Absorpsiyon dalga boyu veya boyları nanoparçacıkların cinsine, büyüklüğüne ve şekline bağlıdır. Örneğin AuNPler daha çok yüksek dalga boyundaki ışığı absorplarken (520-570 nm), AgNPler (390-450 nm) daha düşük dalga boyunda ışığı absorplar. Ayrıca eğer NPler çubuk şeklinde ise iki farklı dalga boyunda ışığı absorplarlar. Sentezlenen nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumu Şekil 3.3'te görülmektedir. Maksimum absorpsiyon dalga boyu 450 nm civarındadır.



Şekil 3.3 : AgNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu.

3.4 Pozitif Yüklü NPlerin Sentezlenmesi ve Karakterize Edilmesi

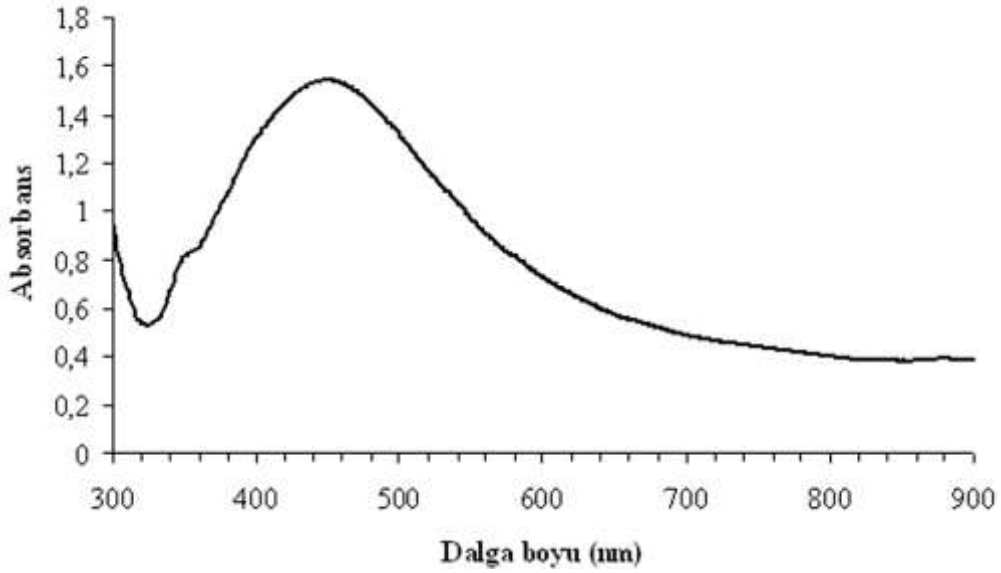
Sitrat indirgenmesiyle elde edilen NPlerin, yüzeylerine sitrat iyonları adsorplandığından, negatif yüklü olduğu bilinmektedir. Ancak bu çalışmada proteinlerin yüzey yükleri hem artı hem de eksi olabileceğinden, pozitif yüklü NPlerin de hazırlanması gerekmektedir. Pozitif yüklü NPler sitrat yöntemi ile hazırlanan AgNPler üzerine çok ince film şeklinde pozitif yüklü polimer kaplanarak hazırlandı (Şekil 3.4).



Şekil 3.4 : AgNPlerin pozitif yüklü polimer PAH ile kaplanmasının şematik gösterimi.

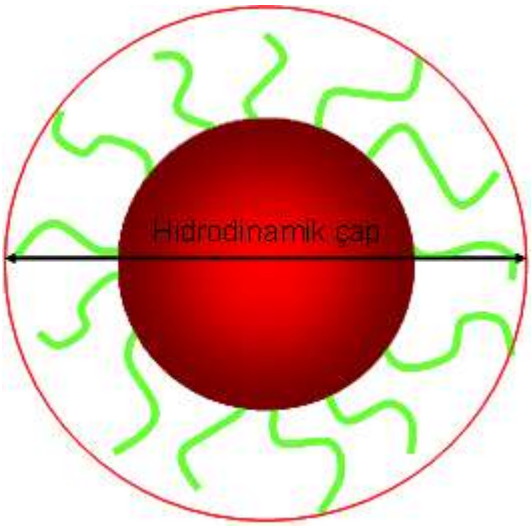
Bu nanoparçacıklar hazırlarken katman-katman bir araya gelme (Layer-by-Layer) tekniği kullanıldı [356]. Bu teknik, zıt yüklü maddeler başta iyonik etkileşimler

yardımı ile bir araya getirmektir. Pozitif yüklü hale getirmek için pozitif yüklü olan Poli(allilamin hidroklorür) (PAH) kullanıldı. Eşit hacimdeki sitrat yöntemi ile hazırlanan NPler, eşit hacimdeki PAH çözeltisine damla damla karıştırarak eklendi. Bu süspansiyon 15 dk. karıştırılarak pozitif yüklü polimerin negatif yüklü NPler üzerine tutunması sağlandı. Fazla veya az tutunan polimeri ortamdan uzaklaştırmak için santrifüj edildi. Polimer yardımı ile pozitif hale getirilmiş nanoparçacıklar UV/Görünür bölge spektroskopi ve Zetasizer ile karakterize edildi. UV/görünür bölge absorpsiyon spektrumu alındığında dalga boyunda sadece bir kaç nm değişim olduğu gözlemlendi. Bu değişim NPlerin dielektrik çevresinin değişiminden kaynaklanmaktadır [357]. Şekil 3.5'te PAH ile kaplanmış AgNPlerin absorpsiyon spektrumu görülmektedir.



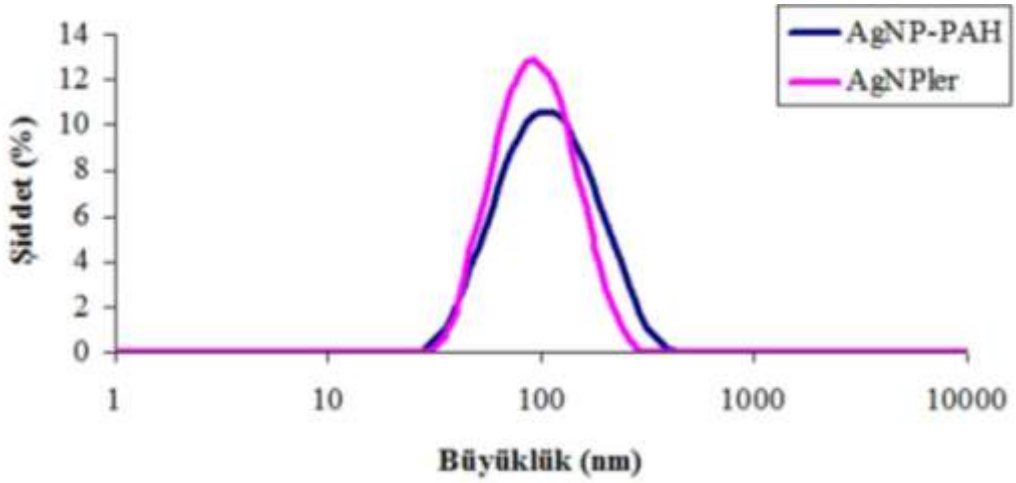
Şekil 3.5 : PAH ile modifiye edilen AgNPlerin yüzey plazmon absorpsiyon spektrumu.

Hazırlanan NPlerin polimer ile kaplanıp kaplanmadığını daha iyi anlamak için zetasizer kullanıldı. Hidrodinamik çapa bakıldığında çıplak nanoparçacığa göre daha büyük oldukları görüldü. Bunun nedeni, bir parçacık üzerine bir modifikasyon yapıldığı zaman hidrodinamik çapının büyümesidir. (Şekil 3.6). AgNP-PAH'ın hidrodinamik çapının 84,63± 0,68 nm olduğu belirlendi.



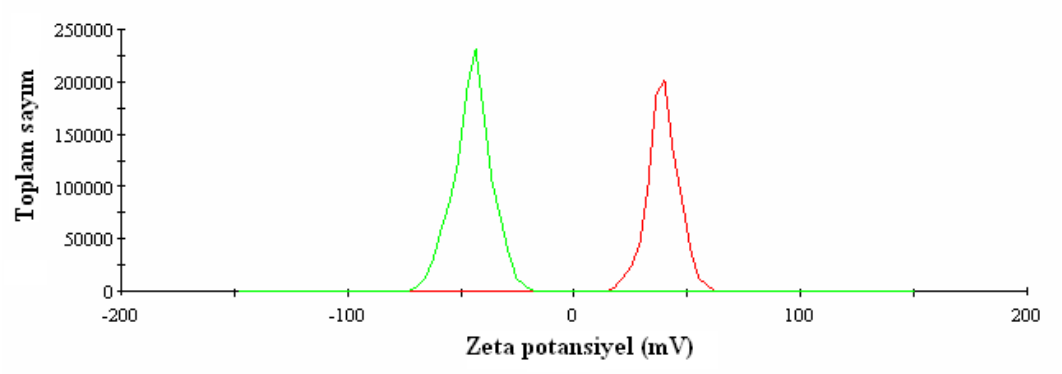
Şekil 3.6 : Yüzey modifikasyonundan sonra çaptaki büyümenin şematik gösterimi.

Büyüklük farklarına baktığımız zaman hidrodinamik çapın büyümesi yüzeyin polimer ile kaplandığını göstermektedir. Şekil 3.7'de çıplak ve modifiye olan nanoparçacıkların büyüklük dağılımları görülmektedir. 6 nm'lik bir büyüme meydana gelmiştir. Bu da polimerin nanoparçacık yüzeyini 1-2 kat kaplandığını göstermektedir.



Şekil 3.7 : AgNPler ve AgNP-PAH büyüklük dağılımları.

Ayrıca Zetasizer ile yüzey yükü ölçümü de yapılabilmektedir. Daha önce bahsedildiği gibi sitrat yöntemi ile sentezlenen AgNPler negatif yüklüdür. NPlerin zeta potansiyel ölçümü yapıldığında (Şekil 3.8) AgNPlerin – 43,1±0,3 mV, PAH kaplı NPlerin ise + 39,5±0,1mV zeta potansiyeline sahip olduğu belirlendi.

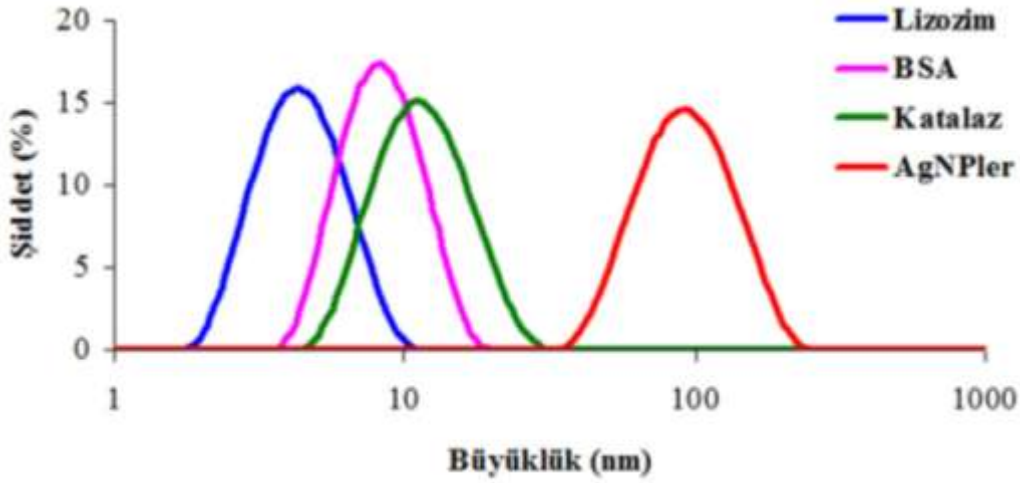


Şekil 3.8 : AgNPlerin (yeşil) ve AgNP-PAH (kırmızı) zeta potansiyel dağılımları.

Zeta potansiyele bakıldığında da yüzeyin PAH ile modifiye olduğunu görülmektedir. Sonuç olarak pozitif yüklü AgNPler hazırlandı.

3.5 Protein Çözeltilerinin Hazırlanması ve Karakterize Edilmesi

Satın alınan proteinler saf su (pH=6,92) içerisinde derişimleri 1000, 100, 10 ve 1 µg/mL olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan protein çözeltileri 1 mL'lik tüplerde -20 ^{0}C'de saklandı. Proteinlerin yüzey yükü (zeta potansiyel) ve büyüklüklerini ölçmek için Zetasizer kullanıldı. Proteinlerin büyüklüğüne bağlı olarak 1-5 mg/mL protein çözeltileri hazırlandı ve hidrodinamik çapları ve zeta potansiyelleri ölçüldü. Şekil 3.9'da bazı proteinlerin ve AgNPlerin büyüklük dağılımları görülmektedir. Moleküler ağırlığı küçük proteinlerin hidrodinamik çapı küçük iken moleküler ağırlığı büyük olan proteininin hidrodinamik çapı büyüktür.



Şekil 3.9 : Bazı proteinlerin ve AgNPlerin büyüklük dağılım grafiği.

Proteinlerin zeta potansiyellerine bakıldığında ise yüzey yüklerini proteine özgü olan izolelektrik noktaları belirlemektedir. İzoelelektrik noktaları düşük olan proteinler negatif yüklü iken yüksek olan proteinler pozitif yüklüdür. Çizelge 3.1'de bu tezde kullanılan proteinlerin fizikokimyasal özellikleri verilmektedir.

Çizelge 3.1 : Proteinlerin fizikokimyasal özellikleri.

Protein	**Izoelektrik Noktası (pI)**	**MA (kDa)**	**Zeta Potansiyel (mV)**	**Hidrodinamik Çap (nm)**	**Özellik**
BSA	4,7	66	-15,6±4,2	7,26 ± 0,8	Asidik
HSA	4,7	66	-28,9±3,5	7,93±0,10	Asidik
Katalaz	5,4	250	-11,5±3,8	12,04± 0,09	Asidik
Ig A	4,63-6,85	150-350	-27,2±4,2	32,49±0,20	Asidik
Pepsin	2,2-3	34	-23,3± 5,4	6,20 ± 0,10	Asidik
Hemoglobin	6,8	64,5	-10,4±2,3	7,82±0,18	Asidik
İnsulin	5,3-5,35	6	-29,3±3,8	3,06±0,07	Asidik
Sitokrom c	9,8	12,3	+22,5± 4,4	4,02 ± 0,05	Bazik
Avidin	10,5	66	+27,2±5,1	8,01 ± 0,07	Bazik
Lizozim	11,4	14,3	+ 35,9±3,5	4,20± 0,06	Bazik

Proteinlerin AgNPler ile karıştırıldıktan sonra pH'nın dolayısıyla yüklerin değişip değişmediğini anlamak için 50 µg/mL protein içeren 4X AgNPs süspansiyonlarının pH'sı ölçüldü. Çizelge 3.2'de saf suyun, AgNP süspansiyonunun ve AgNP-protein karışımlarının pH değişimleri görülmektedir.

Çizelge 3.2 : AgNP ve AgNP-protein karışımlarının pH değişimleri.

Örnek	dH_2O	1X AgNP	4X AgNP	Sit. c + 4X AgNP	HSA + 4X AgNP	IgA + 4X AgNP	Insulin + 4X AgNP
pH	6,92	8,21	8,22	7,75	7,70	7,92	7,56

Çizelgede görüldüğü gibi süspansiyonun pH'sı 8,22 iken saf suyun pH'sı 6,92 dir. Proteinlerin yük dağılımları pH 6,92'deki yükleridir. Ancak nanoparçacıklar ile karıştırıldığında pH biraz düşmektedir. Bunun nedeni olarak proteinlerin üzerinde bulunan iyonlaşabilen işlevsel gruplardır. Görüldüğü gibi asidik proteinler hala negatiftir, bazik proteinler ise hala pozitiftir. Sonuç olarak proteinlerin NPler karıştırılması proteinlerin yük dağılımlarını etkilememektedir.

3.6 Hazırlanan AgNPlerin Deriştirilmesi

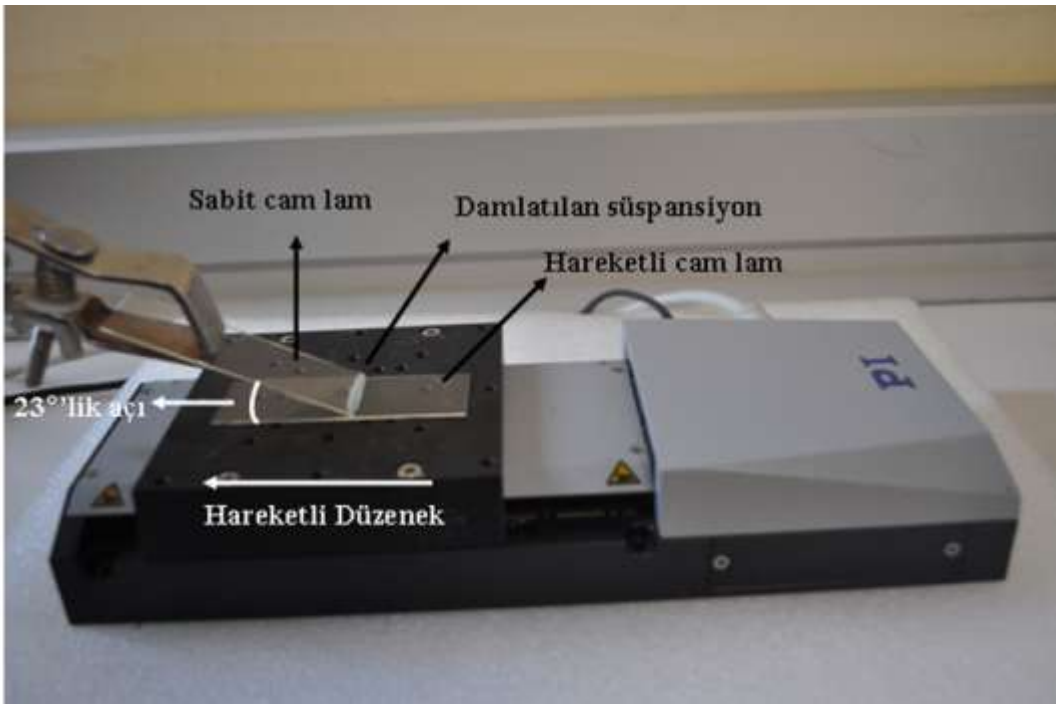
Hazırlananan ve 1X olarak nitelendirilen AgNPlerin derişimi ~$1{,}0x10^{11}$ parçacık/mL'dir. NP süspansiyonu 4 defa deriştirmek için 40 NP süspansiyonu 30 dk. 5500 rpm'de santrifüjlendi. Üst kısmından 35 mL alınarak 5 mL 8X olarak nitelendirilen NP süspansiyonu elde edildi.

3.7 Basit Karıştırma Yöntemi Karışımının Hazırlanması

Proteinlerin tayini için kullanılan basit karıştırma yönteminde stok olarak hazırlanan protein çözeltileri (20 µL) ile 8X AgNPler aynı hacimde (20 µL) karıştırıldı. Hazırlanan AgNP-protein karışımında son AgNPlerin derişimi 4X, süspansiyon içerisindeki protein derişimleri de 500, 50, 5 ve 0,5 µg/mL'dir. Hazırlanan karışımdan 5 µL CaF_2 üzerine damlatıldı ve kuruduktan sonra YZRS spektrumları alındı.

3.8 İletim Derleme Yöntemi Karışımının Hazırlanması

İletim derleme yöntemi için hazırlanan karışım, 20 µL NP (8X) ve 20 µL protein çözeltilerinin (1000, 100, 10 ve 1 µg/mL) karıştırılması ile hazırlandı. İletim derleme düzeneği ve yöntemi daha önce literatürde rapor edilmiştir [358-365]. Hazırlanan karışım 23°'lik açı ile tutturulmuş iki cam lam arasına damlatıldı. İletim derleme yönteminde kullanılan hareketli düzeneğin hızı bütün deneylerde 1 µm/s idi. Odanın sıcaklığı ve bağıl nem ise 22-25 °C ve % 40-50 idi. İletim derleme yöntemi için kullanılacak düzeneğin resmi Şekil 3.10'da görülmektedir.



Şekil 3.10 : İletim derleme yönteminde kullanılacak cihazın fotoğrafı.

3.9 Protein Karışımlarının Tayini İçin Karışımların Hazırlanması

İletim derleme yöntemi ile protein karışımlarını hazırlanırken son protein derişimi 50 µg/mL ve NPlerin derişimi 4X olacak şekilde karışımlar hazırlandı. Hazırlanan 40 µL'lik karışım (20 µL protein + 20 µL 8X AgNP) yine iki cam lam arasına damlatılarak iletim derleme yöntemi ile yüzeyler hazırlandı.

3.10 Protein Karışımlarının Tayininde Sıcaklığın Etkisi

İletim derleme yöntemi ile protein karışımlarını hazırlanırken son protein derişimi 50 µg/mL ve NP derişimi 4X olacak şekilde karışımlar hazırlandı. Hazırlanan 40 µL'lik karışım (20 µL protein + 20 µL 8X AgNP) yine iki cam lam arasına damlatılarak iletim derleme yöntemi ile yüzeyler hazırlandı. Hazırlanan yüzeylerin orta kısmından 30-80 °C arasında 10 derecelik artışlar ile YZRS spektrumları alındı. Yüzeylerin ısıtması Raman cihazına takılabilen bir aparat yardımı ile yapıldı. Farklı sıcaklıklarda YZRS spektrumu alırken her sıcaklığa gelindiğinde dengeye ulaşmak içi birkaç dakika beklendi. Isıtma hızı 10 °C/dk. idi.

3.11 Biyolojik Moleküller Varlığında Protein Karışımlarının Tayini

Biyolojik moleküllerin varlığında zıt yüklü protein karışımlarını ayırıp YZRS ile tayin edilebilirliğini test etmek için zayıf Raman saçılmaları olan karbonhidratlar kullanıldı. Protein karışımları ve AgNPler karıştırıldıktan sonra bu karışıma son derişimi 1 mM olacak şekilde glikoz ve laktoz çözeltileri eklendi. Bu karışımda proteinlerin derişimi 50 µg/mL, NP derişimi 4X ve karbonhidrat derişimi 1 mM'dır. Elde edilen karışım iletim derleme yöntemi ile yukarıda belirtilen deneysel şartlarda cam yüzey üzerine biriktirildi. Oluşan yüzey 5 eşit parçaya bölünerek her bir parçadan YZRS spektrumları alındı.

3.12 YZRS Ölçümleri

Bütün deneylerde Renisha Invia Raman mikroskopi sistemi kullanıldı. 830 nm dalga boylu lazer ve 50X objektif kullanıldı. Örnek üzerindeki lazerin kalma süresi 10 s. idi. 1 defa saçılma toplandı.

3.13 Büyüklük ve Zeta Potansiyel Ölçümleri

Proteinlerin ve NPlerin büyüklük dağılımlarını ve yüzey yüklerini ölçmek için Malvern Nano ZS Zetasizer cihazı kullanıldı. Cihazda 4 mW gücünde 633 nm He-Ne lazeri bulunmaktadır. Geri saçılan lazer ışığını 173°'lik açı ile fotodiyod dedektör ile ölçmektedir. Protein çözeltileri için kırılma indisi ve absorpsiyon katsayısı 1,45 ve 0,001, NPler için ise 2,0 ve 0,32 olarak kabul edildi. Her bir örnek için üç ölçüm alındı ve ortalamaları kullanıldı.

3.14 TEM Ölçümleri

TEM ölçümleri JEOL-1200 HRTEM (LaB6 filament) cihazı ile yapıldı. NP süpansiyonuna bakır TEM örnek tutucu daldırılarak, süspansiyon içerisinden NPler örnek tutucuya transfer edildi. Kuruyan örnek 200 kV hızlandırma voltajı ile yüksek vakum altında incelendi.

3.15 SEM Ölçümleri

SEM ölçümleri Carl Zeiss Evo 40 (Tungustent filament) cihazı ile yapıldı. Damlatılarak veya iletim derleme yöntemi ile hazırlanan yüzeyler yüksek vakum altında 10 kV hızlandırma voltajı kullanılarak incelendi.

3.16 AFM Ölçümleri

AFM ölçümleri Park Systems XE-100 kullanılarak yapıldı. Analizler oda sıcaklığında silikon bazlı kantilever kullanılarak "non-contact" modda 0,5 Hz tarama hızıyla yapıldı.

3.17 SPSS Yazılım Programı

Protein karışımlarını istatistiksel olarak ayırımı göstermek için SPSS programı kullanıldı. Veriler programa aktarılmadan önce yüzdelik haline getirilerek normalize edildi. Verilere SPPS yardımı ile çok boyutlu ölçeklendirme (Multidimension Scaling) analiz yöntemi uygulandı. Euclidean distance ölçeklendirme modeli kullanılarak 2 ve 3 boyutlu grafikler oluşturuldu.

4. SONUÇLAR ve TARTIŞMA

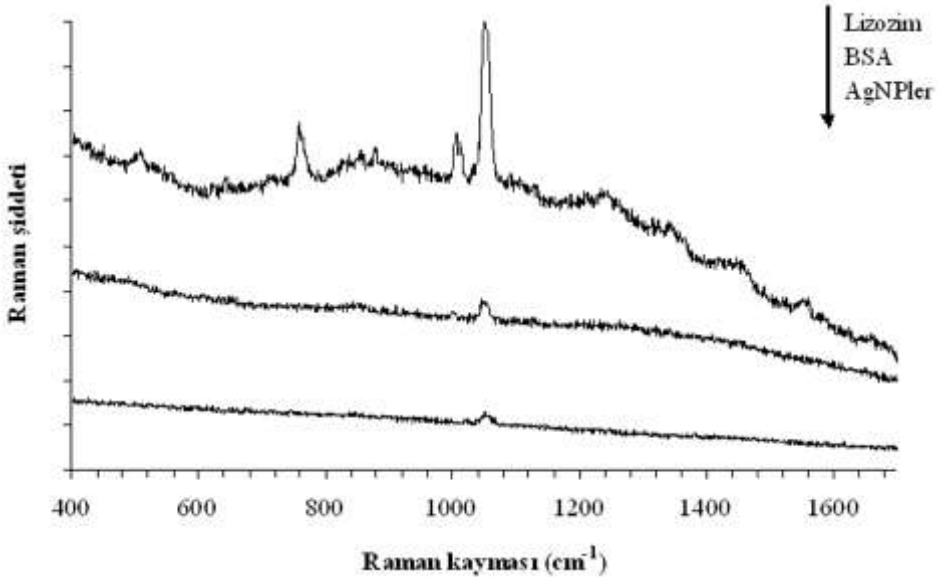
YZRS deneylerinde substrat olarak genellikle kolloidal süspansiyonlar veya çeşitli yöntemlerle hazırlanmış 2 ve 3 boyutlu yüzeyler kullanılmaktadır. Kolloidal süspansiyonlar (NPler) kullanıldığında analit ile NPler karıştırılıp bir yüzeye damlatılarak kurutulur. Kuruyan damladan YZRS spektrumları alınarak örnek incelenir. Bu yöntem basit karıştırma yöntemi (simple mixing) olarak isimlendirilir. Analiz edilecek madde küçük molekül ise (rhodamin 6G, ATP) molekül ile NPler karıştırıldığında analit NP üzerine tutulur. Bu tutunma kimyasal veya fiziksel olabilir. Eğer kükürt bağı içeren moleküller var ise kimyasal olarak NPlere bağlanırlar. Yüklü moleküller ise NPnin yüküne bağlı olarak iyonik etkileşime girerler. Eğer analit biyolojik bir makromolekül (protein, DNA) ise bu biyolojik yapılar kullanılan NPlerden büyük ise NP yüzeyine tutunurlar. Fakat organize olmuş biyolojik yapılarda (bakteri, maya) NPler bu biyolojik yapı ile etkileşime girerler. Basit karıştırma yöntemi, basit ve örnek hazırlamanın kolay olması nedeni ile birçok YZRS deneylerinde kolloidal NPler kullanılmaktadır. NPler kullanıldığında alınan bilgi hangi molekülün veya atomun NPler ile etkileşimi ile sınırlıdır. Özellikle -SH ve $-NH_2$ gurupları ile seçici olarak etkileşime girerler. Bu yöntemin en büyük dezavantajı elde edilen spektrumun tekrarlanabilirliğinin düşük olmasıdır.

2 veya 3 boyutlu hazırlanan yüzeylerde örnek substrat üzerine damlatılarak incelenir. Örnek belirli bir hacim ve derişimde yüzey üzerine damlatılarak kurutulur ve kuruyan yüzeylerden YZRS spekrumları alınarak analit incelenir. Hazırlanan yüzeylerde analit dağılımının homojen olmaması veya damlatılan örneğin yüzey arasındaki etkileşiminden dolayı duruşunun farklı olması bu tekniğin kısıtlamalarındandır. Bu yüzeylerin avantajı yüksek YZRS zenginleşme faktörüne sahip olmalarıdır. Protein tayininde hem kolloidal süspansiyonların hem de yüzeylerin kullanıldığı literatürde rapor edilmiştir.

4.1 Basit Karıştırma Yöntemi ile Proteinlerin Tayini

Proteinlerin tanı/tayininde YZRS tekniğinin diğer yöntemlere göre üstünlükleri olduğu halde kolloidal süspansiyonlar kullanıldığında doğası gereği analizde tekrarlanabilirlik ve proteinlerden detaylı bilgi alınamaması bu tekniğin kısıtlamalarıdır. YZRS'de detaylı bilgi alınabilmesi için molekülün yüzeye uzaklığı 1-4 nm olmalıdır. Çünkü zenginleştirmeye büyük katkısı olan plazmonlar NP etrafında bu boyutlarda oluşmaktadır [47]. Bilindiği gibi NPlerin yüzey plazmon özellikleri şekli, büyüklüğü, çeşidi ve yığıntı özelliklerine son derece bağlıdır. NPler süspansiyon olarak sentezlendikleri için kararlı olduğu durumlarda bir yüzey yüküne sahiptirler. Genellikle kullanılan sitrat indirgeme yöntemi ile hazırlanan NPler negatif yüke sahiptirler. Negatif yüklü bir analit bu NPleri kullanarak YZRS spektrumu alındığında zenginleşme faktörünün çok düşük olduğu gözlemlenmiştir [272]. Çünkü NP ile analit etkileşime girememiştir. Ancak pozitif yüklü analit kullanıldığında hem NPler ile iyonik etkileşime girerek NP yüzeyine yaklaşmasına hem de negatif olan yüzey yükünü azaltarak yığıntılar oluşmasına sebep olmaktadır. Yığıntıların oluşması analitin NPler arasında kalma yüzdesini artıracak ve dolayısıyla da saçılma olası oluşacak sıcak noktalardan dolayı zenginleşecektir. Böylelikle daha düşük analit derişimlere analiz edilebilecektir. Bilindiği üzere proteinler pH'a bağlı farklı yüklere sahiptirler. YZRS çalışmalarında genellikle proteinler fizyolojik pH'da çalışılmaktadırlar. Ancak bu pH'da proteinler özelliklerine bağlı olarak farklı yüklere sahiptirler. Genellikle bu pH'da birçok protein negatif yüklüdür. Ancak sitokrom c ve lizozim gibi bazik proteinler pozitif yüklüdür. Proteinler hazırlanırken tamponlar içerisinde hazırlanıyor ancak NPler ile karıştırıldığında pH'da bir değişim olup olmadığına literatürde çok fazla dikkat edilmemiştir. Sitrat yöntemiyle hazırlanan AgNPler içeren süspansiyonu pH'sı 8-9 (bazik) iken, AuNPler içeren süspansiyonun pH'sı asidiktir. Dolayısıyla proteinler ile NPler karıştırıldıktan sonra süspansiyonun pH'sı son derece önemlidir. Hem proteinin yükünün değişmesi hem de yüzey plazmon kalitesi bu pH'lara bağlıdır [273]. Ayrıca proteinin yükünü değiştirebiliriz ancak değişen pH'da protein denature olabilir. Bu denatürasyon da proteinin çözünürlüğünü azaltacağı için daha çok kendi aralarında proteinin iç kısmında bulunan hidrofobik etkileşimlerden dolayı kolloidler ile etkileşmeyecek ayrı bir yerde çökecektir. Bu hem tekrarlanabilirlik hem de spektral zenginliği düşürecektir. Ayrıca kolloidin yüzey plazmon özelliği çok düşük pH'larda çökeltiler oluşturduğu,

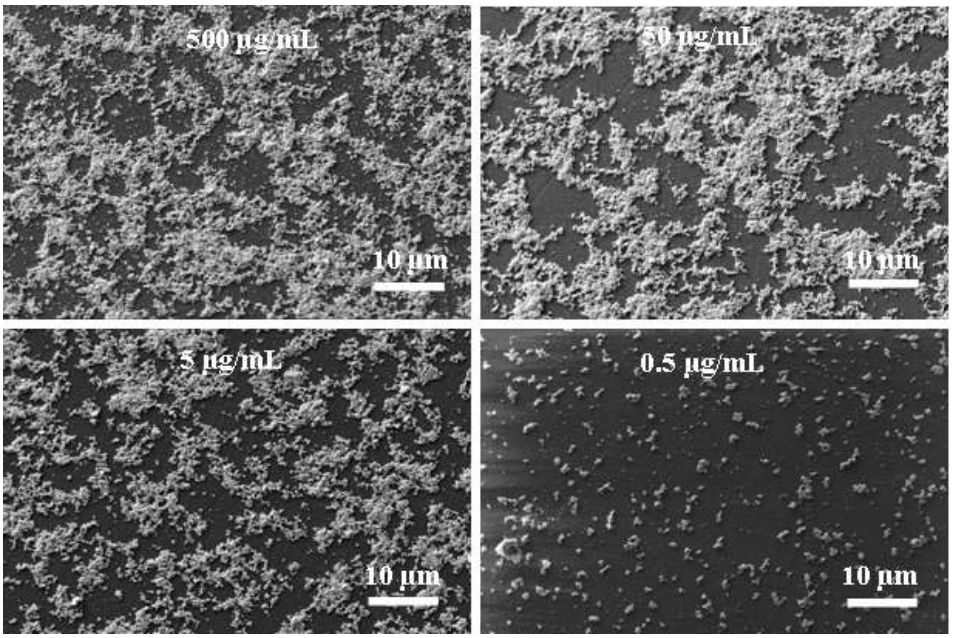
yüksek pH'larda ise oksitlendiği için belirli bir pH aralığında etkilidir. Bu yüzden nanoparçacığın pH'sı, dolayısıyla proteinin yükü çok iyi bilinmelidir. Basit karıştırma yönteminde proteinin yüküyle aynı ve zıt AgNPler kullanılarak YZRS spektrumları alındı. Bu çalışmalar için sentezlenen pozitif ve negatif AgNPs kullanıldı. Çalışmalarda kullanılacak proteinlerden üçü (katalaz, pepsin ve BSA) negatif yüklü, diğerleri ise (sitokrom c, avidin ve lizozim) pozitif yüklüdür. Bu çalışmada kullanılan proteinler 1000, 100, 10, 1 µg/mL sulu çözeltileri hazırlandı. Bu çözeltiler 8 defa deriştirilmiş AgNPler ile aynı hacimde karıştırıldı, Böylelikle son AgNP derişimi 4X ve protein derişimleri 500, 50, 5, 0,5 µg/mL oldu. 4 defa deriştirilmiş AgNPler kullanıldığında biyolojik uygulamalarda tekrarlanabilir ve zengin YZRS spektrumları elde edilebileceği literatürde rapor edilmiştir [366]. Şekil 4.1'de negatif yüklü olan AgNPler ile pozitif yüklü olan lizozim ve negatif yüklü olan BSA'nın YZRS spektrumu görülmektedir. Kullanılan proteinlerin son derişimi 50 µg/mL'dir.



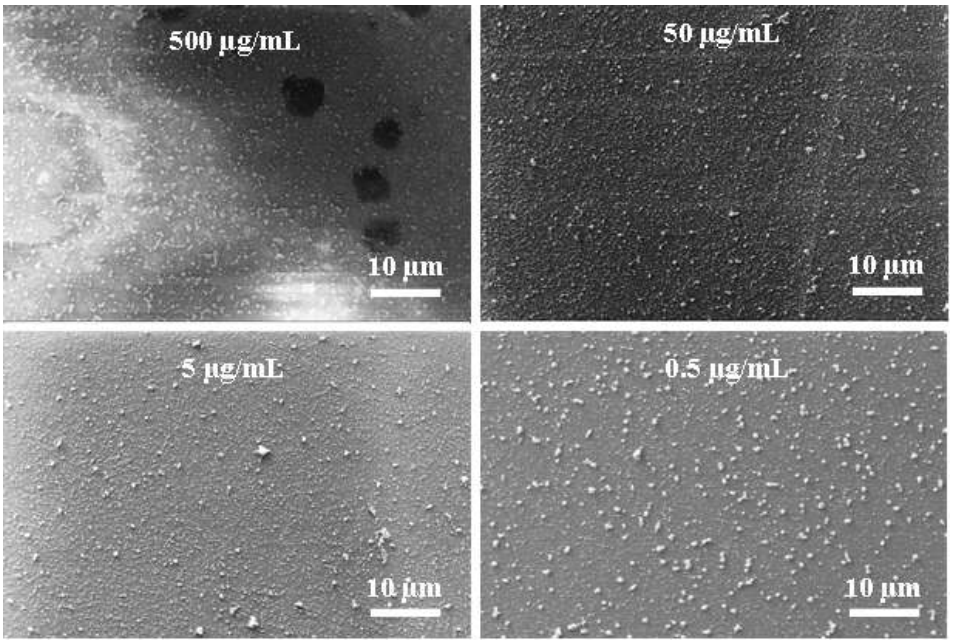
Şekil 4.1 : BSA ve lizozim'den alınan YZRS spektrumları.

Görüldüğü gibi pozitif yüklü lizozim proteininden YZRS spektrumu alınabilirken, negatif yüklü BSA molekülünden spektrum alınamamaktadır. Bunun nedeni ise pozitif yüklü protein molekülleri ile negatif yüklü AgNPlerin iyonik etkileşiminden dolayıdır. Negatif yüklü BSA ile nanoparçacıkların aynı yüklü olması ve etkileşimin olmamasından dolayı YZRS spektrumu alınamamaktadır. Negatif yüklü proteinler için ise daha önce hazırlanan pozitif yüklü AgNPler kullanıldı. Ancak protein moleküllerinden YZRS spektrumu alınamadı. Bunun nedeni ise yüzeyi pozitif

yapmak için kullanılan moleküllerden zengin YZRS spektrumu gelmesidir. Pozitif ve negatif yüklü proteinlerin negatif yüklü AgNPler ile etkileşimini SEM ile incelediğimizde, neden pozitif yüklü proteinlerden YZRS spektrumu elde edilirken, negatif yüklü proteinlerden YZRS spektrumu elde edilemediği çok daha kolay anlaşılmaktadır. Şekil 4.2'de farklı derişimlerdeki pozitif yüklü proteinin 8X AgNPler ile karıştırıldıktan sonra damlatılan karışımın SEM görüntüsü görülmektedir.

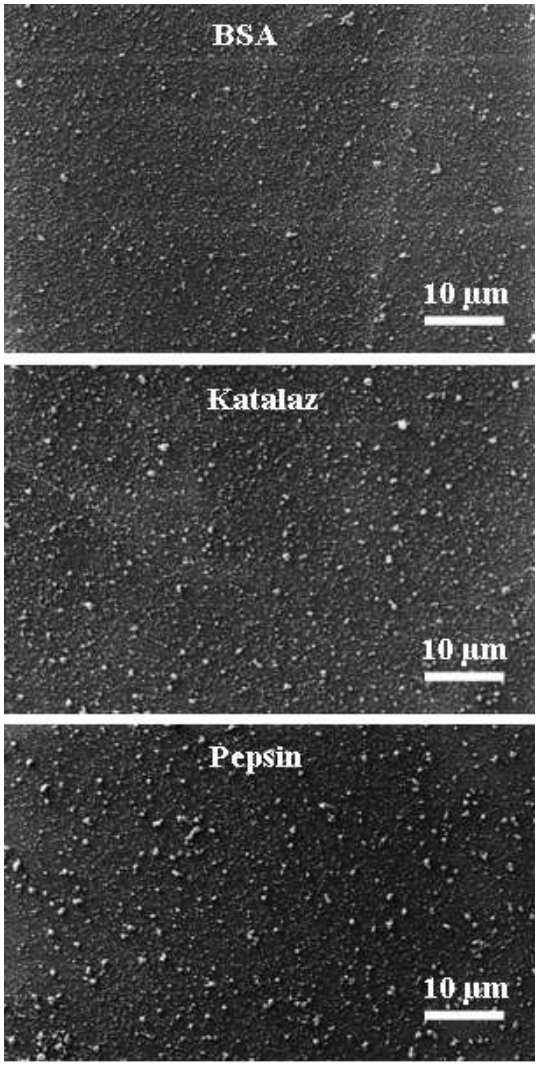


Şekil 4.2 : AgNP-lizozim karışımının farklı protein derişimlerdeki SEM görüntüleri.



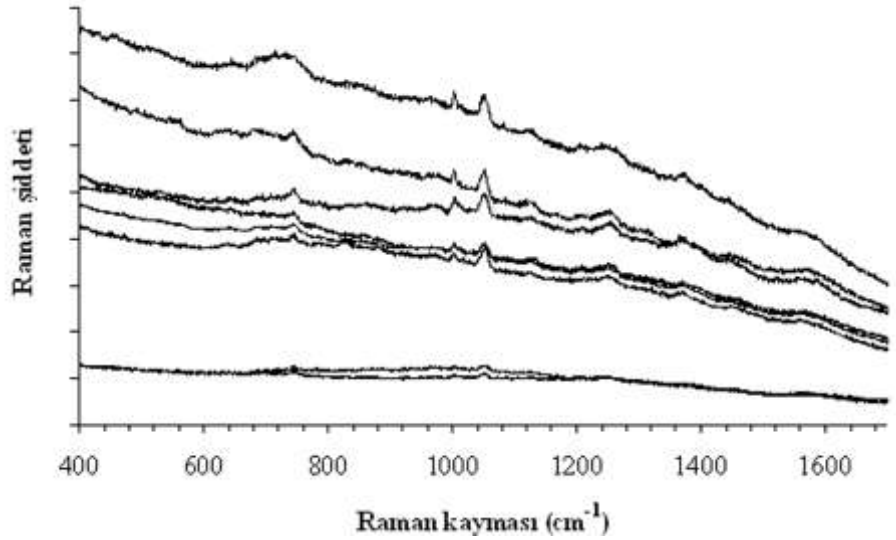
Şekil 4.3 : AgNP-BSA karışımının farklı protein derişimlerdeki SEM görüntüleri.

Görüldüğü gibi yüksek protein derişimlerinde daha fazla ve büyük toplanmalar görüldüğü halde protein derişimi azaldıkça toplanma boyutları küçülmektedir. Bunun nedeni ise, yüksek derişimde daha fazla protein molekülleri bulunduğundan, negatif yüklü AgNPler ile iyonik etkileşime girerek yüzey yükünü azaltmakta ve nanoparçacıkların toplanmasına neden olmaktadır. Protein derişimi azaldıkça protein sayısı azalmakta ve toplanma boyutları küçülmektedir. Ancak negatif yüklü bir protein (BSA) ile AgNPler karıştırılıp damlatıldığında ise tüm derişimlerde aynı oluşum görülmektedir (Şekil 4.3). Burada ise negatif yüklü proteinler ile negatif yüklü AgNPler ile herhangi bir etkileşim olmadığından, kuruma esnasında olan çok küçük toplanmalar görülmektedir. Diğer negatif yüklü proteinlerin 50 µg/mL derişimdeki yapılara baktığımızda ise aynı yapı oluşumunu görmektedir (Şekil 4.4).



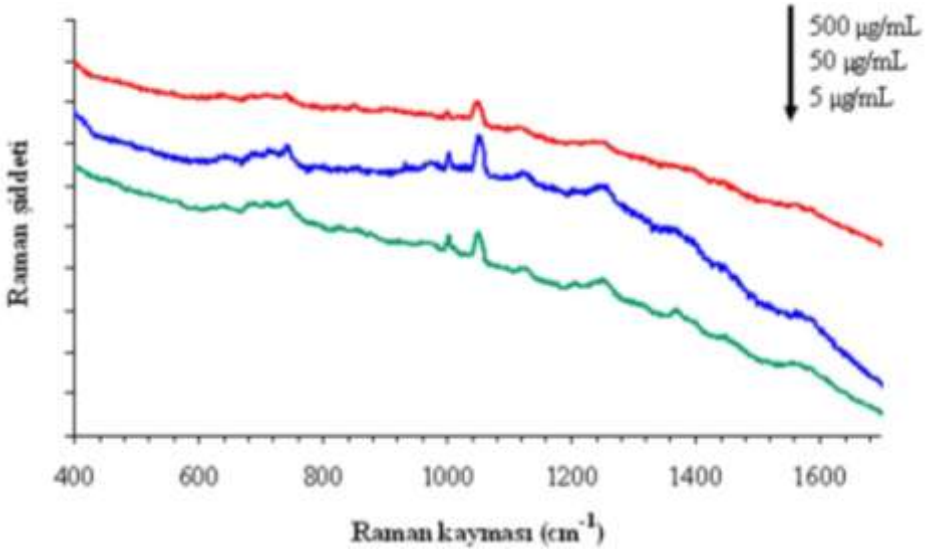
Şekil 4.4 : AgNP-BSA, katalaz ve pepsin proteinlerinin (50 µg/mL) SEM görüntüleri.

Ancak AgNP içeren süspansiyon kullanıldığında en büyük sıkıntılardan bir tanesi alınan spektrumun tekrarlanabilirliğidir. AgNPler ile alınan sitokrom c proteinin farklı bölgelerden alınmış 10 spektrumu Şekil 4.5'te görülmektedir.



Şekil 4.5 : AgNP-sitokrom c karışımının 10 farklı noktasından alınan YZRS spektrumları.

Şekilde görüldüğü gibi her bir bölgeden alınan spektrumun tekrarlanabilirliği çok iyi değildir. Yine bu proteinin YZRS ile tayin edilebileceği en düşük derişime bakıldığında ise ancak 5 µg/mL protein derişimi tayin edilebilmektedir (Şekil 4.6).



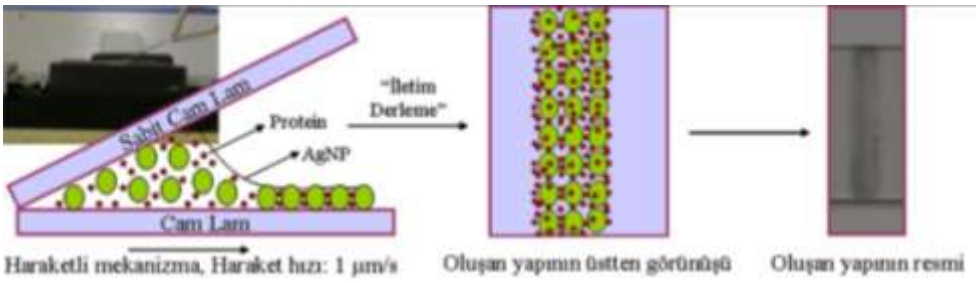
Şekil 4.6 : Derişime bağlı olarak sitokrom c proteininin YZRS spektrumları.

Yapılan bu çalışmalardan çıkan sonuç, basit karıştırma yönteminde ancak pozitif yüklü proteinler ile negatif yüklü AgNPler kullanılarak YZRS spektrumu alınabilmektedir. Fakat alınan spektrumların tekrarlanabilirliği çok düşük ve tayin

sınırı da yüksektir. Bu yöntemin tek avantajı örnek hazırlamanın basit ve ucuz olmasıdır. Bundan sonraki tüm çalışmalarda sitrat yöntemi ile hazırlanan negatif yüklü AgNPler kullanıldı.

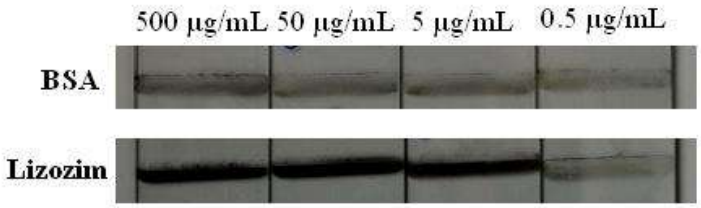
4.2 İletim Derleme Yöntemi ile Proteinlerin Tayini

Daha tekrarlanabilir spektrumlar elde etmek ve düşük derişimleri tayin edebilmek için örnek hazırlama metodu olarak iletim derleme yöntemi kullanıldı. Bu yöntemin detayları literatürde verilmiştir [358-365]. Bu yöntem biri sabit biri hareket eden iki cam lam arasındaki süspansiyonun sıcaklık, zaman, hız ve derişim gibi parametrelere bağlı olarak süspansiyon içerisindeki parçacıkların lam üzerine iki veya üç boyutlu olarak birikmesidir. Daha önce bu yöntem kullanılarak bakterilerden daha zengin ve tekrarlanabilir YZRS spektrumu elde edilebildiği rapor edilmiştir [367]. Bu yöntem proteinlerden de daha zengin ve daha tekrarlanabilir YZRS spektrumları alabilmek için kullanıldı. Şekil 4.7'de iletim derleme yönteminin şematik gösterimi ve cam lam üzerinde oluşan yapının resmi görülmektedir.



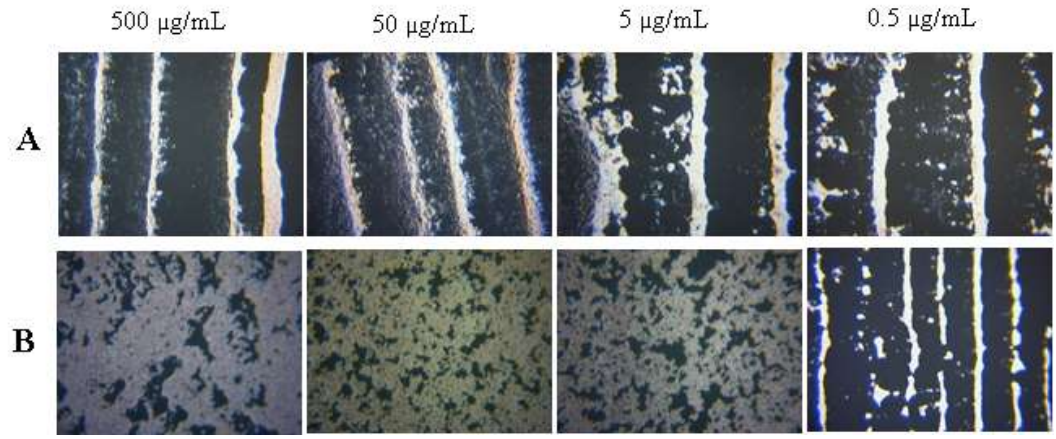
Şekil 4.7 : İletim derleme yönteminin şematik gösterimi ve oluşan yapının fotoğrafı.

AgNPler-protein karışımları hazırlanırken 20 µL AgNPler (8X) ve 20 µL protein çözeltileri kullanıldı. Cam üzerindeki oluşan yapıların proteinin yüküne ve derişimine bağlı olarak farklılık gösterdiği tespit edildi. Şekil 4.8'de negatif protein ve pozitif proteinler kullanılarak oluşturulan yapıların fotoğrafları görülmektedir.



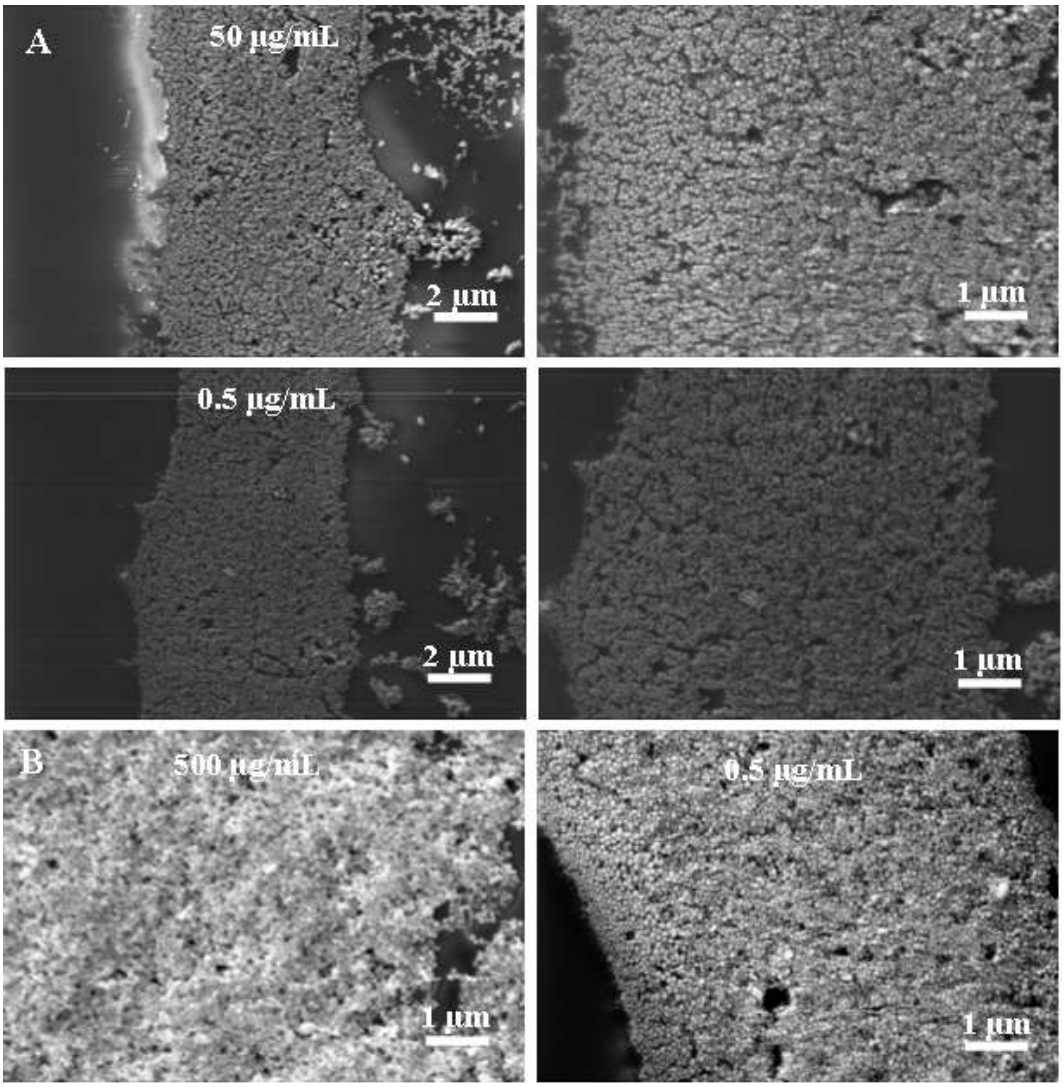
Şekil 4.8 : Farklı derişimlerdeki BSA ve lizozim proteinleri ile hazırlanan yapıların fotoğrafları.

Şekilde görüldüğü gibi negatif yüklü proteinin oluşturduğu yapı daha kalın ve şeffafken, pozitif yüklü proteinin yapısı daha ince ve koyudur. Ayrıca, negatif proteinlerde derişime bağlı olarak herhangi bir yapı değişimi olmazken, pozitif yüklü proteinlerde düşük derişimlerdeki yapının şekli negatif proteinlerin yapısına benzemektedir. Yapı farklılığının yakından incelenmesi için ışık mikroskopu kullanıldı. Derişime bağlı olarak negatif ve pozitif proteinin 50X objektif ile alınan ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.9'de görülmektedir.



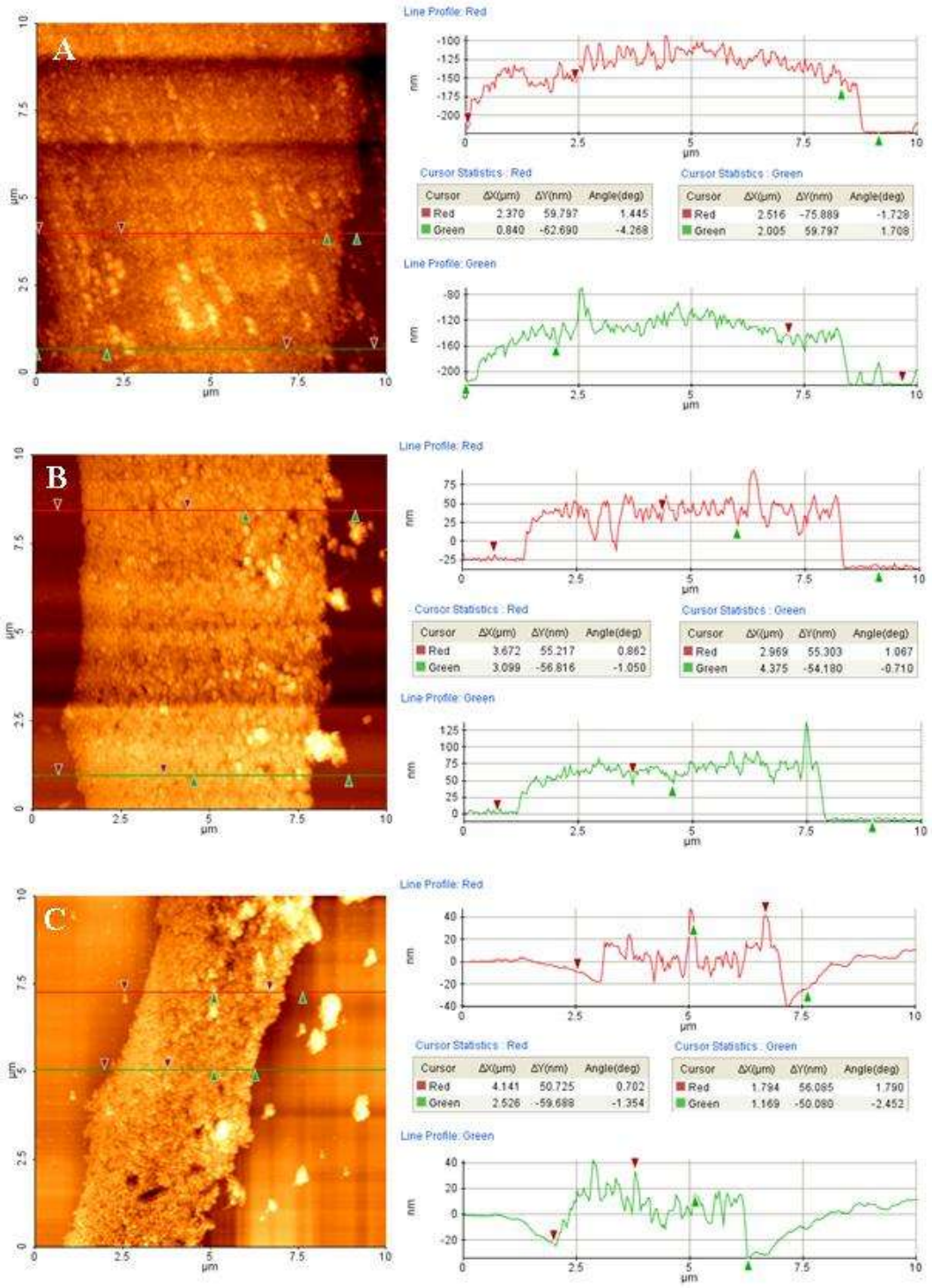
Şekil 4.9 : BSA (A) ve lizozim (B) proteinlerinin azalan protein derişimi ile hazırlanan yapıların 50X objektif ile alınan ışık mikroskop görüntüleri.

Yapılara bakıldığında bütün derişimlerde negatif yüklü proteinler şeritler şeklinde yapılar oluşturuken, pozitif yüklü proteinler yüksek derişimlerde ince film şeklinde yapılar oluşturdular. Ancak, düşük derişimlerde negatif proteinler gibi şeritler oluşturmaktadır. Paketlenme sırasında negatif yüklü proteinler ile negatif yüklü AgNPler arasında herhangi bir etkileşim olmadığı için tüm derişimlerde aynı şekilde paketlenme meydana gelmektedir. Bu yapı sadece AgNPler için de gözlemlendi. Ancak pozitif yüklü proteinler negatif yüklü AgNPler ile etkileşime girerek AgNPlerin yüzey yükünü düşürerek bir araya gelmelerini, dolayısıyla da daha çabuk paketlenmesini sağlamaktadır. Fakat düşük derişimlerde protein sayısı azaldığı için AgNPlerin yüzey yükü yeteri kadar azalmıyor ve negatif yüklü proteinler gibi şeritler halinde yapılar oluşturmaktadır. Yapıların detaylı incelemesi için ileri mikroskopik teknikler olan SEM ve AFM kullanıldı. Pozitif ve negatif yüklü proteinlerin farklı derişimlerde oluşturdukları yapıların bazılarının SEM görüntüsü Şekil 4.10'da görülmektedir.

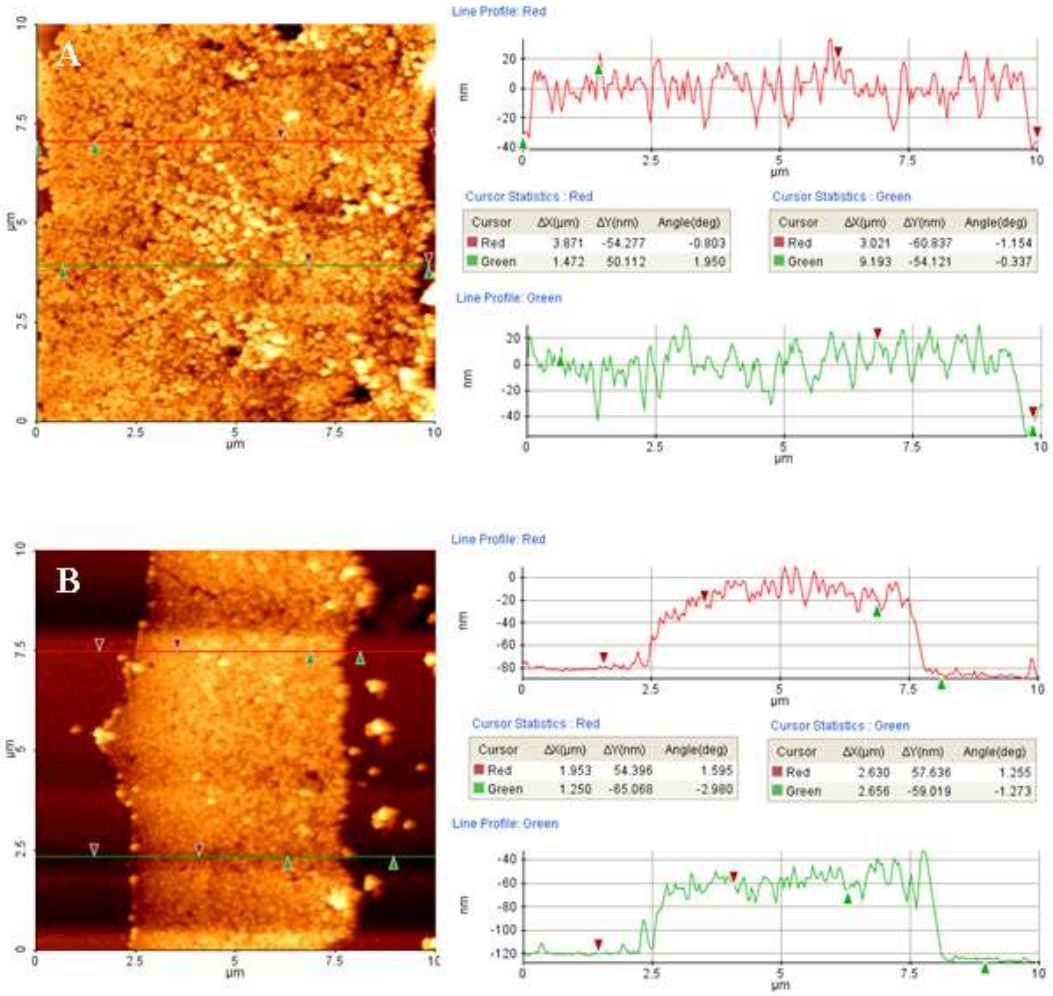


Şekil 4.10 : BSA (A) ve lizozim (B) proteinlerinin farklı derişimleri kullanılarak hazırlanan AgNP-protein yapılarının SEM görüntüleri.

Şekilde görüldüğü gibi negatif yüklü proteinler kullanılarak hazırlanan yüzeyler tüm derişimlerde 5-10 µm genişliğinde şeritler oluşturmaktadırlar. Ancak pozitif yüklü proteinler ile hazırlanan yüzeylerde, yüksek derişimlerde ince film şeklinde yüzey oluştururken, düşük derişimlerde negatif yüklü proteinler gibi şeritler oluşturmaktadır. Oluşan şeritlerin özelliklerini (yüzey pürüzlülüğü ve film kalınlığı) detaylı incelemek için AFM kullanıldı. Şekil 4.11 ve 12'de AgNPler, AgNPler-BSA ve AgNPler-katalaz ile hazırlanan yapıların AFM görüntüleri görülmektedir. Oluşan şeritlerin eni 5-10 µm arasında değişmektedir. Yapıların çizgi analizi yapıldığında bu yapıların yüksekliğinin 60 nm civarında olduğu görülmektedir. Bu da yapıların tek katmandan oluştuğunu göstermektedir. Çünkü kullanılan AgNPlerin büyüklüğü ortalama 60 nm'dir.

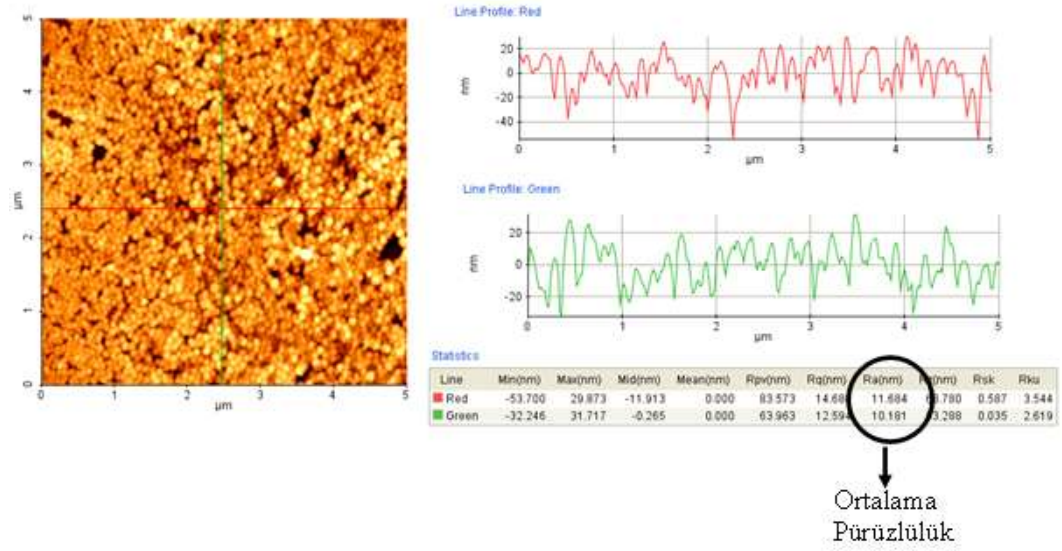


Şekil 4.11 : AgNPler (A) ve 0,5 µg/mL BSA (B) ve katalaz (C) ile hazırlanan AgNP-protein yapılarının AFM görüntüleri ve çizgi analizleri.



Şekil 4.12 : 50 µg/mL BSA (A) ve katalaz (B) ile hazırlanan AgNP-protein yapılarının AFM görüntüleri ve çizgi analizleri

Ayrıca oluşan yapıların yüzey özelliklerinin nasıl değiştiğini incelemek için 5 X 5 µm taranan alan kullanılarak ortalama yüzey pürüzlülüğü hesaplandı. Bu alanda X ve Y ekseni boyunca her bir 0,5 µm adımda (9 çizgi) ortalama pürüzlülük hesaplandı. Hesaplamada kullanılan örnek bir AFM görüntüsü Şekil 4.13'te görülmektedir. Protein derişimlerine bağlı olarak hesaplanan bu 9 bölgenin ortalamaları Çizelge 4.1'de verilmektedir. Yüzey pürüzlülüğüne bakıldığında, BSA proteini için protein derişimi arttıkça yüzey pürüzlülüğü artmakta iken, katalaz proteini için ise azalmaktadır. Bunun nedeni ise proteinlerin büyüklük farkındadır. Katalaz proteini büyük olduğu için AgNPlerin aralarını doldururken, küçük BSA proteini henüz daha boşlukları dolduramamaktadır.

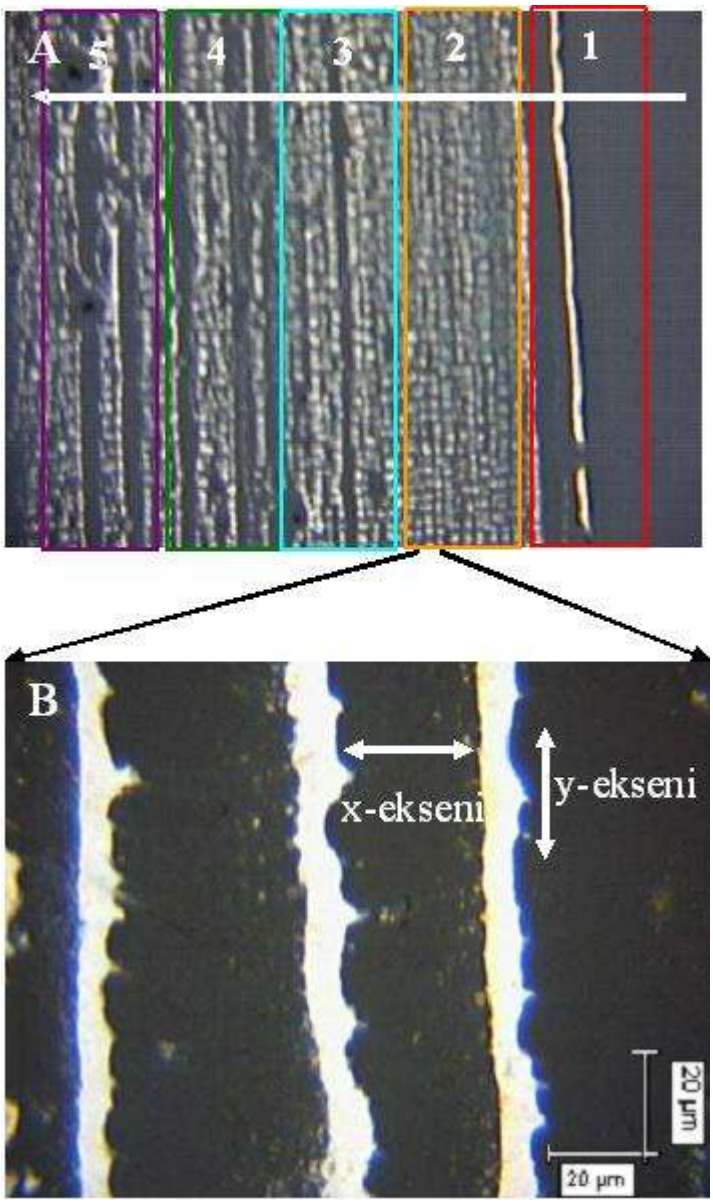


Şekil 4.13 : 5 µg/mL katalaz derişimi ile hazırlanan yapının çizgi yüzey pürüzlülüğü analizi.

Çizelge 4.1 : Artan protein derişimine bağlı olarak hesaplanan ortalama yüzey pürüzlükleri

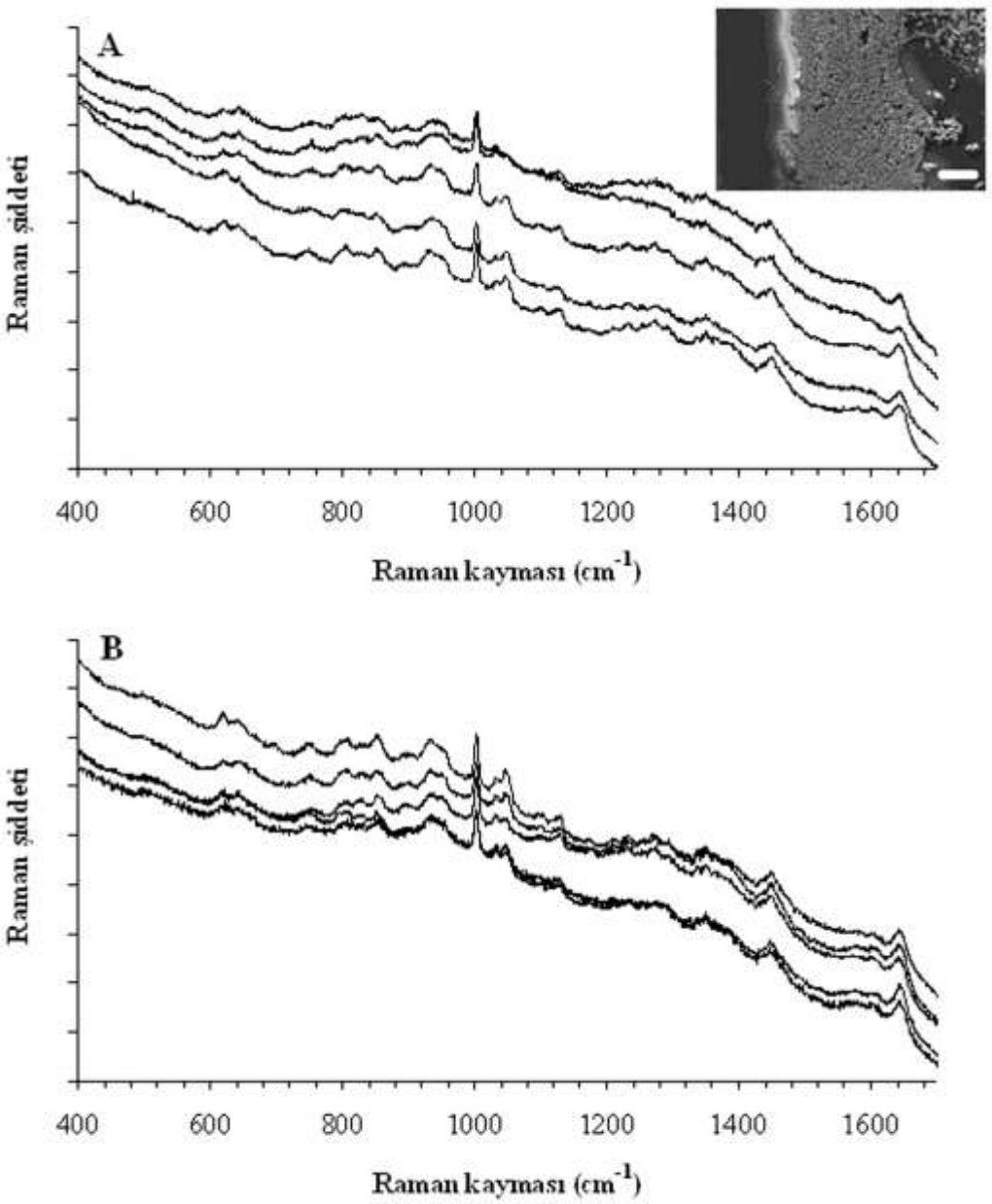
Yüzey Pürüzlülüğü (nm)	**Yön**	**0,5 µg/mL**	**5 µg/mL**	**50 µg/mL**
AgNPler	x	8,29±0,67		
	y	8,18±1,25		
BSA	x	8,15±1,19	8,12±1,02	9,23±0,91
	y	8.18±2.33	8.17±0.91	9,49±1,23
Katalaz	x	11,04±1,74	10,80±1,54	6,89±1,18
	y	11,37±2,93	10,11±1,76	7,18±1,92

Oluşan yapıları detaylı inceleme yaptıktan sonra hazırlanan bu yüzeylerden alınan YZRS spektrumunun tekrarlanabilirliği test edildi. Tekrarlanabilirliği test etmek için hazırlanan yüzeyler 5 eşit parçaya bölündü (Şekil 4.14). Bu bölünen parçaların her bir bölgesinden X ve Y ekseni boyunca 5'er spektrum alındı.

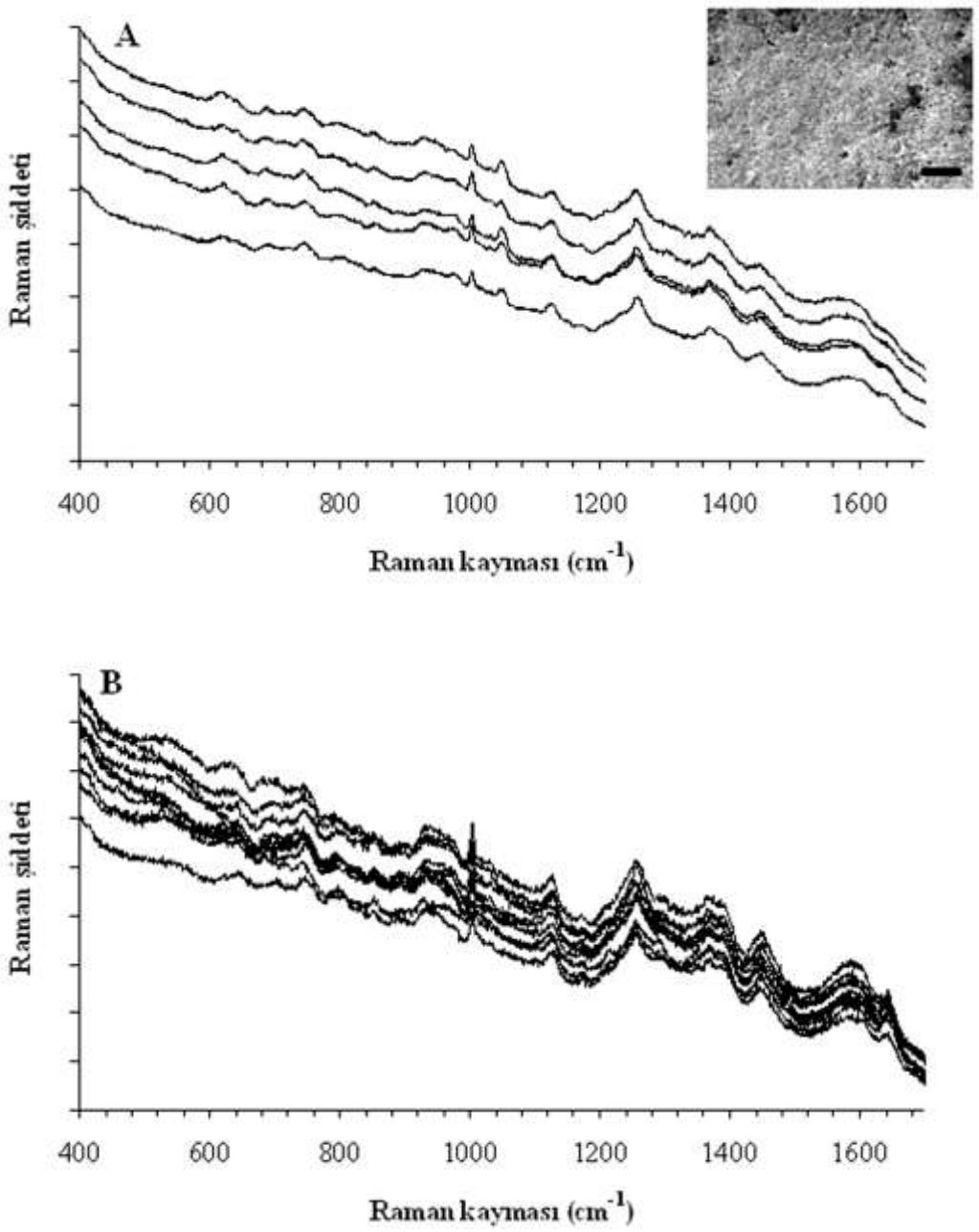


Şekil 4.14 : 5X (A) ve 50X (B) objektif ile alınan ışık mikoskop görüntüleri.

Şekil 4.15'te BSA proteini ile hazırlanan yüzeyin her bir bölgeden X (A) ve Y (B) ekseni boyunca alınmış ortalama 5 spektrum görülmektedir. Şekil 4.16'da ise sitokrom c proteini ile hazırlanan X (A) ekseni boyunca ve herhangi bir bölgeden alınan 10 spektrum (B) görülmektedir. Spektrumlara bakıldığında hazırlanan yüzeylerin her bölgesinden neredeyse aynı spektrum gelmektedir. Ayrıca rastgele seçilmiş 10 noktada alınan YZRS spektrumların varyasyon katsayısı hesaplandığında bu değerin %15 civarında olduğu görülmektedir. Bu da biyolojik yapıların YZRS çalışmalarında kabul edilebilir bir sonuçtur.

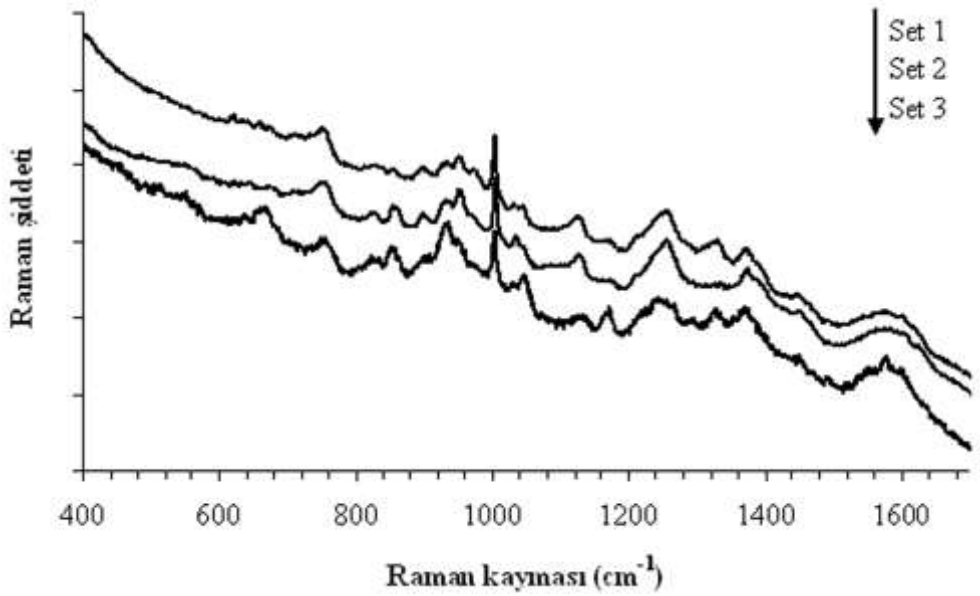


Şekil 4.15 : AgNP-BSA karışımı (50 µg/mL) ile hazırlanan yüzeylerin X ekseni (A) ve Y (B) ekseni boyunca her bir bölgeden alınan 5 spektrumun ortalama YZRS spektrumları

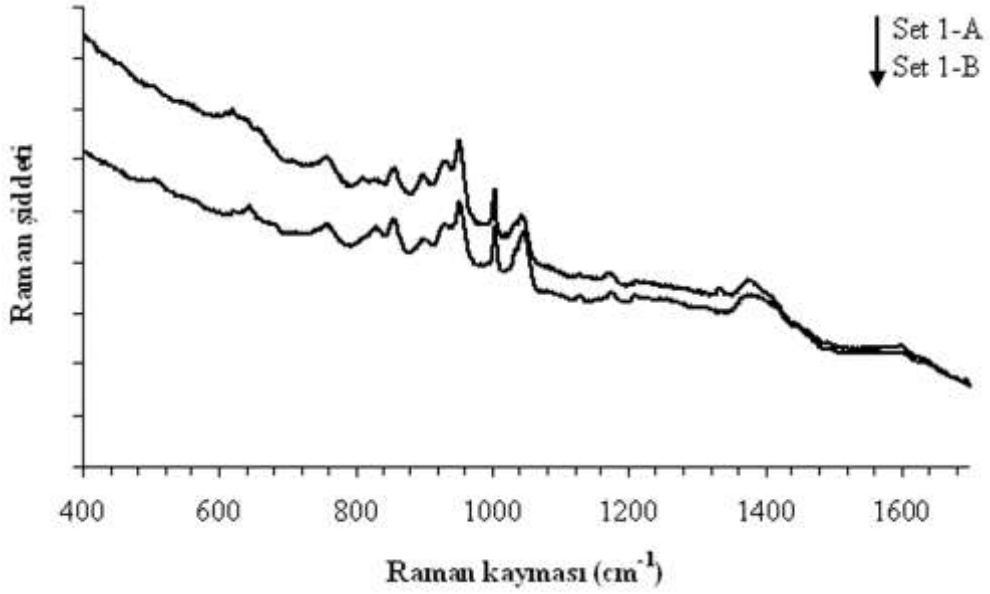


Şekil 4.16 : AgNP-sikotrom c (50 µg/mL) karışımı ile hazırlanan yüzeylerin X ekseni boyunca her bir bölgeden alınan 5 spektrumun ortalama YZRS spektrumları (A) ve bir bölgeden rastgele alınan 10 YZRS spektrumları (B).

Ayrıca aynı AgNPler ile farklı zamanlarda hazırlanan yüzeylerin ve farklı AgNPler ile farklı zamanlarda hazırlanan yapıların tekrarlanabilirliği de test edildi. Şekil 4.17 ve 18'de sırasıyla, aynı AgNPler kullanılarak farklı zamanda hazırlanan AgNP-insulin proteininden alınan YZRS spektrumları ve farklı zamanlarda sentezlenmiş AgNPler kullanılarak hazırlanan AgNP-hemoglobin proteinin YZRS spektrumları görülmektedir.

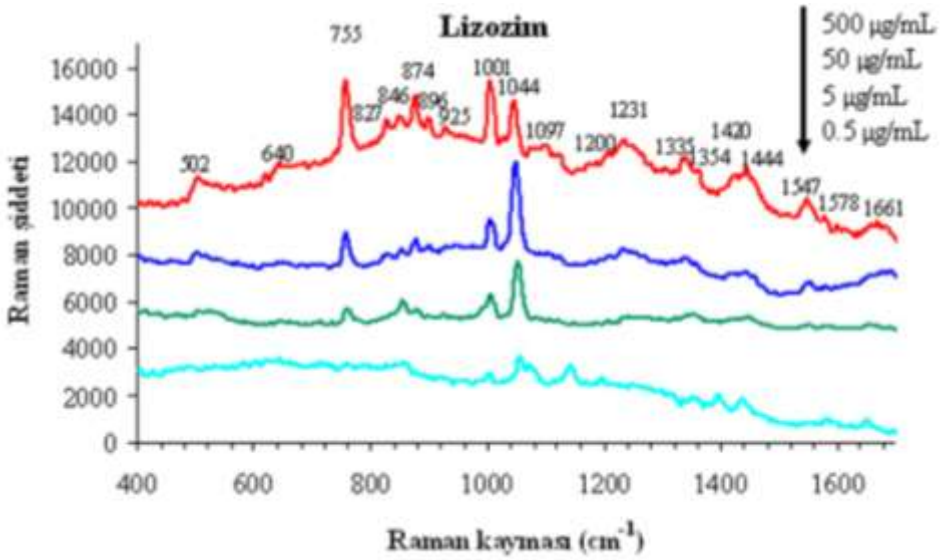


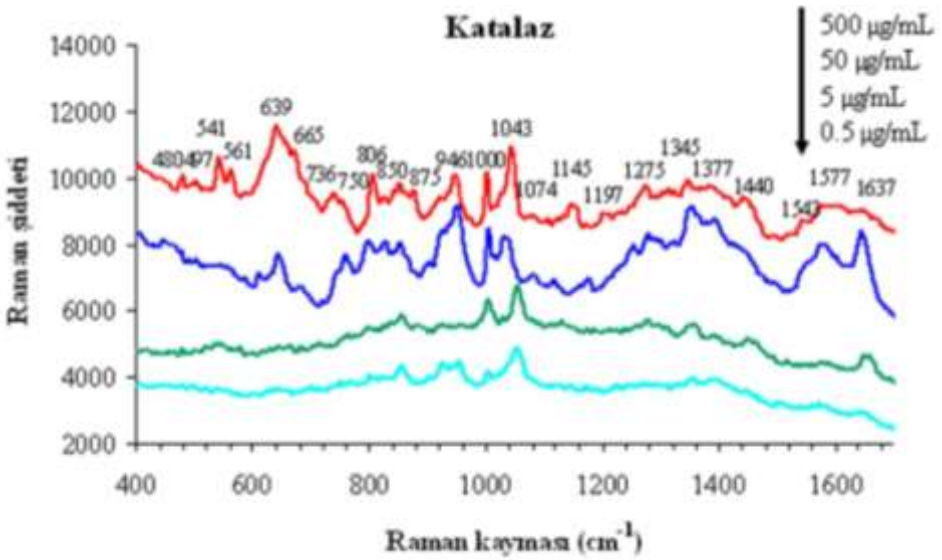
Şekil 4.17 : Aynı AgNPler kullanılarak farklı zamanlarda AgNP-insulin karışımı ile hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları.

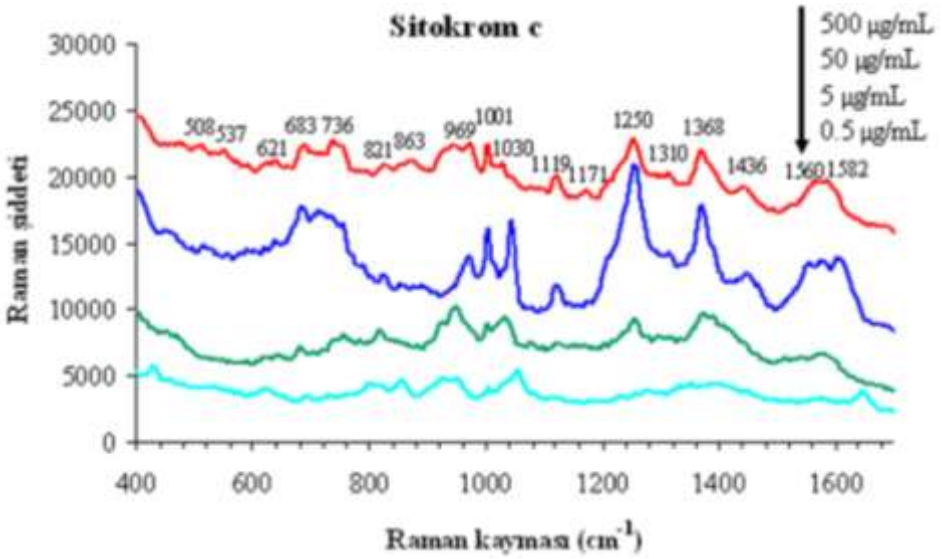


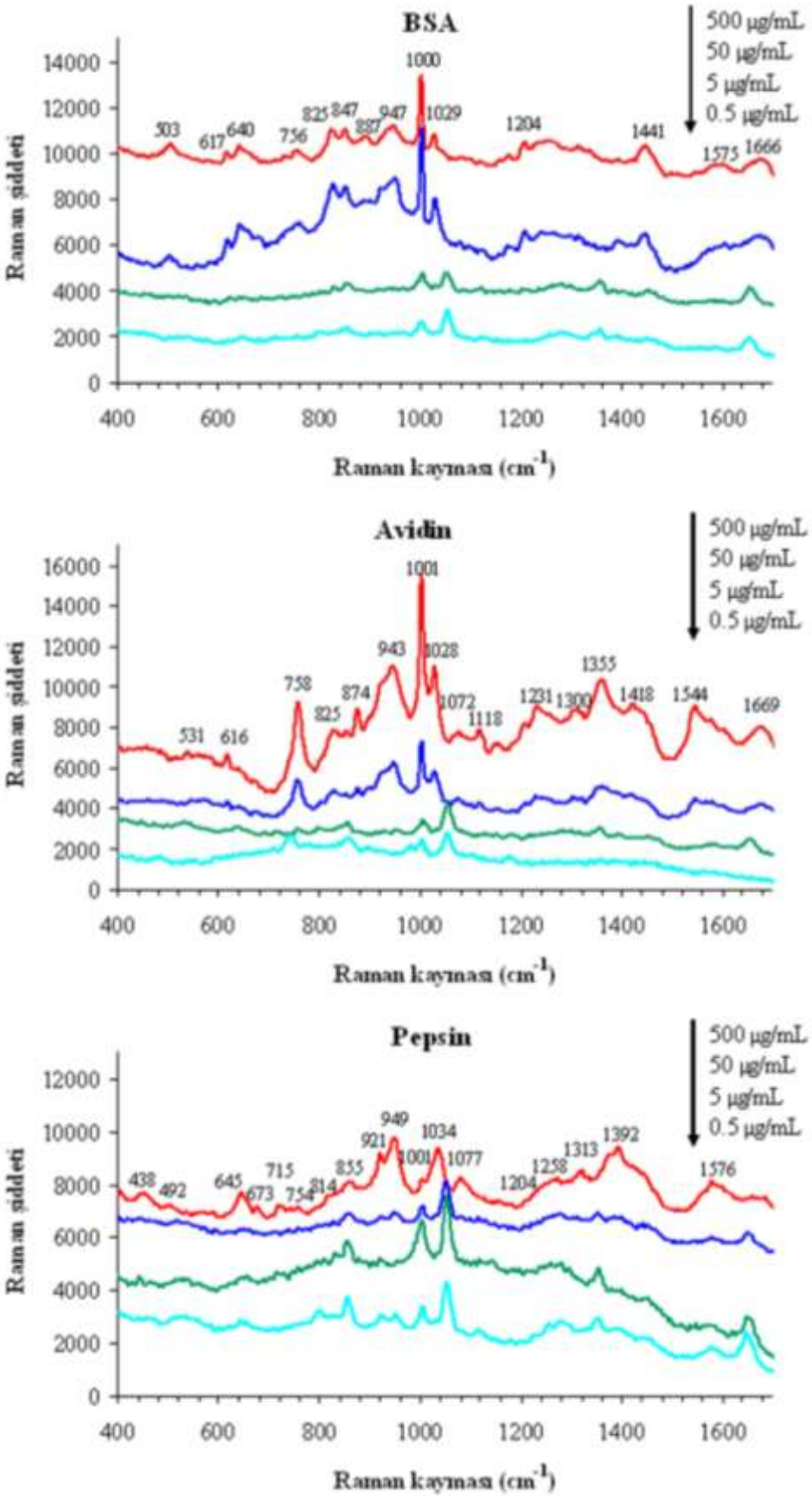
Şekil 4.18 : Farklı zamanlarda sentezlenmiş AgNPler kullanılarak AgNP-hemoglobin karışımı ile hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları.

Seçilen proteinlerin tayin edilebilecek en düşük derişimini belirlemek için en son protein derişimi 500, 50, 5, 0,5 µg/mL olacak şekilde yüzeyler hazırlandı. Hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları Şekil 4.19'de görülmektedir. Görüldüğü gibi proteinlerin büyüklüğüne ve yüzey yüküne bağlı olmaksızın 0,5 µg/mL protein derişimine kadar proteinler kolaylıkla tayin edilebilmektedir. Düşük derişimlerde ortaya çıkan 1050 cm^{-1} civarındaki pik AgNPlerden kaynaklanmaktadır.


Lizozim
500 µg/mL
50 µg/mL
5 µg/mL
0.5 µg/mL
Raman şiddeti
Raman kayması (cm-1)

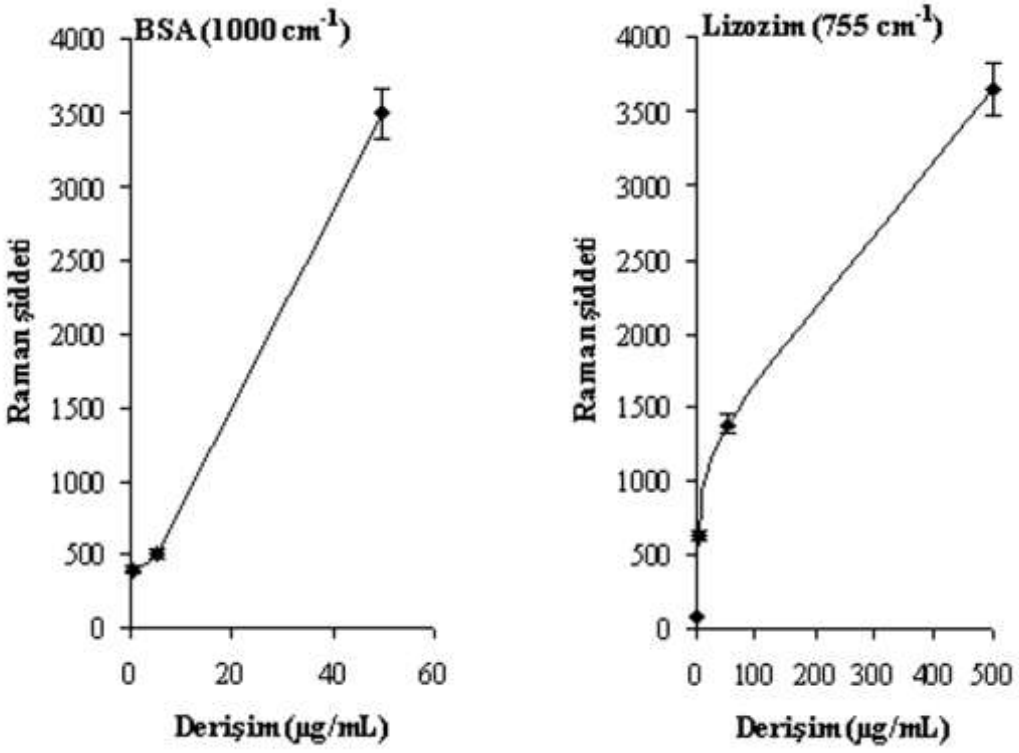

Katalaz
500 µg/mL
50 µg/mL
5 µg/mL
0.5 µg/mL
Raman şiddeti
Raman kayması (cm-1)


Sitokrom c
500 µg/mL
50 µg/mL
5 µg/mL
0.5 µg/mL
Raman şiddeti
Raman kayması (cm-1)



Şekil 4.19 : Azalan derişime bağlı olarak proteinlerin YZRS spektrumları.

Proteinlerin derişime bağlı olarak kalibrasyon grafiği çizebilmek için, farklı protein derişimleri kullanılarak hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumundaki en şiddetli pik şeçildi. Farklı protein derişimlerine karşı, hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumundaki seçilen pik şiddeti grafiği çizilerek kalibrasyon eğrisi elde edildi (Şekil 4.20). BSA proteini için 1000 cm^{-1}, lizozim proteini için 755 cm^{-1}'deki pik şiddetleri kullanılarak derişim-şiddet eğrisi çizildi. YZRS deneylerinde doğrusal kalibrasyon eğrisi elde etmek çok mümkün değildir. Çünkü YZRS deneylerini o kadar etkileyen parametre vardır ki, analit derişimi bunların yanında çok çok küçük bir etki yapmaktadır. Ancak şekilde görüldüğü gibi BSA ve lizozim proteinin farklı derişimleri kullanılarak hazırlanan yüzeylerden alınan Raman şiddetleri eğrisi neredeyse doğrusaldır. Bu yöntem kullanılarak proteinlerin kantitatif tayinlerinin yapılabilmesi mümkündür.



Şekil 4.20 : BSA ve lizozim derişimlerine bağlı olarak alınan YZRS şiddetlerinin eğrileri.

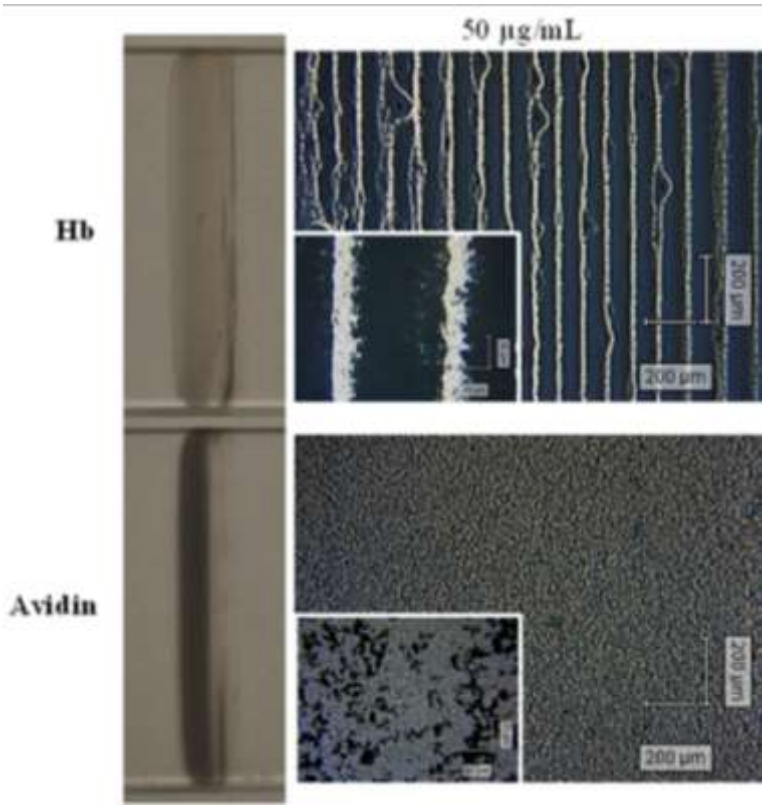
Çizelge 4.2'de ise proteinlerden alınan spektrumlardaki Raman kaymalarının hangi moleküllerden kaynaklandığını gösteren pik değerlendirmesi görülmektedir [302].

Çizelge 4.2 : Proteinlerden elde edilen YRZS spektrumlarının pik değerlendirmeleri.

Raman kayması (cm^{-1})						
BSA	**Katalaz**	**Pepsin**	**Sitokrom c**	**Avidin**	**Lizozim**	**Pik Değerlendirmeleri**
503	---	492	508	---	502	Cys
---	---	---	537	531	---	Trp
617	---	---	621	616	---	Phe
640	639	645	---	---	640	Try
---	---	---	683	---	---	---
756	750	754	736	758	755	Trp
---	806	---	---	---	---	---
825		814	821	825	827	Try
847	850	855	---	---	846	Try
---	---	---	---	874	874	Trp
887	---	---	---	---	896	Trp
947	946	949	969	943	---	C-C
1000	1000	1001	1001	1001	1001	Phe
1029		1034	1030	1028		Phe
---	1043	---	---	---	1044	Trp
---	---	1077	---	1072	---	---
---	---	---	1119	1118	---	---
---	1145	---	---	---	---	---
---	---	---	1171	---	---	Try
1204	1197	1204	---	---	---	Try +Phe
---	---	---	---	1231	1231	Amit III
---	---	1258	1250	---	---	Amit III
---	1275	---	---	---	---	Amit III
---	---	---	---	1300	---	---
---	---	1313	---	---	---	---
---	---	---	---	---	1335	Trp
---	---	---	1368	1355	---	Trp
---	---	1392	---	---	---	---
---	---	---	---	1418	1420	CH_2
1441	1440	---	1436	---	1444	CH_2
---	---	---	1560	1544	1547	Trp
1575	1577	1576	1582	---	---	Phe
	1637	---	---	---	---	Amit I
1666	---	---	---	1669	1661	Amit I

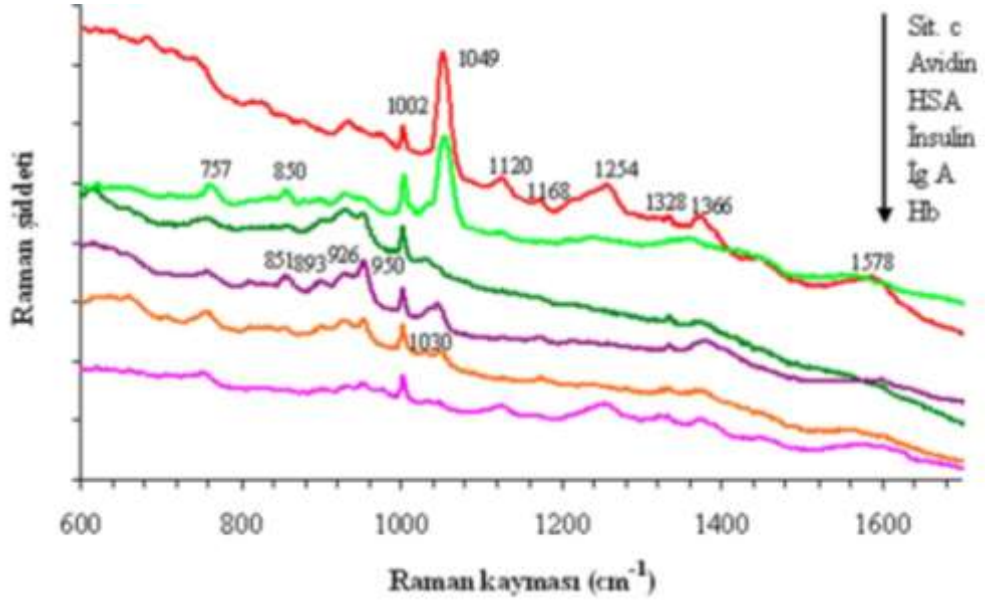
4.3 İletim Derleme Yöntemi ile Protein Karışımlarının Tayini

Protein karışımlarının tayininde en önemli basamak proteinlerin ayrılmasıdır. Genellikle proteinler tayin edilmeden önce sıvı kromotografisi veya kapiler elektroforez ile ayrılırlar ve genelikle MS ile tayin edilirler. Protein karışımlarının YZRS ile tayinin olabileceği rapor edilmiştir [19]. Bu raporda öncelikle protein karışımı PAGE elektrofoz yöntemi ile ayrıldıktan sonra proteinler bir selüloz membran üzerine transfer edilmiş (Western blotting) ve bu membran üzerinde ayrılan proteinlere kolloidal AgNPler damlatılarak proteinlerden YZRS spektrumları elde edilmiştir. Protein karışımlarını iletim derleme yöntemi ile ayrılması ve YZRS ile tayininin olabilirliğini araştırmak için AgNPler ile tekli, ikili ve üçlü protein karışımları hazırlandı. Hazırlanan bu karışımlar iletim derleme yöntemi ile cam lam üzerine biriktirildi. Oluşan yüzeylerin fotoğrafı ve 5X ve 50X altındaki ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.21'de görülmektedir. Görüldüğü gibi yine aynı şekilde pozitif yüklü proteinler (avidin) ince film şeklinde yüzeyler oluştururken, negatif yüklü proteinler (Hb) şeritler halinde yüzeyler oluşturmaktadır.

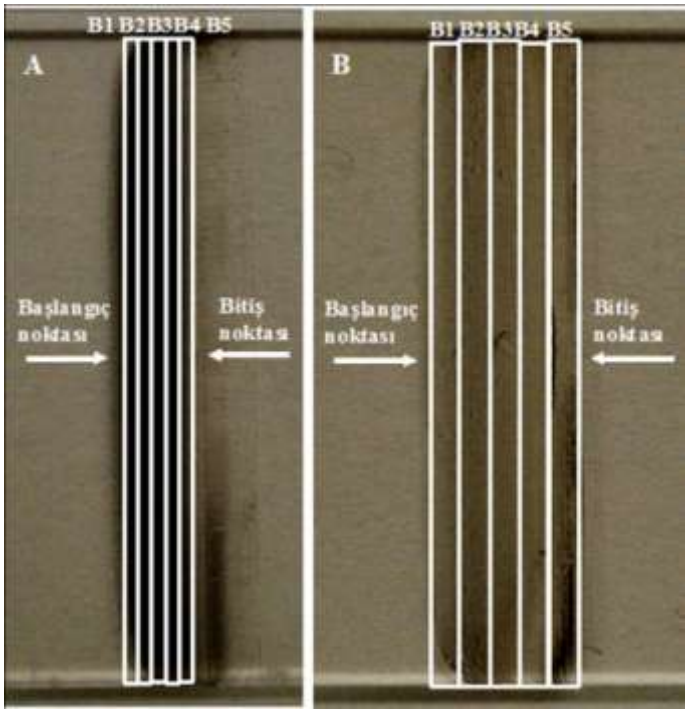


Şekil 4.21 : İletim derleme yöntemi ile cam yüzey üzerine hazırlanan AgNP-Hb ve AgNP-avidin yüzeylerinin fotoğrafları ve ışık mikroskop görüntüleri.

Öncelikle protein karışımlarının tayininde kullanılacak proteinler iletim derleme yöntemi ile cam yüzey üzerine biriktirildiler. Proteinler ile hazırlanan yüzeylerden alınan YZRS spektrumu Şekil 4.22 görülmektedir. Görüldüğü gibi her protein kendine özgü parmak izi özelliğinden dolayı farklı spektrumlara sahiptir.



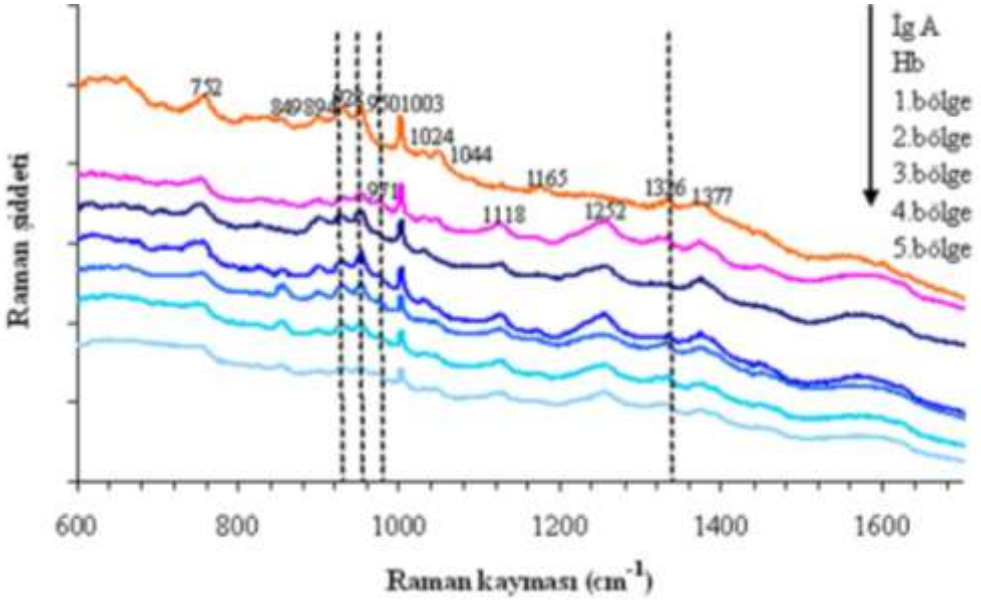
Şekil 4.22 : Çalışmada kullanılan her bir proteinin YZRS spektrumu.



Şekil 4.23 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanmış sitokrom c-avidin (A) ve İg A-Hb (B) ikili protein karışımlarının oluşturdukları yapıların fotoğrafları ve bölünmüş alanları.

İkili ve üçlü protein-AgNP karşımları hazırlanarak iletim derleme yöntemi ile cam yüzey üzerine yüzeyler oluşturuldu. Bu karışımlar hazırlanırken, aynı yüke sahip fakat molekül ağırlıkları farklı veya zıt yüke sahip aynı molekül ağırlığa sahip proteinler kullanıldı. Hazırlanan yüzeylerin fotoğrafı Şekil 4.23'te görülmektedir. İçerisinde pozitif yüklü protein varsa oluşan alan daha küçük iken (A), pozitif yüklü protein olmadığında oluşan alan daha geniştir. Protein karşımları incelenirken oluşan yapı 5 bölgeye ayrıldı. Bölge ayrılması yaparken öncelikle oluşan toplam yüzeyin genişliği ölçüldü ve bu genişlik 5 eşit parçaya ayrıldı. Şekil 4.23 A'da görülen her bir bölge 500 µm iken Şekil 4.23 B'de görülen her bir bölge 900 µm'dir. Bu yüzeylerden YZRS spektrumu alırken her bir bölge sınırları içerisinde x ve y ekseni boyunca rastgele 10 noktadan spektrumlar alındı. Alınan bu 10 spektrumun ortalaması alınarak her bir bölge için bir spektrum elde edildi.

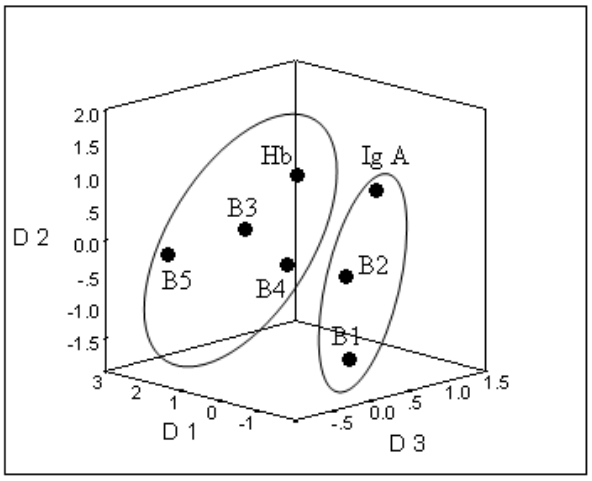
Şekil 4.24'te negatif yüklü fakat farklı molekül ağırlığa sahip olan İmmunoglobulin A (Ig A) ve Hemoglobin (Hb) proteinleri ile hazırlanmış yüzeyin 5 farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları görülmektedir. Spektrum üzerindeki değişiklikler kesikli çizgiler ile belirtildi.



Şekil 4.24 : Ig A, Hb ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları.

Birinci bölgeden (B1) beşinci bölgeye (B5) giderken belirtilen piklerde değişim gözle bile fark edilebilmektedir. İlk bölgelerden sonlara doğru hareket edildiğinde Ig A proteinine ait olan 928 cm^{-1} ve 950 cm^{-1}'deki piklerin şiddetinin düştüğünü ve Hb ait olan daha 971 cm^{-1} ve 1326 cm^{-1}'deki piklerin ortaya çıktığı kolaylıkla

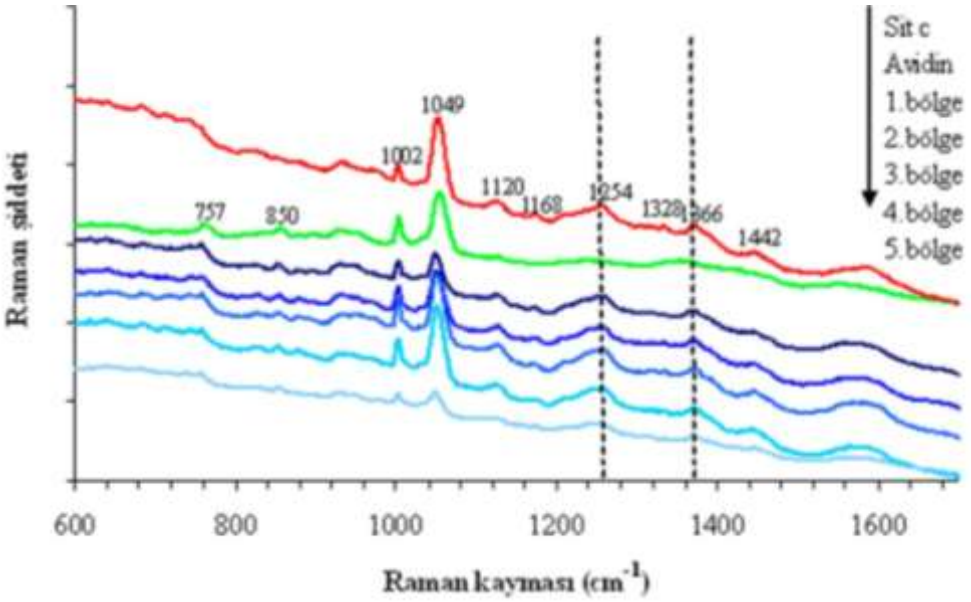
görülmektedir. Her bölgeden alınan ortalama spektrumların verileri kullanılarak (2005 veri) SPSS istatistik programı ile bu verilerin birbirine yakınlıkları incelendi. Şekil 4.25'te üç boyutlu Euclidian uzaklık dağılımları görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi birinci ve ikinci bölgeler Ig A proteinin yakın iken diğer bölgeler Hb proteinine yakındır. Bunun nedeni ise, Ig A proteinin büyüklüğünün Hb proteine göre çok büyük olduğundan, iletim derleme süreci sırasında büyük proteinler daha önce yüzeye birikirken daha küçük protein olan Hb'nin yüzeye daha geç birikmesidir.



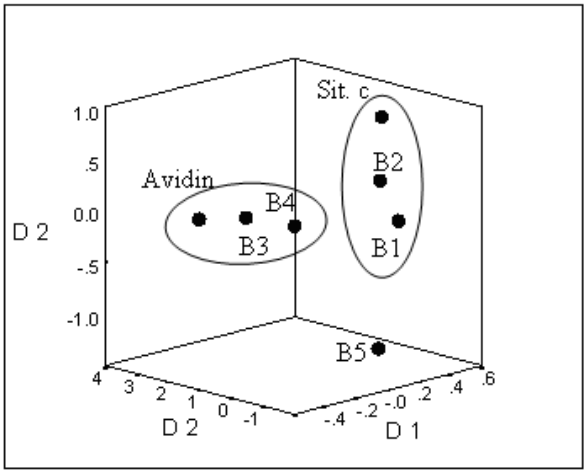
Şekil 4.25 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği.

İki pozitif yüklü ve farklı moleküler ağırlığa sahip proteinler seçildiğinde ise ayırım negatif yüklü proteinler gibi olmamaktadır. Negatif yüklü proteinlerde AgNPler ile herhangi bir etkileşim olmazken, pozitif yüklü proteinler negatif yüklü AgNPler ile elektrostatik etkileşime girerler. Şekil 4.26'da avidin ve sitokrom c proteini ile hazırlanan yüzeyin 5 farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları görülmektedir. İlk bölgeden son bölgeye doğru gittikçe sitokrom c proteinine ait olan 1254 ve 1366 cm^{-1} pik şiddetlerinde azalma görülmektedir. İlk bölgelerde sitokrom c proteinin spektrumu baskın iken son bölgelerde avidin proteinin spektrumu baskındır. Bu da sitokrom c proteinin daha önce yüzeye biriktiğini göstermektedir. Her bölgeden alınan ortalama spektrumların verileri kullanılarak SPSS istatistik programı ile bu verilerin birbirine yakınlıkları incelendi. Şekil 4.27'de üç boyutlu Euclidian uzaklık dağılımları görülmektedir. Birinci ve ikinci bölgelerden alınan YZRS spektrumları sitokrom c proteinine yakın iken, diğer bölgelerden alınan spektrumlar avidin proteinine yakındır. Karışımdaki protein derişimine bakıldığında her iki proteinin

derişimi 50 µg/mL'dir. Kullanılan proteinlerin molekül ağırlıklarına baktığımızda ise avidin proteininin molekül ağırlığı sitokrom c proteinin 5 katıdır. Dolayısla mol sayıları karşılaştırıldığında sitoktom c proteinin mol sayısı avidin proteininden 5 kat daha büyüktür. Bu proteinler NPler ile karıştırıldığında, sayıca fazla olan sitokrom c proteini ile NPler daha fazla etkileşerek ilk bölgelerde birikecektir. Bu nedenle ilk bölgelerde sitokrom c proteinin spektrumu baskın gelmektedir. Ancak unutmamalıdır ki bu bölgelerde avidin proteini de sitokrom c ile birlikte yüzeye birikebilir.

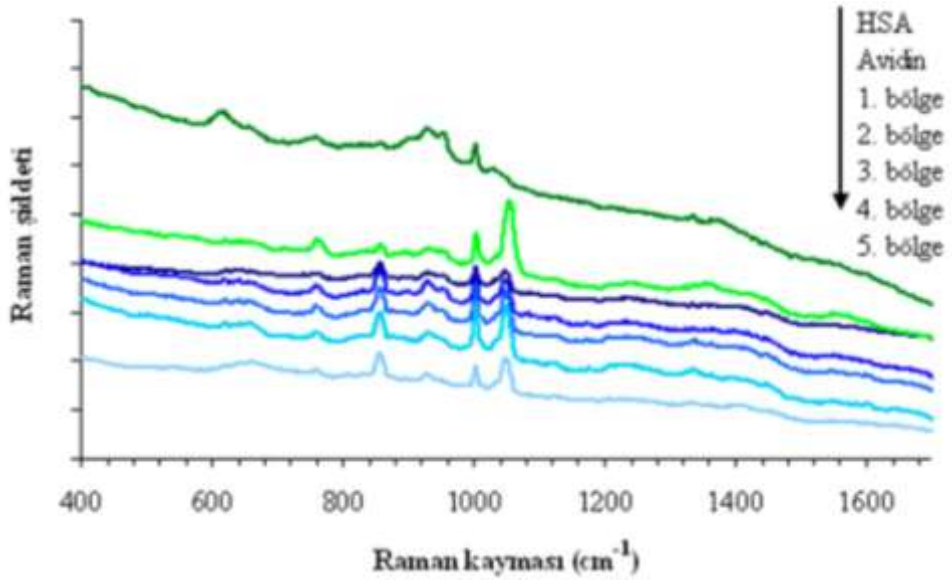


Şekil 4.26 : Avidin, sitokrom c ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları.



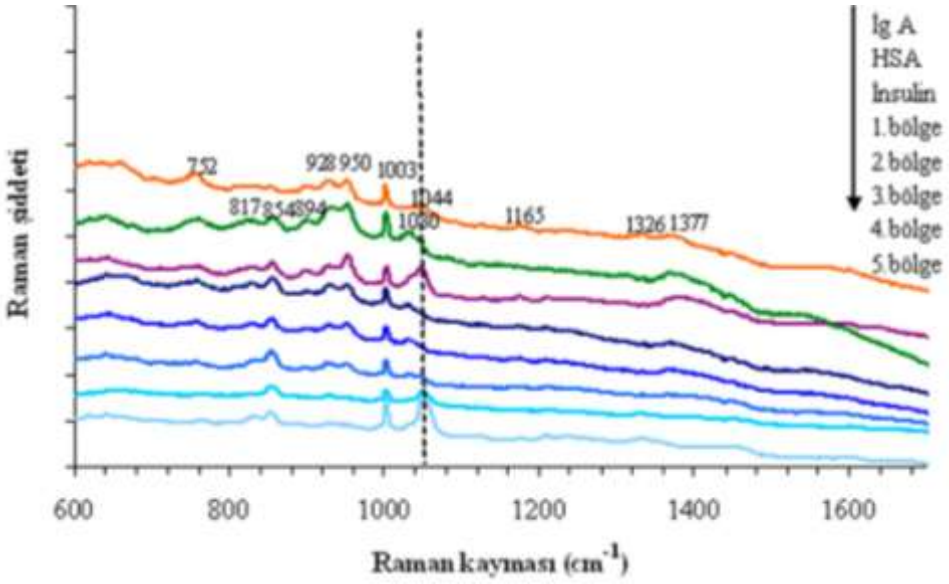
Şekil 4.27 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği.

Aynı molekül ağırlığa sahip fakat zıt yüklü olan protein karşımlarını incelediğinde ise bu iki proteinin bu yöntemle ayrılamayacağı gözlemlendi (Şekil 4.28). Şekilde görüldüğü gibi tüm bölgelerden alınan spektrumlar birbirine çok benzemektedir. Zıt yüklü proteinler NPler ile karıştırıldığında hem kendi aralarında hem de pozitif yüklü protein (Avidin) negatif yüklü NPler ile etkileşime girerek ayrılmayı engellemektedirler. Bu karmaşık ortamda proteinlerin ayrılması ortam şartlarını (sıcaklık ve pH) değiştirerek veya biyolojik molekül ekleyerek gerçekleştirilebilir.

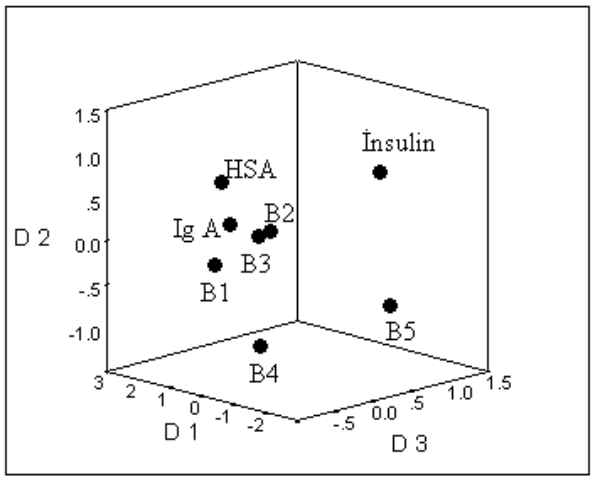


Şekil 4.28 : HSA, avidin ve ikili protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları.

Aynı yüke sahip fakat farklı moleküler ağırlığa sahip proteinlerden oluşan üçlü karışım hazırlanıp yüzeye depozit edildiğinde ise yine moleküler ağırlığa bağlı olarak bir ayrım söz konusudur. Şekil 4.29'da İg A, HSA ve sitokrom c proteini ile hazırlanan yüzeyin 5 farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları görülmektedir. Şekil 4.30'da ise üç boyutlu Euclidian uzaklık dağılımları görülmektedir. İlk bölgelerde İg A ve HSA yakın iken, son bölgere doğru insulin proteinine yaklaşmaktadır. Spektrumlara bakıldığı zaman HSA ve İg A proteinlerinin YZRS spektrumlarının birbirine benzer olduğu rahatça görülmektedir. Bu nedenle ilk bölgelerdeki spektrumlar birbirine yakın olarak dağılmışlardır.



Şekil 4.29 : İg A, HSA, sitokrom c ve üçlü protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerin başlangıç noktasından itibaren alınan beş bölgenin YZRS spektrumları.

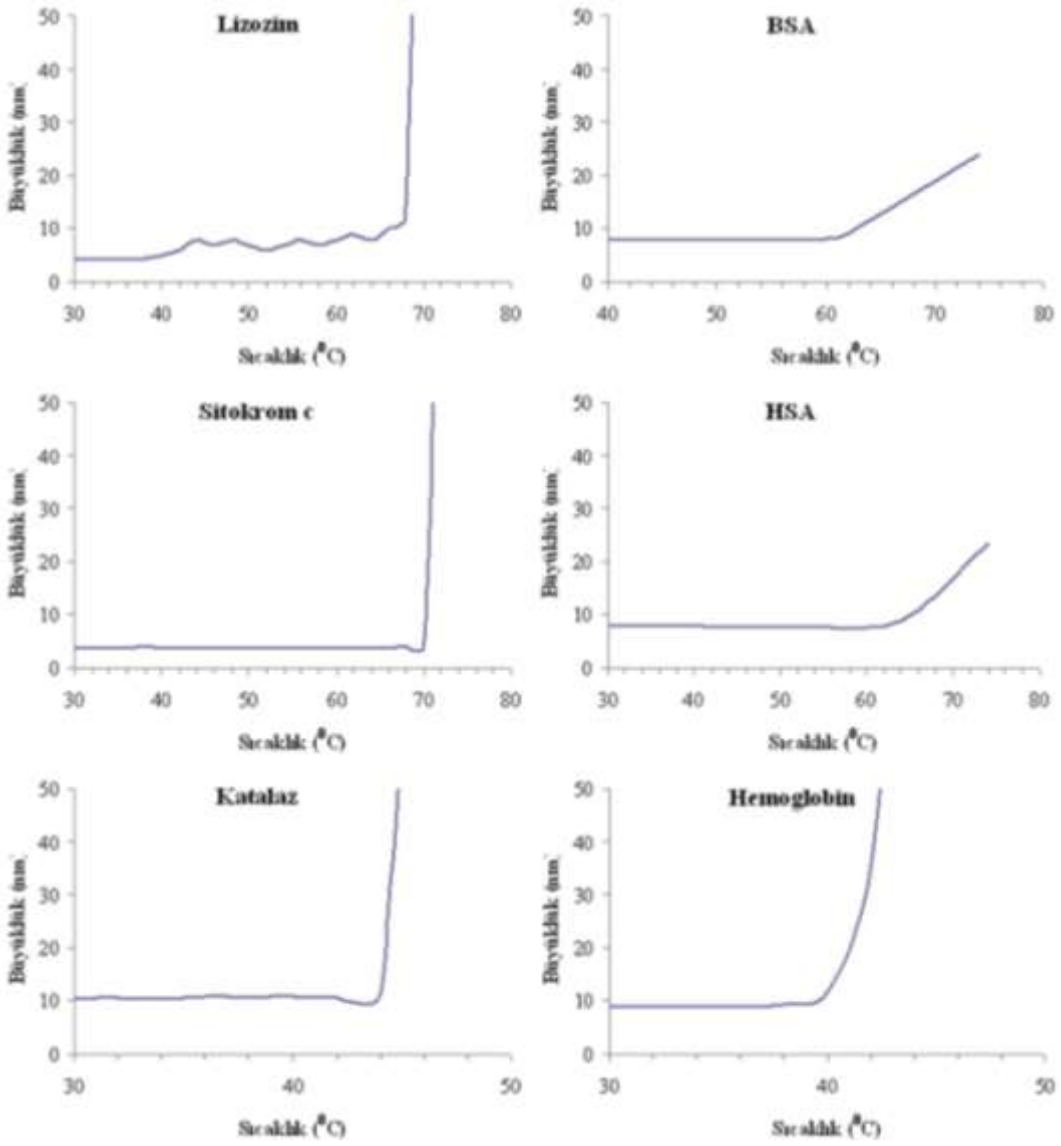


Şekil 4.30 : Üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği

4.4 Protein Karışımlarının Tayininde Sıcaklığın Etkisi

Proteinleri denatüre etmek için bazı yöntemlerden daha önce bahsedilmişti. Bu çalışmada proteinleri denatüre etmek için sıcaklık kullanılmıştır. Proteinlerin denatürasyon/erime sıcaklıklarının belirlenmesi için Zetasizer cihazı kullanıldı. Bu cihazın çalışma prensibi ve sıcaklıkla proteinlerin denatürasyonunun detaylarından daha önce bahsedildi. Her bir proteinin amino asit dizilimi kendine özgü ve üç boyutlu yapısını belirlemektedir. Üçüncül yapı yan zincirdeki zayıf etkileşimlerden dolayı oluştuğundan, sıcaklıkla bu bağlar kırılarak protein denatüre edilmektedir.

Zetasizer cihazı ile belirlenen bazı proteinlerin denatürasyon eğrisi Şekil 4.31'de görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi her bir proteinin denatürasyon profilleri farklıdır. Bu farklılık proteinlerin amino asit farklılığından kaynaklanmaktadır.



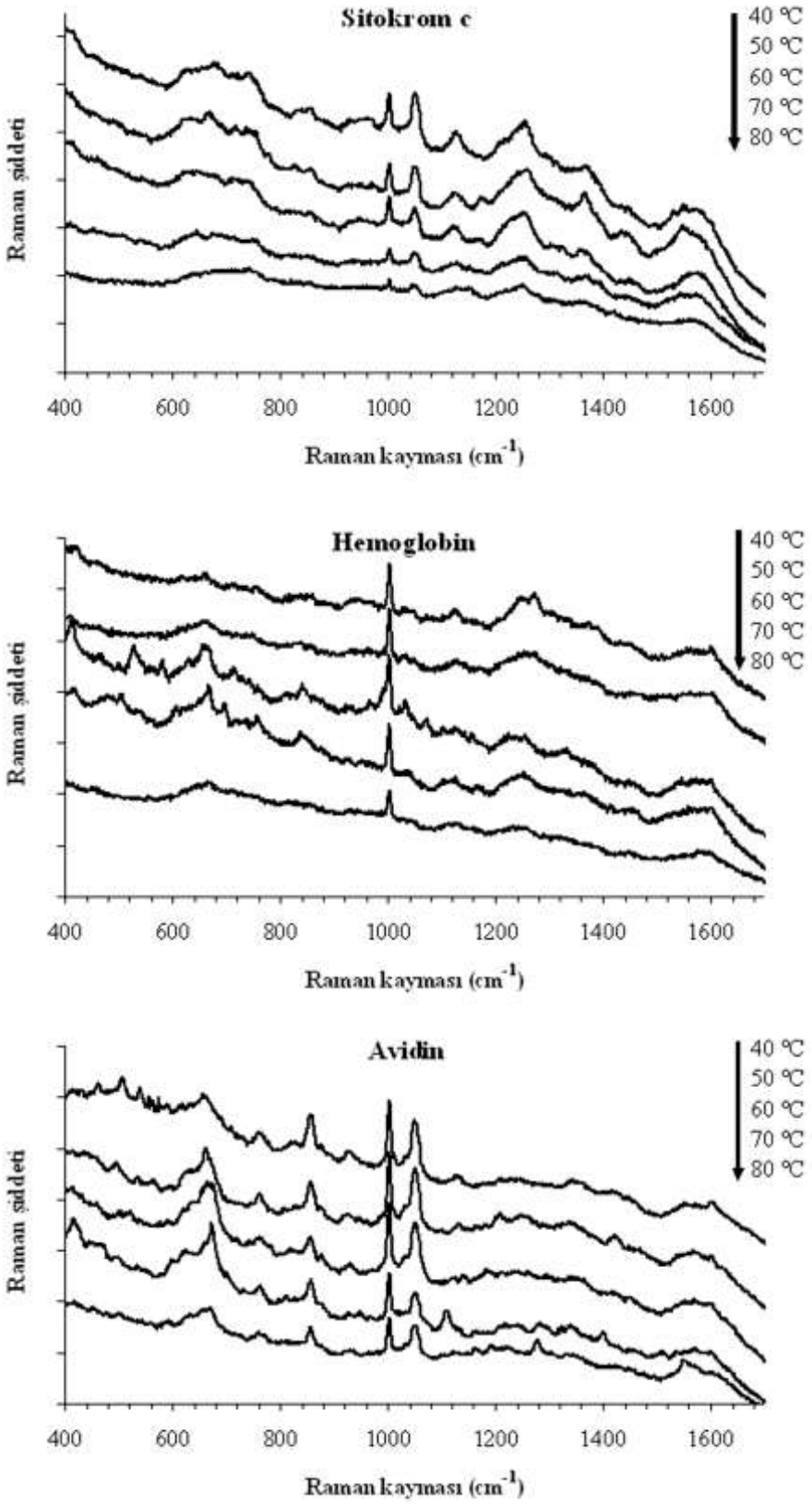
Şekil 4.31 : Proteinlerin sıcaklıkla denatürasyon profilleri.

Çizelge 4.3'te Zetasizer ile belirlenen bazı proteinlerin denatürasyon sıcaklıkları verilmektedir. Çizelgede görüldüğü gibi her proteinin kendisine özgü bir denatürasyon sıcaklığı vardır.

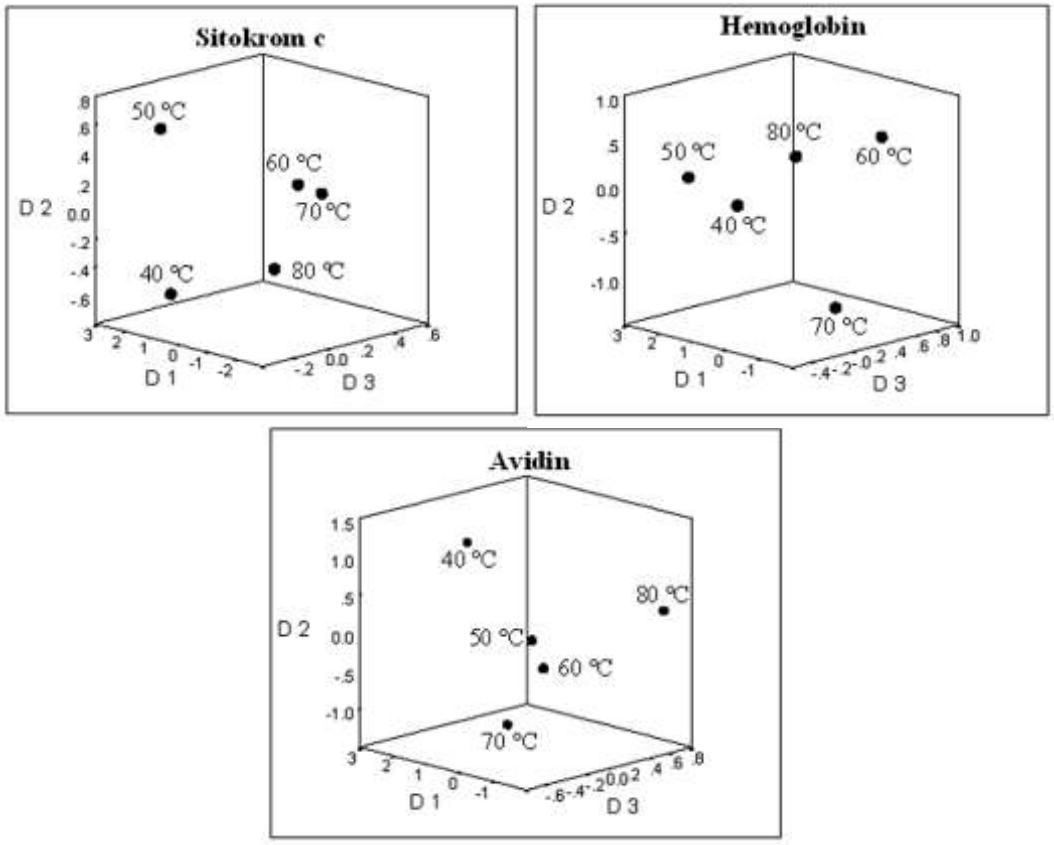
Çizelge 4.3 : Proteinlerin erime/denatürasyon sıcaklıkları.

Protein	BSA	HSA	Sitokrom c	Lizozim	Katalaz	Hemoglobin
Erime/Denatürasyon Noktası (°C)	64	64	70	68	44	40

İletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-protein yüzeyleri Raman spektrometre cihazına takılabilen sıcaklık düzeneği ile ısıtıldı ve farklı sıcaklıklarda YZRS spektrumları alındı. 40 °C'den 80 °C'ye kadar 10 °C'lik artışlarla beş spektrum alındı. Proteinleri sıcaklıkla denatüre ettikten sonra YZRS spektrumu alınmasının iki sebebi vardır. Birincisi, denatürasyon sırasında açığa çıkan elektronca zengin halkalı grupların Raman aktivitelerinin iyi olması, ikincisi ise sıcaklıkla YZRS aktivitesinin artmasıdır. Bir önceki bölümde protein karışımları içerisinde zıt yüklü proteinler bulunduğunda protein karışımlarının ayrılmayacağından bahsedilmişti. Protein karışımlarını ayırabilmek için bu çalışmada sıcaklık bir değişken olarak kullanıldı. Yukarıda bahsedildiği gibi her bir proteinin denatüsyan sıcaklığı farklıdır ve bu sıcaklıkta YZRS spektrumunda değişiklik beklenmektedir veya farklı sıcaklıklarda farklı spektrumlar beklenmektedir. Şekil 4.32'de iletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-sitokrom c, AgNP-Hb ve AgNP-avidin yüzeylerin orta kısmından alınan farklı sıcaklıklardaki YZRS spektrumları görülmektedir. Proteinlerin son derişimleri 50 µg/mL'dir. Proteinlerin farklı sıcaklıklardaki YZRS spektrumuna bakıldığı zaman, her bir sıcaklıkta farklı bir YZRS spektrumu görülmektedir. Bunun nedeni sıcaklıkla proteinlerin üçüncül yapısını belirleyen zayıf etkileşimlerle oluşan bağların kırılmasıdır. Bağlar kırıldıkça AgNPler ile etkileşime giren amino asitler değişecek dolayısıyla farklı sıcaklıklarda farklı spektrumlar elde edilecektir. Elde edilen proteinlerin YZRS spektrumlarının hangi sıcaklıktaki en farklı olduğunu belirlemek için elde edilen spektrumların verilerini optimize ettikten sonra SPSS yazılım programı ile çok boyutlu ölçeklendirme yapıldı. Şekil 4.33'te 3 boyutlu Euclidian uzaklık dağılımları görülmektedir.

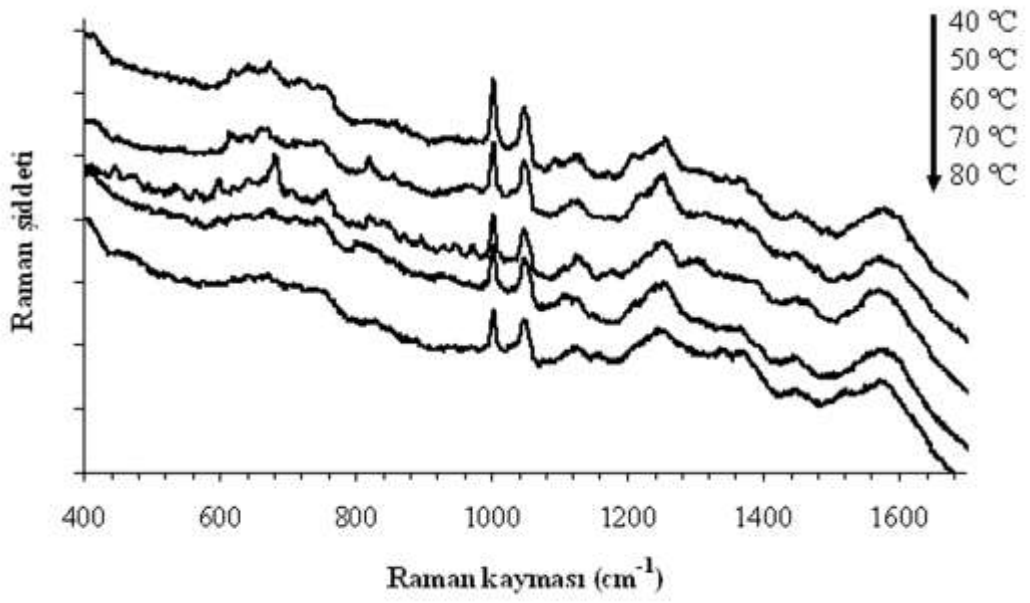


Şekil 4.32 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-sitokrom c, AgNP-Hb ve AgNP-avidin yapılardan farklı sıcaklıklarda alınan YZRS spektrumları.



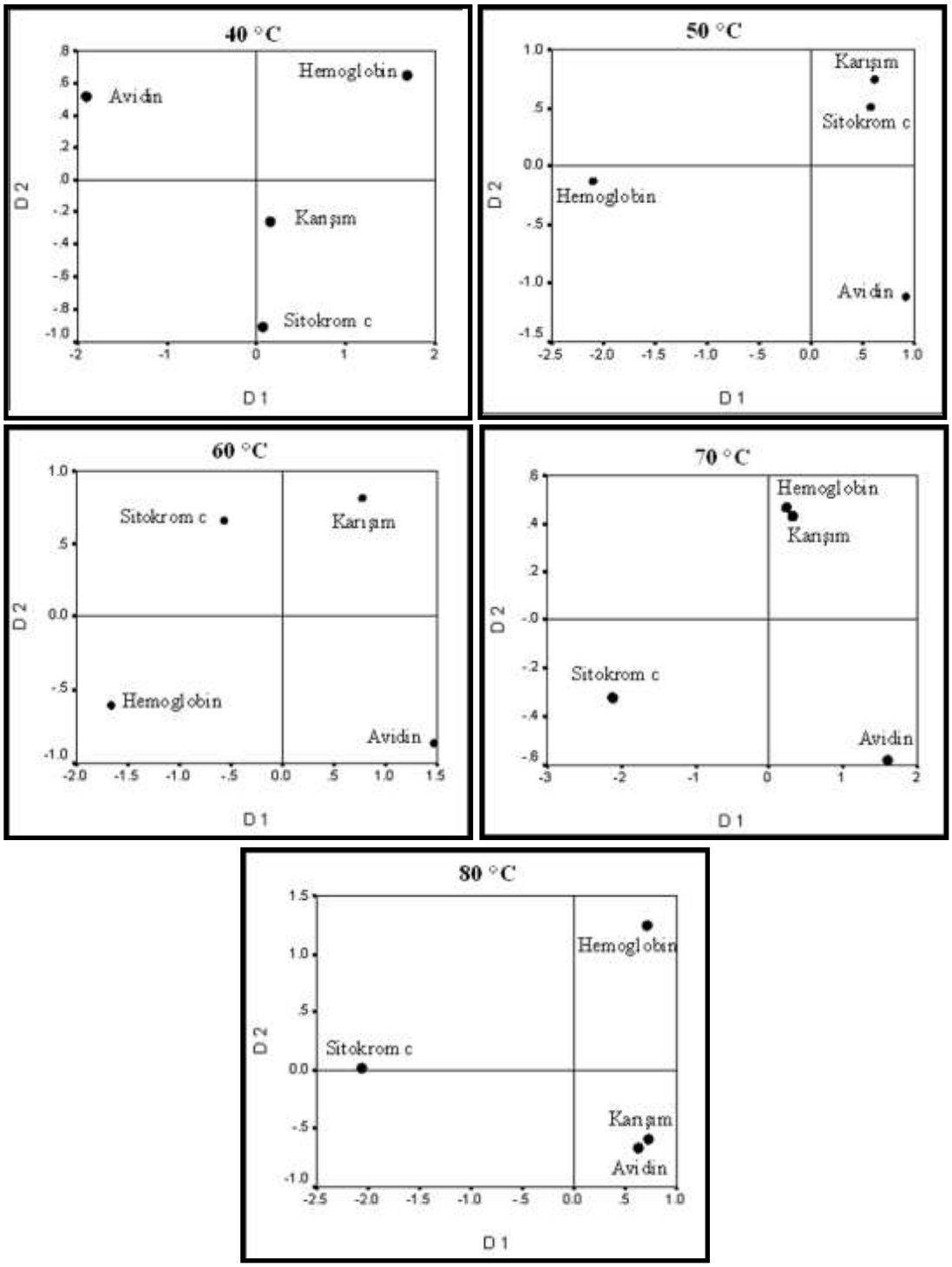
Şekil 4.33 : Proteinlerin farklı sıcaklıklardaki YZRS spektrumlarından üç boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği.

Dağılım grafiklerine bakıldığında YZRS spektrumunun en farklı olduğu sıcaklık grafikteki en uzak noktadır. Buna göre Avidin için 80, Hb için 70 ve sitokrom c için ise 50 °C'dir. Bunun anlamı en farklı YZRS spektrumuna bu sıcaklıkta elde edilmektedir. Bu üç proteinden ikisi pozitif (Avidin ve Sitokrom c) yüklü, değeri ise (Hb) negatif yüklüdür. Bu üç protein karıştırılıp iletim derleme yöntemi ile yüzey hazırlandığında içinde pozitif yüklü proteinler olduğu için ince film şeklinde yüzey oluşturdular. Hazırlanan karışımdaki proteinlerin YZRS spektrumu farklı sıcaklıklarda farklı spektrumlar verdiğinden, sıcaklıkla bu protein karışımlarının tayini araştırıldı. Hazırlanan yüzeyin orta kısmından farklı sıcaklıklarda alınan YZRS spektrumları Şekil 4.34'te görülmektedir.



Şekil 4.34 : Farklı sıcaklıklarda protein karışımı ile hazırlanan AgNP-protein yüzeyinden alınan YZRS spektrumları.

Şekilde görüldüğü gibi protein karışımı kullanılarak hazırlanan yüzeylerden farklı sıcaklıklarda alınan YZRS spektrumları farklıdır. Zıt yüklü protein karışımlarında sıcaklık bir değişken olarak kullanıldında, YZRS ile protein tayin edilebilirliğini test etmek için, belirli bir sıcaklıkta alınan tek protein spektrumlarının ve o sıcaklıktaki karışımın YZRS spektrumunun SPSS yazılım programı ile birbirine yakınlıklarını görmek için iki boyutlu ölçeklendirme yapıldı (Şekil 3.35). 40 °C'de karışımın spektrumu karışım içerisindeki proteinlerin spektrumu arasında görülmektedir. Yani her üç proteinin spektrumuna benzerliği aynı mesafededir. Karışımın spektrumu, tüm protein spektrumların toplamı gibidir. Sıcaklık 50 °C'ye gelince karışımın spektrumu sitokrom c proteinin YZRS spektrumuna benzemektedir. Yani, karışımında sitokrom c'nin spektrumu baskındır. Zaten sitokrom c'nin spektrumunun en farklı olduğu sıcaklık 50 °C'dir. Sıcaklık 60 °C'ye yüksektiğinde sitokrom c'nin spektrumu karışımdan uzaklaşmaya başlamaktadır. Bu sıcaklıkta karışımın proteininde sitokrom c etkisi hala görülmektedir. 70 °C'ye ulaşıldığında ise karışım spektrumuna en yakın protein spektrumu Hb'dir. Yani karışım spektrumunda hemoglobinin spektrumu bu sıcaklıkta baskındır. Daha önce bahsedildiği gibi en farklı YZRS spektrumu 70 °C'dir. Sıcaklık 80 °C'ye ulaştığında ise karışımın spektrumu avidin proteinin spektrumun baskın olduğu görülmektedir.



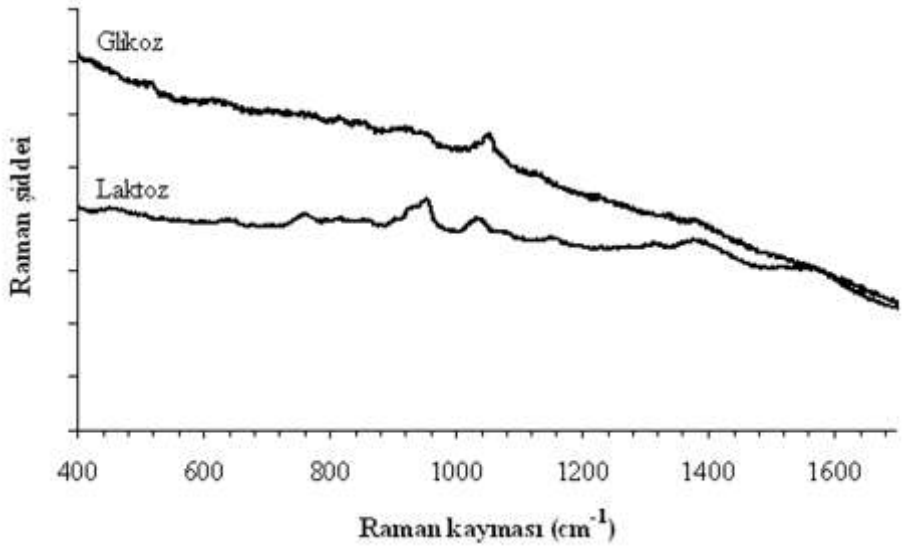
Şekil 4.35 : Farklı sıcaklıklarda alınan karışım ve karışım içerisindeki proteinlerden alınan YRZS spektrumları ile elde edilen iki boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği.

Sıcaklık bir değişken olarak kullanıldığında, zıt yüklü protein karışımının tayininde sıcaklığın proteinlerin erime noktası ile doğrudan ilişkili olmadığı görülmektedir. Örneğin Hb proteinin erime noktası 40 °C'dir. Buna bağlı olarak spektrum farklılaşması bu sıcaklıkta beklenmektedir. Ancak yapılan deneyde bu sıcaklığın 70

°C'olduğu görülmektedir. Ayrıca daha yüksek sıcaklıklarda (70°C) beklenenen sitokrom c proteininden ise 50 °C'de en farklı YZRS spektrumu elde edilmektedir. Tam bir ilişki olmasa da sıcaklık ile iletim derleme yöntemi ile ayrılamayan zıt yüklü protein karışımlarının sıcaklık etkisiyle ayrılabileceği ve YZRS ile tayin edilebileceği gözlemlendi.

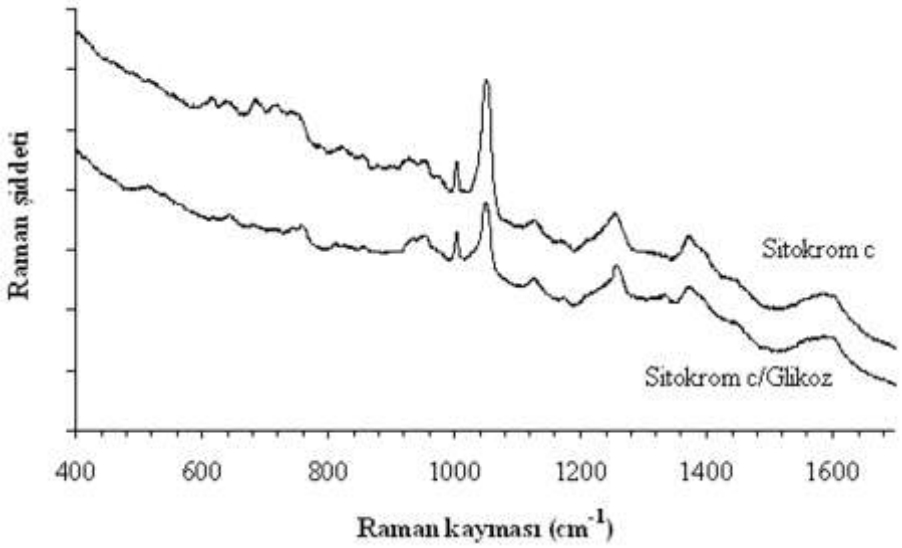
4.5 Biyolojik Moleküller Varlığında Protein Karışımlarının Tayini

Proteinlerin diğer biyolojik molekülller varlığında, iletim derleme ile hazırlanan yüzeylerde davranışlarını incelemek için karbonhidrat molekülleri tercih edildi. Bilindiği üzere dört çeşit biyomakromolekül vardır. Bunlar DNA, karbonhidratlar, lipitler ve proteinlerdir. Diğer biyomoleküllerde proteinlerin YZRS spektrumuna etkileri ve biyolojik moleküller varlığında YZRS spektrumundaki değişmeler inceleceğinden, kullanılacak molekülün YZRS aktivitesinin düşük olması gerekmektedir. DNA molekülüne baktığımızda adenin pikinden dolayı çok şiddetli 730 cm^{-1} dalga sayısında pik vermektedir. Yani DNA piki protein pikleriyle örtüşebilir ve proteinin tayinini engelleyebilir. Lipit moleküllerine baktığımızda ise suda çözünmemelerinden dolayı YRZS deneyleri iyi sonuç vermemektedir. Bu nedenle en iyi molekül olarak karbonhidrat molekülleri seçildi. Hem YZRS aktivitere düşük, hem de sulu ortamlarda kolayca çözünebilmektedir. Karbonhidrat olarak glikoz ve laktoz molekülleri seçildi. Öncelikle karbonhidrat moleküllerin (1mM) YZRS spektrumları alındı (Şekil 4.36).



Şekil 4.36 : Glikoz ve laktoz moleküllerinden alınan YZRS spektrumları.

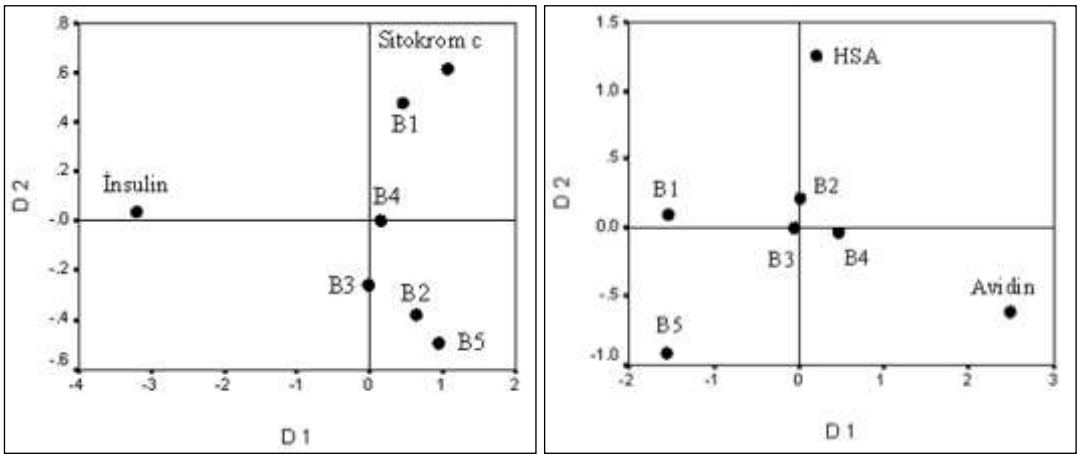
YZRS spektrumlarına bakıldığında glikoz moleküllerinden YZRS spektrumu neredeyse elde edilemezken, laktoz moleküllerinden oldukça zengin YZRS spektrumu gelmektedir. Bu nedenle YZRS aktivitesi düşük olan glikoz moleküller varlığında proteinlerin süspansiyon içerisindeki davranışları dolayısıyla protein karışımlarının tayininde kullanabilirliğini araştırmak için süspansiyon içerisinde, 1 mM glikoz molekülleri ve protein derişimi 50 µg/mL olacak şekilde AgNP-protein-Karbonhidrat karışımı hazırlanarak iletim-derleme yöntemi ile yüzeyler hazırlandı. Glikoz moleküllerinin proteinlerin YZRS spektrumuna etkisini görmek için, tek protein kullanılarak hazırlanan yüzeylerden ve glikoz molekülleri varlığında hazırlanan yüzeylerden, YZRS spektrumlar alındı (Şekil 4.37). Şekilde sitokrom c proteinin glikoz varlığındaki ve yokluğundaki spektrumlarına bakıldığında herhangi bir spektrum değişikliği olmadığı kolaylıkla görülmektedir.



Şekil 4.37 : İletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-sitokrom c ve AgNP-sitokrom c-glikoz yüzeylerden alınan YZRS spektrumları.

Pozitif yüklü proteinler varlığında protein karışımlarının iletim derleme yöntemi ile ayrılmasını ve YZRS ile tayin edilebilirliğini araştırmak için ikili protein karışımları hazırlandı. Avidin-HSA ve sitokrom c-insulin protein karışımları hazırlanırken süspansiyon içerisinde 1 mM glikoz molekülleri olacak şekilde glikoz ilave edildi. Bu üçlü karışım (AgNP-proteinler-glikoz) iletim derleme yöntemi kullanılarak cam lam yüzeyine biriktirildi. Yukarıda bahsedildiği gibi yine oluşan yüzey 5 eşit bölgeye bölündü. Bölünen herbir bölgeden 5 farklı spektrum alındı. Bu alınan spektrumların ortalaması kullanılarak SPSS yazılım programı ile protein karışımlarının tayin

edilebilirliği araştırıldı. Şekil 4.38'de avidin-HSA ve sitokrom c-insulin proteinleri kullanılarak hazırlanan protein karışımlarından elde edilen iki boyutlu Euclidian uzaklık dağılımları görülmektedir. Şekilde görüldüğü gibi ortamda glikoz moleküllerinin bulunması pozitif protein içeren bir proteinlerin karışımının oluşan yüzey içeresinde ayrılmasına katkıda bulunmamaktadır. Protein bölgelerinden alınan spektrumların dağılımları rastgeledir.



Şekil 4.38 : AgNP-avidin-HSA-glikoz ve AgNP-insulin-sitkrom c-glikoz karışımları kullanılarak hazırlanan yüzeylerin farklı bölgelerinden alınan YZRS spektrumları ile elde edilen iki boyutlu Euclidian uzaklık yöntemi kullanılarak oluşturulan dağılım grafiği.

4.6 Tartışma

Proteinlerin tanı ve tayini hem klinik hem de endüstriyel uygulamalar için çok büyük önem arz ettiginden, hızlı, ucuz ve çoklu analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önemlidir. Bu tezde YZRS'ye dayalı proteinlerin tayini için farklı yöntemler geliştirmeye çalışıldı. Proteinlerin YZRS çalışmalarında pek çok sıkıntı yaşanmaktadır. Proteinlerin yüklü olması, elektronca zengin (iyi Raman saçıcı) halkalı grupların iç kısımda yer alması, YZRS deneylerinde spektrumun zenginliğini ve tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. YZRS deneylerinde kolloidal sistemler yaygın bir şekilde YZRS substratı olarak kullanılmaktadır. Kolloidal NPler sentezlendiği yönteme göre farklı yüklere sahip olduklarından bu yüke bağlı olarak analit ile etkileşim farklıdır. Bu da YZRS aktivitesini etkilemektedir

Bu çalışmada YZRS substratı olarak AgNPler kullanıldı. Basit karıştırma yöntemi ile protein tayin ederken kullanılan NP ve protein yüküne dikkat edildi ve zıt yüklü olacak şekilde NPler kullanıldı. Ancak pozitif yüklü parçacıklar kullanıldığında YZRS spektrumlar elde edilemedi. Negatif yüklü parçacık kullanıldığında ise sadace

pozitif yüklü proteinlerden YZRS spektrum elde edildi. Fakat tekrarlanabilirlik ve tayin sınırı bu yöntemin sorunlarıdır. Tekrarlanabilirlik rastgele oluşan yığıntılar nedeniyle düşüktür. Tayin sınırı ise literatürde rapor edilenden daha yüksektir. Bu sorunlardan dolayı basit karıştırma yöntemi proteinlerin tayini için kullanılabilirliği oldukça düşüktür.

YZRS'yi etkileyen parametreler teorik bilgi bölümünde bahsedilmişti. Bu parametreler dikkate alınarak bir örnek hazırlama yöntemi geliştirildiğinde proteinlerin tayini için kullanılabilecektir. YZRS parametrelerini dikkate aldığımızda iletim derleme yöntemi ile örneklerimizi hazırladığımızda YZRS'ye dayalı proteinlerin tayini yapılabilir. İletim derleme yönteminde kolloidal süspansiyon ile protein molekülleri karıştırılarak bir cam yüzeye biriktirildi ve oluşan yüzey üzerinden YZRS spekrumları alındı. YZRS spekrumlarına bakıldığında oluşan yüzeyin homojen olmasından dolayı tekrarlanabilirligin makul seviyede olduğu görüldü. Oluşan yüzeyde proteinlerin yükü ve derişimine bağlı olarak farklı yapılar oluştu. Pozitif yüklü proteinler yüksek derişimlerde ince film şeklinde iken düşük derişimli şeritler şeklinde yüzeyler oluşturdular. Negatif yüklü proteinler ise tüm derişimlerde şeritler şeklinde yüzeyler oluşturdular. Ayrıca oluşan yüzeyin yüzey pürüzlükleri proteinlerin büyüklüğüne ve derişimine bağlı olarak da değişmektedir. Bu yöntem için (iletim derleme) YZRS parametrelerini ele aldığımızda, AgNPler kullanılarak daha yüksek zenginleşme faktörü elde edildi. Parçacıklar arası mesafeye baktığımızda paketlenme bu yöntem sayesinde sıkı olduğu için parçacıklar arası mesafe olabildiğince küçüktü. Sadece proteinler parçacıklar arasına paketlendigi için parçacıklar arasındaki mesafe nm mertebesindedir. Bu da istenen bir olaydır. Çünkü parçacıklar arasındaki mesafe ne kadar küçükse zenginleştirme faktörü o kadar büyüktür. Zenginleştirme faktörünün büyüklüğü tayin sınırının düşük olması demektir. Zaten elde edilen sonuçlarda tayin sınırı proteinin yüküne ve büyüklüğüne bağlı olmaksızın 0,5 μg/mL'dir. Bu derişim litaratürde rapor edilen proteinlerden tayin sınırının bazılarından 10 kat, bazılarından ise 100 kat daha düşüktür. Lazer dalga boyunu ele aldığında ise oluşan yüzeylerde parçacıklar arası mesafe küçük olduğundan ve parçacıkların bir araya gelmesinden dolayı yüzey plazmonlarının absorpsion dalga boyu uzuna kaymaktadır, dolayısıyla 830 nm dalga boylu lazer kullanılarak yüzey plazmon rezonansı uyarıldı. Diğer bir parametre olan nanoparçacık veya analit yükünü ele aldığımızda, iletim derleme yönteminde parçacıklarla proteinler paketlenmeye zorlandığından nanoparçacık ve protein

etkileşemi, proteinin yüküne bağlı olmaksızın, söz konusudur. Bu etkileşim zaten YZRS deneyleri için şarttır, çünkü NP yüzeyine bir molekülün 1-4 nm aralığında yakın olmalıdır ki yüzey plazmonu moleküllerin elektronlarını polarize edebilsin. İletim derleme yöntemi ile de yüke bağlı olunan YZRS parametresi elimine edildi. NP büyüklüğünü ele aldığımızda bu çalışmada yaklaşık 60 nm büyüklüğünde yuvarlak AgNPs kullanıldı. Bu büyüklük YZRS deneyleri için optimumdur. Farklı şekillerde nanoparçacıklar hazırlanarak YZRS aktiviteleri test edilebilirdi, ancak nanoparçacıkların hazırlanması zor ve uzun işlemler gerektirdiğinden hazırlanması basit, ucuz ve hızlı olan yuvarlak AgNPler kullanıldı. YZRS aktivitesini etkileyen diğer bir parametre olan yığıntı özelliklerinin ele aldığımızda cam yüzey üzerine düzenli yığıntılar oluşturduğu için hem YZRS aktiviteleri yüksek hem de spektrumların tekrarlanabilirliği bu amaç için yeterince uygundur.

Protein karışımlarını tek bir basamakta ayırıp ve tayin etmek çok zor bir işlemdir. Bu çalışmada protein karışımları iletim derleme yöntemi ile ayırmaya ve YZRS ile tayin edilmeye çalışıldı. Bu amaç için negatif, pozitif ve zıt yüklü protein karışımları kullanıldı. Öncelikle negatif yüklü protein karışımlarından iletim derleme yöntemi ile yüzeyler hazırlandı ve bu yüzeylerin farklı bölgelerinden YZRS spekrumları alındı. Sonuçlara bakıldığında ilk bölgelerde büyük proteinlerin YZRS spekrumları baskın iken sona doğru küçük proteinlerin YZRS spekrumları baskın olduğu gözlemlendi. Bu da iletim derleme yöntemi ile karışım yüzeye birikirken büyük parçacıkların daha önce birikmesinden kaynaklanmaktadır. Pozitif yüklü protein karışımlarında ise küçük olan proteinler daha önce yüzeye birikirken büyük proteinler daha sonra birikmektedir ve dolayısıyla ilk bölgelerde küçük pozitif yüklü proteinlerin spekrumları baskın iken, yüzeyin sonlarına doğru büyük proteinlerin YZRS spekrumları baskındır. Çünkü küçük proteinlerin mol sayısı daha fazladır dolayısıyla pozitif yük oranı daha yüksektir. Kullanılan parçacıklar negatif olduğu için pozitif yükü fazla olan proteinler NPler daha fazla etkileşerek yüzeye daha önce birikmesine neden olmaktadır. Hem negatif hem de pozitif yüklü proteinler içeren bir karışımı iletim derleme yöntemi ile ayrılması ve YZRS ile tayin edilebilirligi araştırıldığında olumlu sonuçlar elde edilemedi.. Çünkü pozitif yüklü proteinler hem negatif yüklü proteinlerle hem de negatif yüklü AgNPler ile elektrostatik etkileşime girdiklerinden dolayı çok karmaşık bir sistem meydana gelmekmedir. Dolayısıyla iletim derleme yöntemi ile karışım yüzeye birikirken herhangi bir ayrım söz konusu degildir.

Farklı yüklü proteinler içeren karışımları tayin edebilmek için sıcaklık bir değişken olarak kullanıldı. Protein karışımları kullanılarak hazırlanan yüzeylerin orta kısmında farklı sıcaklıklarda YZRS spektrumu alındı. Alınan spektrumlar incelendiğinde, her proteinin farklı sıcaklıklarda farklı spektrumlar verdiği gözlemlendi. Ancak sonuçlardan beklenen denatürasyon sıcaklığı ile YZRS spektrumundan elde edilen en farklı spektrumun aynı sıcaklıkta olmasıydı. Fakat denatürasyon sıcaklığına bağlı olmaksızın en farklı spektrumlar her bir protein için farklı sıcaklıklarda elde edildi. Deneyler sonucunda protein karışımlarında en farklı olduğu sıcaklıkta hangi protein varsa onun spektrumu karışımın spektrumuna daha yakın olduğu gözlendi. Buna bağlı olarak sıcaklığın zıt yüklü protein karışımlarının tayinde kullanabileceği gösterildi.

Son olarak biyolojik moleküller varlığında zıt yüklü protein karışımlarının iletim derleme yöntemi ile ayrılması ve YZRS ile tayini araştırıldı. Bunun için YZRS aktivitesi oldukça düşük olan glikoz molekülü seçildi. 1 mM glikoz molekülü içerecek şekilde protein karışımları hazırlandı ve yüzeye biriktirildi. Yüzeye biriktirilen bu karışımlardan YZRS spektrumu alınarak incelendiğinde glikoz molekülü varlığının protein karışımlarının ayrılmasında her hangi bir rol oynamadığı gözlemlendi.

Bu çalışmada, yapılan tüm deneylerde proteinlerin ve protein karışımlarının tayini için yeni bir yöntem geliştirilmeye çalışıldı. Protein tayininde kullanılacak yöntemde tekrarlanabilirliğin yüksek ve tayin sınırının düşük olması en önemli parametrelerdir. Bu parametrelere en uygun yöntem, iletim derleme yöntemi ile hazırlanan AgNP-protein yüzeylerinden YZRS spektrumlarının elde edildiği yöntemdir. Protein tayini için en uygun yöntem geliştirildikten sonra protein karışımlarını tek bir basamakta ayırıp tayin edilebilmesi için yine iletim derleme yöntemi kullanıldı. Bu yöntemde aynı yüke sahip olan protein molekülleri iletim derleme yöntemi ile ayrıldı ve YZRS spektrumu ile tayin edildi, ancak bu yöntemde zıt yüklü protein karışımları tayin edilemedi. Zıt yüklü proteinler için sıcaklık bir değişken olarak kullanıldı ve sıcaklığa bağlı olarak YZRS spekrumları ile protein karışımları tayin edildi. Son olarak biyolojik moleküllerin varlığı, protein karışımlarının ayrılmasında ve tayininde hiçbir katkıda bulunmadığı görüldü.

Gelecekte planlanan çalışma ise gerçek bir biyolojik örnekte (Kan, tükrük) bu yöntemlerin kullanılabilirliği araştırılmasıdır.

KAYNAKLAR

[1] **Han, X. X., Zhao, B., and Ozaki, Y.,** 2009. Surface-enhanced Raman scattering for protein detection, *Anal. Bioanal. Chem.,* **394,** 1719-1727.

[2] **Westermeier, R., and Naven, T.,** 2002. *Proteomics in practice: a laboratory manual of proteome analysis,* Wiley-VCH, Weinheim.

[3] **Moskovits, M.,** 1985. Surface-Enhanced Spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.,* **57,** 783-826.

[4] **Itoh, T., Hashimoto, K., and Ozaki, Y.,** 2003. Polarization dependences of surface plasmon bands and surface-enhanced Raman bands of single Ag nanoparticles, *Appl. Phys. Lett.,* **83,** 2274-2276.

[5] **Nabiev, I. R., and Chumanov, G. D.,** 1986. Surface-enhanced Raman spectroscopy of biopolymers: water-soluble proteins, amino acids and dipeptides adsorbed on silver electrodes and hydrosols, *Biofizika,* **31,** 183-190.

[6] **Nabiev, I. R. Savchenko, V. A., and Efemov, E. S.,** 1983. Surface-enhanced Raman spectra of aromatic amino acids and proteins adsorbed by silver hydrosols, *J. Raman Spectrosc.,* **14,** 375-379.

[7] **Kim, S. K., Kim, M. S., and Suh, S. W.,** 1987. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of aromatic amino acids and their glycyl dipeptides in Ag sol, *J. Raman Spectrosc.,* **18,** 171-175.

[8] **Lee, H. I., Kim, M. S., and Suh, S. W.,** 1988. Raman Spectroscopy of L-phenylalanine, L-Tyrosine, and their Peptides Adsorbed on Silver Surface, *B. Kor. Chem. Soc.* **9,** 218-223

[9] **Smulevich, G., and Spiro, T. G.,** 1985. Surface Enhanced Raman Spectroscopic Evidence That Adsorption on Silver Particles Can Denature Heme Proteins, *J. Phys. Chem.,* **89,** 5168-5173.

[10] **Mahajan, S., Richardson, J., Brown, T., and Bartlett, P. N.,** 2008. SERS-Melting: A New Method for Discriminating Mutations in DNA Sequences, *Journal of The American Chemical Society,* **130,** 15589-15601.

[11] **Kneipp, K., Wang, Y., Dasari, R. R., and Feld , M. S.,** 1995. An approach to single molecule detection using surface-enhanced resonance Raman scattering (SERS) : a study using rhodamine 6G, *Applied Spectroscopy,* **49,** 780-784.

[12] **Kneipp, K., Wang, Y., Kneipp, H., Perelman, L. T., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M.S.,** 1997. Single Molecule Detection using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Phys. Rev. Letters,* **78,** 1667-1670.

[13] **Graham, D., and Goodacre, R.** 2008. Chemical and bioanalytical applications of surface enhanced Raman scattering spectroscopy, *Chem. Soc. Rev.*, **37,** 883-884.

[14] **Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H. Y., Driskell, J., and Porter, M. D.,** 2003. Femtomolar detection of prostate-specific antigen: An immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels, *Anal. Chem.,* **75,** 5936-5943.

[15] **Park, H. Y.,** 2005. *Chip-scale Bioassays Based on Surface-enhanced Raman Scattering: Fundamentals and Applications,* PhD Thesis, Iowa State University, Ames.

[16] **Keating, C. D., Kovaleski, K. M., and Natan, M. J.,** 1998. Protein:Colloid Conjugates for Surface Enhanced Raman Scattering: Stability and Control of Protein Orientation, *J. Phys. Chem. B,* **102,** 9404-9413.

[17] **Pavel, I., McCarney, E., Elkhaled, A., Morrill, A., Plaxco, K., and Moskovits, M.,** 2008. Label-Free SERS Detection of Small Proteins Modified to Act as Bifunctional Linkers, *J. Phys. Chem. C,* **112,** 4880-4883.

[18] **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, *Anal. Chem.,* **81,** 3329-3333.

[19] **Han, X. X., Jia, H. Y., Wang, Y. F., Lu, Z. C., Wang, C. X., Xu, W. Q., Zhao, B., Ozaki, Y.,** 2008. Analytical Technique for Label-Free Multi-protein Detection Based on Western Blot and Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.,* **80,** 2799-2804.

[20] **Holme, D. J., and Peck, H.,** 1998. *Analytical Biochemistry*(3rd ed.), Printice Hall, Essex, Englang.

[21] **Kılıç, E., Köseoğlu, F., and Yılmaz, H.,** 1998. *Enstrümantal Analiz İlkeleri,* Bilim Yayıncılık, Ankara.

[22] **Ferraro, J.R., and Nakamoto, K.,** 1994. *Introductory Raman Spectroscopy,* Acedemic Press, New York.

[23] **Sur U. K.,** 2010. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Recent Advancement of Raman Spectroscopy, *Resonance*, 154-164.

[24] **Strommen D. P., and Nakamoto, K.,** 1981. *Amer. Lab.*, **43,** 72.

[25] *Applications Raman spectroscopy,* Renishaw Instruments, Application Notes.

[26] *Raman Spectroscopy Basics,* Princeton Instruments, Application Notes.

[27] **Yıldız, S., Yılmaz, H., and Kılıç E.,** 2001. *Fizikokimya* (Birinci Baskı), Bilim Yayıncılık, Ankara.

[28] **Chase, B.,** 1987. Fourier-Transform Raman-Spectroscopy, *Anal. Chem.,* **59,** 888A.

[29] **Newman, C. D., Bret, G. C., and McCreery, R. L.,** 1992. Fiberoptic Sampling Combined With An Imaging Spectrograph For Routine Raman-Spectroscopy, *Appl. Spectros.*, **46,** 262-265.

[30] **Stewart, M. E., Anderton, C. R., Thompson, L. B., Maria, J., Gray, S. K., Rogers J. A., and Nuzzo, R. G.,** 2008. Nanostructured Plasmonic Sensors, *Chem. Rev.* **108,** 494-521.

[31] **Atwater, H. A.,** 2007. The promise of plasmonics, *Scientific American,* **296,** 56-63.

[32] **Ozbay, E.,** 2006. Plasmonics: Merging photonics and electronics at nanoscale dimensions, *Science,* **311,** 189-193.

[33] **Maier, S. A., and Atwater, H. A.,** 2005. Plasmonics: Localization and guiding of electromagnetic energy in metal/dielectric structures, *J. Appl. Phys.,* **98,** Article Number: 011101.

[34] **Van Duyne, R. P.,** 2004. Molecular Plasmonics, *Science,* **306,** 985-986.

[35] **Barnes, W.L., Dereux, A., and Ebbesen, T.W.,** 2003. Surface plasmon subwavelength optics, *Nature,* **424,** 824-830.

[36] **Haynes, C. L., McFarland, A. D., Zhao, L., Van Duyne, R. P., Schatz, G. C. Gunnarsson, L., Prikulis, J., Kasemo, B., and Käll, M.,** 2003. Nanoparticle optics: The importance of radiative dipole coupling in two-dimensional nanoparticle arrays, **J. Phys. Chem. B, 107,** 7337-7342.

[37] **Maier, S. A., Kik, P. G., Atwater, H. A., Meltzer, S., Harel, E., Koel, B. E., and Requicha, A. A. G.,** 2003. Local detection of electromagnetic energy transport below the diffraction limit in metal nanoparticle plasmon waveguides, *Nature Mater.,* **2,** 229-232.

[38] **Lezec, H. J., Degiron, A., Devaux, E., Linke, R. A., Martin-Moreno, L., Garcia-Vidal, F. J., and Ebbesen, T. W.,** 2002. Beaming light from a subwavelength aperture, *Science,* **297,** 820-822.

[39] **Pettinger, B., Ren, B., Picardi, G., Schuster, R., and Ertl, G.,** 2004. Nanoscale probing of adsorbed species by tip-enhanced Raman spectroscopy, *Phys. Rev. Lett.,* **92,** Article Number: 096101.

[40] **Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P.,** 2002. *Handbook of Vibrational Spectroscopy,* Wiley, New York, MA, Vol. 1, p. 759.

[41] **Haes A. J., and Van Duyne, R. P.,** 2004. A unified view of propagating and localized surface plasmon resonance biosensors, *Anal. Bioanal. Chem.,* **379,** 920-930.

[42] **Brockman, J. M., Nelson, B. P., and Corn, R. M.,** 2000. Surface plasmon resonance imaging measurements of ultrathin organic films, *Ann. Rev. Phys. Chem.,* **51,** 41-63.

[43] **Srituravanich, W., Fang, N., Sun, C., Luo, Q., and Zhang, X.,** 2004. Plasmonic nanolithography, *Nano Lett.* **4,** 1085-1088.

[44] **Willets, K. A., and Van Duyne, R. P.,** 2007. Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing, *Annu. Rev. Phys. Chem.,* **58,** 267-297.

[45] **Haes, A. J., Haynes, C. L., McFarland, A. D., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P., and Zou, S.,** 2005. Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy, *MRS Bulletin,* **30,** 368-375.

[46] **Henzie, J., Lee, J., Lee, M. H., Hasan, W., and Odom, T. W.,** 2009. Nanofabrication of Plasmonic Structures, *Annu. Rev. Phys. Chem.,* **60,**147-65.

[47] **Lu, X., Rycenga, M. Skrabalak, S. E., Wiley, B., and Xia, Y.,** 2009. Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles, *Annu. Rev. Phys. Chem.,* **60,** 167-192.

[48] **Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2006. Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 7238-7248.

[49] **Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., and Schatz, G. C.,** 2003. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment, *J. Phys. Chem. B,* **107,** 668–677.

[50] **Hutter, E.and Fendler, J. H.,** 2004. Exploitation of localized surface plasmon resonance, *Adv. Mater.,* **16,** 1685-1706.

[51] **Ly, N., Foley, K., and Tao, N.,** 2007. Integrated label-free protein detection and separation in real time using confined surface plasmon resonance imaging, *Anal. Chem.,* **79,** 2546-2551.

[52] **Bohren, C. F., and Huffman, D. R.,** 1983. *Absorption and Scattering of Light by Small Particles,* Wiley, New York, MA.

[53] **Reinhard, B., Sheikholeslami, S., Mastroianni, A., Alivisatos, A. P., and Liphardt, J.,** 2007. Use of Plasmon Coupling to Reveal the Dynamics of DNA Bending and Cleavage by Single EcoRV Restriction Enzymes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **104,** 2667-2672.

[54] **Sönnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J., and Alivisatos, A. P.,** 2005. A Molecular Ruler Based on Plasmon Coupling of Single Gold and Silver Nanoparticles, *Nat. Biotechnol.,* **23,** 741-745.

[55] **Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L., and Mirkin, C. A.,** 1997. Selective Colorimetric Detection of Polynucleotides Based on the Distance-Dependent Optical Properties of Gold Nanoparticles, *Science,* **277,** 1078-1080.

[56] **Haes, A. J., and Van Duyne, R. P.,** 2002. A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.,* **124,** 10596-10604.

[57] **Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., and Richards- Kortum, R.,** 2003. Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles, *Cancer Res.,* **63,** 1999-2004.

[58] **El-Sayed, I. H., Huang, X., and El-Sayed, M. A.,** 2005. Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer, *Nano Lett.,* **5,** 829-834.

[59] **Alivisatos, A. P.,** 2004. The Use of Nanocrystals in Biological Detection. *Nat. Biotechnol.,* **22,** 47-52.

[60] **Rosi, N. L., and Mirkin, C. A.,** 2005. Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.,* **105,** 1547-1562.

[61] **Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., and West, J. L.,** 2003. Nanoshell-Assisted Tumor Ablation Using near Infrared Light under Magnetic Resonance Guidance, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.,* **100,** 13549-13554.

[62] **Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., and El-Sayed, M. A.,** 2006. Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods, *J. Am. Chem. Soc., 128,* 2115-2120.

[63] **El-Sayed, I. H., Huang, X., and El-Sayed, M. A.,** 2006. Selective Laser Photo-Thermal Therapy of Epithelial Carcinoma Using Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles, *Cancer Lett.,* **239,** 129-135.

[64] **O'Neal, D. P., Hirsch, L. R., Halas, N. J., Payne, J. D., and West, J. L.,** 2004. Photo-thermal Tumor Ablation in Mice Using near Infrared-Absorbing Nanoparticles, *Cancer Lett.,* **209,** 171-176.

[65] **Loo, C. A., Lowery, A., Halas, N., West, J., and Drezek, R.,** 2005. Immunotargeted Nanoshells for Integrated Cancer Imaging and Therapy, *Nano Lett.,* **5,** 709-711.

[66] **Jain, P. K., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2007. Au Nanoparticles Target Cance, *Nano Today,* **2,** 18-29.

[67] **Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2007. Gold Nanoparticles. Interesting Optical Properties and Recent Applications in Cancer Diagnostics and Therapy, *Nanomedicine,* **2,** 681-693.

[68] **Van De Hulst, H. C.,** 1981. *Light Scattering by Small Particles,* Dover, New York, MA. pp. 397-400.

[69] **Wax, A., and Sokolov, K.,** 2009. Molecular imaging and darkfield microspectroscopy of live cells using gold plasmonic nanoparticles, *Laser & Photon. Rev.,* **3,** 146-158.

[70] **Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2008. Noble Metals on the Nanoscale: Optical and Photothermal Properties and Some Applications in Imaging, Sensing, Biology, and Medicine, *Acc. Chem. Res.,* **41,** 1578-1586.

[71] **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,** 137-156.

[72] **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 - II. Experimental characterization, *Anal. Biochem.,* **262,** 157-176.

[73] **Reinhard, B. M., Sheikholeslami, S., Mastroianni, A., Alivisatos, A. P., and Liphardt, J.,** 2007. Use of Plasmon Coupling to Reveal the Dynamics of DNA Bending and Cleavage by Single EcoRV Restriction Enzymes, *PNAS,* **104,** 2667-2672.

[74] **Sherry, L. J., Chang, S.-H., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P., Wiley, B. J., and Younan, X.,** 2005. Localized surface plasmon resonance spectroscopy of single silver nanocubes, *Nano Lett.,* **5,** 2034-2038.

[75] **Loo, C., Hirsch, L., Lee, M. H., Chang, E., West, J., Halas, N., and Drezek, R.,** 2005. Gold nanoshell bioconjugates for molecular imaging in living cells, *Opt. Lett.,* **30,** 1012-1014.

[76] **Kreibig, U., and Vollmer, M.,** 1995. *Optical properties of metal clusters,* Springer, Berlin Heidelberg, New York.

[77] **Murphy, C. J., Gole, A. M., Stone, J. W., Sısco, P. N., Alkılany, A. M., Goldsmıth, E. C., Baxter, A. C.,** 2008. Gold Nanoparticles in Biology: Beyond Toxicity to Cellular Imaging, *Accounts Of Chemical Research,* **41,** 1721-1730.

[78] **Huang, X.,** 2006. *Gold Nanoparticles Used in Cancer Cell Diagnostics, Selective Photothermal Therapy and Catalysis of NADH Oxidation Reaction,* PhD Thesis, Georgia Institute of Technology, Atlanta, Georgia.

[79] **Link, S., and El-Sayed, M. A.,** 2000. Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals, *Int. Reviews Phys. Chem.,* **19,** 409-453.

[80] **Huang, X., Jain P. K., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2006. Determination of the minimum temperature required for selective photothermal destruction of cancer cells using immunotargeted gold nanoparticles, *Photochem. Photobiol.,* **82,** 412-417.

[81] **Huang, X., Jain, P. K., El-Sayed, I. H., and El-Sayed, M. A.,** 2008. Plasmonic photothermal therapy (PPTT) using gold nanoparticles, *Lasers Med. Sci.,* **23,** 217-228.

[82] **Loo, C. H., Lin, A., Hirsch, L. R., Lee, M. H., Barton, J., Halas, N. J., West, J., and Drezek, R. A.,** 2004. Nanoshell-enabled photonics-based imaging and therapy of cancer, *Tech. Cancer Res. Treat.* **3,** 33-40.

[83] **Elghanian, R., Storhoff, J. J., Mucic, R. C., Letsinger, R. L., and Mirkin, C. A.,** 1997. Selective colorimetric detection of polynucleotides based on the distance-dependent optical properties of gold nanoparticles, *Science,* **277,** 1078-1081.

[84] **Li, H., and Rothberg, L.,** 2004. Colorimetric detection of DNA sequences based on electrostatic interactions with unmodified gold nanoparticles, *PNAS,* **101,** 14036-14039.

[85] **Hone, D. C., Haines, A. H., and Russell, D. A.,** 2003. Rapid, Quantitative Colorimetric Detection of a Lectin Using Mannose-Stabilized Gold Nanoparticles, *Langmuir,* **19,** 7141-7144.

[86] **Schofield, C. L., Haines, A. H., Field, R. A., and Russell, D. A.,** 2006. Silver and Gold Glyconanoparticles for Colorimetric Bioassays, *Langmuir,* **22,** 6707-6711.

[87] **Kim, Y., Johnson, R. C., and Hupp, J. T.,** 2001. Gold Nanoparticle-Based Sensing of "Spectroscopically Silent" Heavy Metal Ions, *Nano Lett.,* **1,** 165-167.

[88] **Bozhevolnyi, S. I., Volkov, V. S., Devaux, E., Laluet, J. Y., and Ebbesen, T. W.,** 2006. Channel plasmon subwavelength waveguide components including interferometers and ring resonators, *Nature,* **440,** 508-511.

[89] **Yin, L., Vlasko-Vlasov, V. K., Pearson, J., Hiller, J. M., Hua, J., Welp, U. Brown, D. E., and Kimball, C. W.,** 2005. Subwavelength focusing and guiding of surface plasmons, *Nano Lett.,* **5,** 1399-1402.

[90] **Dionne, J. A., Lezec, H. J., and Atwater, H. A.,** 2006. Highly confined photon transport in subwavelength metallic slot waveguides, *Nano Lett.,* **6,** 1928-1932.

[91] **Satuby, Y., and Orenstein, M.** 2007. Surface-plasmon-polariton modes in deep metallic trenches- measurement and analysis, *Opt. Express, 15,* 4247-4252.

[92] **Weeber, J. C., Gonzalez, M. U., Baudrion, A. L., and Dereux, A.,** 2005. Surface plasmon routing along right angle bent metal strips, *Appl. Phys. Lett.,* **87,** Article Number: 221101

[93] **Bozhevolnyi, S. I., Volkov, V. S., Devaux, E., and Ebbesen, T. W.,** 2005. Channel plasmon-polariton guiding by subwavelength metal grooves, *Phys. Rev. Lett.,* **95,** Article Number: 046802.

[94] **Ko, S. H., Park, I., Pan, H., Grigoropoulos, C. P., Pisano, A. P., Luscombe, C. K., and Frechet, J. M. J.,** 2007. Direct nanoimprinting of metal nanoparticles for nanoscale electronics fabrication, *Nano Lett.,* **7,** 1869-1877.

[95] **Herderick, E. D., Tresback, J. S., Vasiliev, A. L., Padture, N. P.,** 2007. Template-directed synthesis, characterization and electrical properties of Au-TiO(2)-Au heterojunction nanowires, *Nanotechnology,* **18,** Article Number: 155204

[96] **Bluemel, A., Klug, A., Eder, S., Scherf, U., Moderegger, E., List, E. J. W.,** 2007. Micromolding in capillaries and microtransfer printing of silver nanoparticles as soft-lithographic approach for the fabrication of source/drain electrodes in organic field-effect transistors, *Org. Electron.,* **8,** 389-395.

[97] **Ko, S. H., Pan, H., Grigoropoulos, C. P., Luscombe, C. K., Frechet, J. M. J., and Poulikakos, D.,** 2007. Air stable high resolution organic transistors by selective laser sintering of ink-jet printed metal nanoparticles, *Appl. Phys. Lett.,* **90,** Article Number: 141103.

[98] **Brolo, A. G., Gordon, R., Leathem, B., and Kavanagh, K. L.,** 2004. Surface plasmon sensor based on the enhanced light transmission through arrays of nanoholes in gold films, *Langmuir,* **20,** 4813-4815.

[99] **Liu, J., and Lu, Y.** 2006. Fast Colorimetric Sensing of Adenosine and Cocaine Based on a General Sensor Design Involving Aptamers and Nanoparticle, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **45,** 90-94.

[100] **Lee, J. S., Han, M. S., and Mirkin, C. A.,** 2007. Colorimetric detection of mercuric ion (Hg2+) in aqueous media using DNA-functionalized gold nanoparticles, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **46,** 4093-4096.

[101] **Storhoff, J. J., Elghanian, R., Mucic, R. C., Mirkin, C. A., and Letsinger, R. L.,** 1998. One-pot colorimetric differentiation of polynucleotides with single base imperfections using gold nanoparticle probes, *J. Am. Chem. Soc.,* **120,** 1959-1964.

[102] **Gao, D., Chen, W., Mulchandani, A., and Schultz, J. S.,** 2007. Detection of tumor markers based on extinction spectra of visible light passing through gold nanoholes, *Appl. Phys. Lett.,* **90,** Article Number: 073901.

[103] **Haes, A. J., Chang, L., Klein, W. L., and Van Duyne, R. P.,** 2005. Detection of a biomarker for Alzheimer's disease from synthetic and clinical samples using a nanoscale optical biosensor, *J. Am. Chem. Soc.,* **127,** 2264-2271.

[104] **Chen, J. Wang, D., Xi, J., Au, L., Siekkinen, A., Warsen, A., Li, Z. Y., Zhang, H., Xia, Y., and Li, X.,** 2007. Immuno Gold Nanocages with Tailored Optical Properties for Targeted Photothermal Destruction of Cancer Cells, *Nano Lett.,* **7,** 1318-1322.

[105] **Durr, N. J., Larson, T., Smith, D. K., Korgel, B. A., Sokolov, K., and Ben-Yakar, A.,** 2007. Two-photon luminescence imaging of cancer cells using molecularly targeted gold nanorods, *Nano Lett.,* **7,** 941-945.

[106] **Lee, K.-S., and El-Sayed, M. A.,** 2006. Gold and silver nanoparticles in sensing and imaging: Sensitivity of plasmon response to size, shape, and metal composition, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 19220-19225.

[107] **Chen, H. M., Hsin, C. F., Liu, R. S., Lee, J. F., and Jang, L. Y.,** 2007. Synthesis and characterization of multi-pod-shaped gold/silver nanostructures, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 5909-5914.

[108] **Lu, L., Kobayashi, A., Tawa, K., and Ozaki, Y.,** 2006. Silver nanoplates with special shapes: Controlled synthesis and their surface plasmon resonance and surface-enhanced Raman scattering properties, *Chem. Mater.,* **18,** 4894-4901.

[109] **Murphy, C. J. Sau, T. K., Gole, A., and Orendorff, C. J.,** 2005. Surfactant-directed synthesis and optical properties of one-dimensional plasmonic metallic nanostructures, *MRS Bull.,* **30,** 349-355.

[110] **Wiley, B.J, Im, S. H., Li, Z. Y., McLellan, J., Siekkinen, A., and Xia, Y.,** 2006. Maneuvering the surface plasmon resonance of silver nanostructures through shape-controlled synthesis, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 15666-15675.

[111] **Murphy, C. J., Sau, T. K., Gole, A. M., Orendorff, C. J., Gao, J., Gou, L., Hunyadi, S. E., and Li, T.,** 2005. Anisotropic metal nanoparticles: Synthesis, assembly, and optical applications, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 13857-13870.

[112] **Wiley, B., Sun, Y., Mayers, B., Xia, Y.,** 2005. Shape-controlled synthesis of metal nanostructures: The case of silver, *Chem. Eur. J.,* **11,** 454-463.

[113] **Xiong, Y., Cai, H., Wiley, B. J., Wang, J., Kim, M. J., and Xia, Y.,** 2007. Synthesis and mechanistic study of palladium nanobars and nanorods, *J. Am. Chem. Soc.,* **129,** 3665-3675.

[114] **Nehl, C. L., Liao, H., and Hafner, J. H.,** 2006. Optical properties of star-shaped gold nanoparticles, *Nano Lett.,* **6,** 683-688.

[115] **Evanoff, D. D., and Chumanov, G.,** 2004. Size-controlled synthesis of nanoparticles. 1. "Silver-only" aqueous suspensions via hydrogen reduction, *J. Phys. Chem. B,* **108,** 13948-13956.

[116] **Stewart, M. E., Motala, M. J., Yao, J. T., L. B., and Nuzzo, R. G.,** 2007. Unconventional methods for forming nanopatterns, *Proc. ImechE, Part N: J. Nanoeng. Nanosyst.* **220,** 81-138.

[117] **Gunnarsson, L., Rindzevicius, T., Prikulis, J., Kasemo, B., Kall, M., Zou, S., and Schatz, G. C.,** 2005. Confined plasmons in nanofabricated single silver particle pairs: Experimental observations of strong interparticle interactions, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 1079-1087.

[118] **Su, K. H., Wei, Q. H., Zhang, X., Mock, J. J., Smith, D. R., and Schultz, S.,** 2003. Interparticle coupling effects on plasmon resonances of nanogold particles, *Nano Lett.,* **3,** 1087-1090.

[119] **Rechberger, W., Hohenau, A., Leitner, A., Krenn, J. R., Lamprecht, B., and Aussenegg, F. R.,** 2003. Optical properties of two interacting gold nanoparticles, *Opt. Commun.,* **220,** 137-141.

[120] **Grand, J., Adam, P. M., Grimault, A. S., Vial, A., de la Chapelle, M. L., Bijeon, J. L., Kostcheev, S., and Royer, P.,** 2006. Optical extinction Spectroscopy of oblate, prolate and ellipsoid shaped gold nanoparticles: Experiments and theory, *Plasmonics,* **1,** 135-140.

[121] **Whitesides, G. M., and Love, C. J.,** 2001. The art of building small - Researchers are discovering cheap, efficient ways to make structures only a few billionths of a meter across, *Sci. Am.,* **285,** 38-47.

[122] **Hanarp, P., Sutherland, D. S., Gold, J., and Kasemo, B.,** 2003. Control of nanoparticle film structure for colloidal lithography, *Colloids Surf., A,* **214,** 23-36.

[123] **Aizpurua, J., Hanarp, P., Sutherland, D. S., Kall, M., Bryant, G. W., and Garcia de Abajo, F. J.,** 2003. Optical properties of gold nanorings, *Phys. Rev. Lett.,* **90,** Article Number: 057401.

[124] **Haynes, C. L., and Van Duyne, R. P.,** 2001. Nanosphere lithography: A versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics, *J. Phys. Chem. B,* **105,** 5599-5611.

[125] **Hicks, E. M., Lyandres, O., Hall, W. P., Zou, S., Glucksberg, M. R., and Van Duyne, R. P.,** 2007. Plasmonic properties of anchored nanoparticles fabricated by reactive ion etching and nanosphere lithography, *J. Phys. Chem. B,* **111,** 4116-4124.

[126] **Haes, A. J., Zhao, J., Zou, S., Own, C. S., Marks, L. D., Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P.,** 2005. Solution-phase, triangular Ag nanotriangles fabricated by nanosphere lithography, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 11158-11162.

[127] **Hostetler, M. J., Wingate, J. E., Zhong, C. J., Harris, J. E., Vachet, R. W., Clark, M. R., Londono, J. D., Green, S. J., Stokes, J. J., Wignall, G. D., Glish, G. L., Porter, M. D., Evans, N. D., and Murray, R. W.,** 1998. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1.5 to 5.2 nm: Core and monolayer properties as a function of core size, *Langmuir,* **14,** 17-30.

[128] **Frens, G.,** 1973. Controlled Nucleation For Regulation Of Particle-Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nat. Phys. Sci.,* **241,** 20-22.

[129] **Pillai, Z. S., and Kamat, P. V.,** 2004. What factors control the size and shape of silver nanoparticles in the citrate ion reduction method? *J. Phys. Chem. B,* **108,** 945-951.

[130] **Jacob, J. A., Kapoor, S., Biswas, N., and Mukherjee, T.,** 2007. Size tunable synthesis of silver nanoparticles in water-ethylene glycol mixtures, *Colloids Surf., A,* **301,** 329-334.

[131] **He, P., and Zhu, X.,** 2007. Phospholipid-assisted synthesis of size-controlled gold nanoparticles, *Mater. Res. Bull.,* **42,** 1310-1315.

[132] **Sun, Y., Zhang, L., Zhou, H., Zhu, Y., Sutter, E., Ji, Y., Rafailovich, M. H., and Sokolov, J. C.,** 2007. Seedless and templateless synthesis of rectangular palladium nanoparticles, *Chem. Mater.,* **19,** 2065-2070.

[133] **Liz-Marzan, L. M.,** 2006. Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles, *Langmuir,* **22,** 32-41.

[134] **Mallin, M. P., and Murphy, C. J.,** 2002. Solution-phase synthesis of sub-10 nm Au-Ag alloy nanoparticles, *Nano Lett.,* **2,** 1235-1237.

[135] **Steinbruck, A., Csaki, A., Festag, G., and Fritzsche, W.,** 2006. Preparation and optical characterization of core–shell bi-metal nanoparticles, *Plasmonics,* 1, 79-85.

[136] **Lu, X., Tuan, H. Y., Chen, J., Li, Z. Y., Korgel, B. A., and Xia, Y.,** 2007. Mechanistic studies on the galvanic replacement reaction between multiply twinned particles of Ag and HAuCl4 in an organic medium, *J. Am. Chem. Soc.,* **129,** 1733-1742.

[137] **Selvakannan, P. R., and Sastry, M.,** 2005. Hollow gold and platinum nanoparticles by a transmetallation reaction in an organic solution, *Chem. Commun.,* **13,** 1684-1686.

[138] **Starowicz, M., Stypula, B., and Banas, J.,** 2006. Electrochemical synthesis of silver nanoparticles *Electrochem. Commun.,* **8,** 227-230.

[139] **Plieth, W., Dietz, H., Anders, A., Sandmann, G., Meixner, A., Weber, M., and Kneppe, H.,** 2005. Electrochemical preparation of silver and gold nanoparticles: Characterization by confocal and surface enhanced Raman microscopy, *Surf. Sci.,* **597,** 119-126.

[140] **Vosgroene, T., Meixner, A. J., Anders, A., Dietz, H., Sandmann, G., and Plieth, W.,** 2005. Electrochemically deposited silver particles for surface enhanced Raman spectroscopy , *Surf. Sci.,* **597,** 102-109.

[141] **Lee, W., Scholz, R., Nielsch, K., Goesele, U.,** 2005. Template-Based Electrochemical Method for the Synthesis of Multisegmented Metallic Nanotubes, *Angew. Chem., Int. Ed.,* **44,** 6050-6054.

[142] **Huang, C. J., Chiu, P. H., Wang, Y. H., Yang, C. F., and Feng, S. W.,** 2007. Electrochemical formation of crooked gold nanorods and gold networked structures by the additive organic solvent, *J. Colloid Interface Sci.,* **306,** 56-65.

[143] **Kim, F., Song, J. H., and Yang, P. D.,** 2002. Photochemical synthesis of gold nanorods, *J. Am. Chem. Soc.,* **124,** 14316-14317.

[144] **Zhu, J., Shen, Y., Xie, A., Qiu, L., Zhang, Q., Zhang, S.,** 2007. Photoinduced Synthesis of Anisotropic Gold Nanoparticles in Room-Temperature Ionic Liquid, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 7629-7633.

[145] **Sakamoto, M., Tachikawa, T., Fujitsuka, M., and Majima, T.,** 2007. Photochemical formation of Au/Cu bimetallic nanoparticles with different shapes and sizes in a poly(vinyl alcohol) film, *Adv. Funct. Mater.,* **17,** 857-862.

[146] **McGilvray, K. L., Decan, M. R., Wang, D., and Scaiano, J. C.,** 2006. Facile photochemical synthesis of unprotected aqueous gold nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.,* **128,** 15980-15981.

[147] **Park, J. E., Atobe, M., and Fuchigami, T.,** 2006. Synthesis of multiple shapes of gold nanoparticles with controlled sizes in aqueous solution using ultrasound, *Ultrason. Sonochem.,* **13,** 237-241.

[148] **Su, C. H., Wu, P. L., and Yeh, C. S.** 2003. Sonochemical synthesis of well-dispersed gold nanoparticles at the ice temperature, *J. Phys. Chem. B,* **107,** 14240-14243.

[149] **Jiang, L. P., Wang, A. N., Zhao, Y., Zhang, J. R., Zhu, J. J.,** 2004. A novel route for the preparation of monodisperse silver nanoparticles via a pulsed sonoelectrochemical technique, *Inorg. Chem. Commun.,* **7,** 506-509.

[150] **Rodriguez-Gonzalez, B., Mulvaney, P., and Liz-Marzan, L. M. Z.,** 2007. An electrochemical model for gold colloid formation via citrate reduction, *Phys. Chem.,* **221,** 415-426.

[151] **Pal, A., Shah, S., and Devi, S.,** 2007. Preparation of silver, gold and silver-gold bimetallic nanoparticles in w/o microemulsion containing TritonX-100, *Colloids Surf., A,* **302,** 483-487.

[152] **Kariuki, N. N., Luo, J., Maye, M. M., Hassan, S. A., Menard, T., Naslund, H. R., Lin, Y., Wang, C., Engelhard, M. H., and Zhong, C. J.,** 2004. Composition-controlled synthesis of bimetallic gold-silver nanoparticles, *Langmuir,* **20,** 11240-11246.

[153] **Toshima, N., and Yonezawa, T.,** 1998. Bimetallic nanoparticles - novel materials for chemical and physical applications, *New J. Chem.,* **22,** 1179-1201.

[154] **Wiley, B., Herricks, T., Sun, Y., and Xia, Y.,** 2004. Polyol synthesis of silver nanoparticles: Use of chloride and oxygen to promote the formation of single-crystal, truncated cubes and tetrahedrons, *Nano Lett.,* **4,** 1733-1739.

[155] **Yuan, H., Ma, W., Chen, C., Zhao, J., Liu, J., Zhu, H., Gao, X.,** Shape and SPR Evolution of Thorny Gold Nanoparticles Promoted by Silver Ions, 2007. *Chem. Mater.,* **19,** 1592-1600.

[156] **Srnova-Sloufova, I., Vlckova, B., Bastl, Z., and Hasslett, T. L.,** 2004. Bimetallic (Ag)Au nanoparticles prepared by the seed growth method: Two-dimensional assembling, characterization by energy dispersive X-ray analysis, X-ray photoelectron spectroscopy, and surface enhanced Raman spectroscopy, and proposed mechanism of growth, *Langmuir,* **20,** 3407-3415.

[157] **Youk, J. H., Park, M. K., Locklin, J., Advincula, R., Yang, J., and Mays, J.,** 2002. Preparation of aggregation stable gold nanoparticles using star-block copolymers, *Langmuir,* **18,** 2455-2458.

[158] **Shi, X., Ganser, T. R., Sun, K., Balogh, L. P., and Baker, J. R.,** 2006. Characterization of crystalline dendrimer-stabilized gold nanoparticles, *Nanotechnology,* **17,** 1072-1078.

[159] **Shahverdi, A. R., Minaeian, S., Shahverdi, H. R., Jamalifar, H., and Nohi, A. A.** 2007. Rapid synthesis of silver nanoparticles using culture supernatants of Enterobacteria: A novel biological approach, *Process Biochem.,* **42,** 919-923.

[160] **Rangnekar, A., Sarma, T. K., Singh, A. K., Deka, J., Ramesh, A., and Chattopadhyay, A.** 2007. Retention of enzymatic activity of alpha-amylase in the reductive synthesis of gold nanoparticles, *Langmuir,* **23,** 5700-5706.

[161] **Willner, I., Baron, R., and Willner, B.,** 2006. Growing metal nanoparticles by enzymes, *Adv. Mater.,* **18,** 1109-1120.

[162] **Gericke, M., and Pinches, A.** 2006. Microbial production of gold nanoparticles, *Gold Bull.,* **39,** 22-28.

[163] **Klaus, T., Joerger, R., Olsson, E., and Granqvist, C. G**., 1999. Silver-based crystalline nanoparticles, microbially fabricated, *PNAS,* **96,** 13611-13614.

[164] **Raveendran, P., Fu, J., and Wallen, S. L.,** 2003. Completely "green" synthesis and stabilization of metal nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 13940-13941.

[165] **McLeod, C. M., Gale, W. F., and Roberts, C. B.,** 2004. Metallic nanoparticle production utilizing a supercritical carbon dioxide flow p rocess, *Langmuir,* **20,** 7078-7082.

[166] **Turkevitch, J., Stevenson, P., and Hillier, C.,** 1951. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold, *J. Discuss. Faraday Soc.*, **11,** 55-75.

[167] **Hayat, M. A.,** 1989. *Colloidal Gold: Principles, Methods and Applications,* Academic Press, San Diego.

[168] **Lee P. C., and Meisel, D.,** 1982. Adsorption and Surface-Enhanced Raman of Dyes on Silver and Gold Sols, *J. Phys. Chem.*, **86,** 3391-3395.

[169] **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, *Adv. Mater.*, **13,** 1389-1393.

[170] **Iqbal, M., Chung, Y. I., and Tae, G.,** 2007. An enhanced synthesis of gold nanorods by the addition of Pluronic (F-127) via a seed mediated growth process, *J. Mater. Chem.*, **17,** 335-342.

[171] **Neeves, A. E., and Birnboim, M. H.,** 1989. Composite Structures For The Enhancement Of Nonlinear-Optical Susceptibility, *J. Opt. Soc. Am. B,* **6,** 787-796.

[172] **Oldenburg, S. J., Averitt, R. D., Westcott, S. L., and Halas, N. J.,** 1998. Nanoengineering of optical resonances, *Chem. Phys. Lett.*, **288,** 243-247.

[173] **Halas, N.J.,** 2005. Playing with plasmons. Tuning the optical resonant properties of metallic nanoshells, *MRS Bull.*, **30,** 362-367.

[174] **Kahraman, M., Aydın, O., and Culha, M**., 2009. Oligonucleotide-Mediated Au-Ag Core-Shell Nanoparticles, *Plasmonics,* **4,** 293-301.

[175] **Rodriguez-Gonzalez , B., Burrows, A,, Watanabe, M., Kiely, C. J., and Marzan, L. M. L.,** 2005. Multishell bimetallic AuAg nanoparticles: synthesis, structure and optical properties, *J. Mater. Chem.*, **15,** 1755-1759.

[176] **Liu, M., and Guyot-Sionnest, P.,** 2004. Synthesis and optical characterization of Au/Ag core/shell nanorods, *J. Phys. Chem. B,* **108,** 5882-5888.

[177] **Yang, Y., Shi, J., Kawamura, G., and Nogami, M.,** 2008. Preparation of Au-Ag, Ag-Au core–shell bimetallic nanoparticles for surfaceenhanced Raman scattering, *Scr. Mater.* **58,** 862-865.

[178] **Huang, Y., Yang, Y., Chen, Z., Li, X., and Nogami, M.,** 2008. Fabricating Au-Ag core-shell composite films for surface-enhanced Raman scattering, *J. Mater. Sci.,* 43, 5390-5393.

[179] **Cui, Y., Ren, B., Yao, J. L., Gu, R. A., and Tian, Z. Q.,** 2006. Synthesis of AgcoreAushell bimetallic nanoparticles for immunoassay based on surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 4002-4006.

[180] **Kumar, G. V. P., Shruthi, S., Vibha, B., Reddy, B. A. A.,** Kundu, T. K., **and Narayana, C.,** 2007. Hot spots in Ag core-Au shell nanoparticles potent for surface enhanced Raman scattering studies of biomolecules, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 4388-4392.

[181] **Cao, Y., Jin, R., and Mirkin, C. A.,** 2001. DNA-modified core-shell Ag/Au nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.,* **123,** 7961-7962.

[182] **Lim, D. K., Kim, I. J., and Nam, J. M.,** 2008. DNA-embedded Au/Ag core–shell nanoparticles, *Chem. Commun.,* 5312-5314.

[183] **Lee, S., Kim, S., Choo, J., Shin, S. Y., Lee, Y. H., Choi, H. Y., Ha, S., Kang, K., Oh, C. H.,** 2007. Biological imaging of HEK293 cells expressing PLC1 using surface-enhanced Raman microscopy, *Anal. Chem.,* **79,** 916-922.

[184] **A Grigorenko,. N. A., Geim, K., Gleeson, H. F., Zhang, Y., Firsov, A. A., Khrushchev, I. Y., and Petrovic, J.,** 2005. Nanofabricated media with negative permeability at visible frequencies, *Nature,* **438,** 335-338.

[185] **Ditlbacher, H., Krenn, J. R., Schider, G., Leitner, A., and Aussenegg, F. R.,** 2002. Two-dimensional optics with surface plasmon polaritons, *Appl. Phys. Lett.,* **81,** 1762-1764.

[186] **Wang, S., Pile, D. F. P., Sun, C., and Zhang, X.,** 2007. Nanopin plasmonic resonator array and its optical properties, *Nano Lett.,* 7, 1076-1080.

[187] **Billot, L., Lamy de la Chapelle, M., Grimault, A. S., Vial, A., Barchiesi, D., Bijeon, J. L., Adam, P. M., and Royer, P.,** 2006. Surface enhanced Raman scattering on gold nanowire arrays: Evidence of strong multipolar surface plasmon resonance enhancement, *Chem. Phys. Lett.,* **422,** 303-307.

[188] **De Jesus, M. A., Giesfeldt, K. S., Oran, J. M., Abu-Hatab, N. A., Lavrik, N. V., and Sepaniak, M. J.,** 2005. Nanofabrication of densely packed metal-polymer arrays for surface-enhanced Raman spectrometry, *Appl. Spectrosc.,* **59,** 1501-1508.

[189] **Corrigan, T. D., Guo, S., Phaneuf, R. J., and Szmacinski, H.,** 2005. Enhanced fluorescence from periodic arrays of silver nanoparticles, *J. Fluoresc.,* **15,** 777-784.

[190] **Ohno, T., Bain, J. A., and Schlesinger, T. E.,** 2007. Observation of geometrical resonance in optical throughput of very small aperture lasers associated with surface plasmons, *J. Appl. Phys.,* **101,** Article Number: 083107.

[191] **Chang, C. K., Lin, D. Z., Yeh, C. S., Lee, C. K., Chang, Y. C., Lin, M. W., Yeh, J. T., and Liu, J. M.,** 2007. Experimental analysis of surface plasmon behavior in metallic circular slits, *Appl. Phys. Lett.,* **90,** Article Number: 061113.

[192] **Przybilla, F., Genet, C., and Ebbesen, T. W.,** 2006. Enhanced transmission through Penrose subwavelength hole arrays, *Appl. Phys. Lett.,* **89,** Article Number: 121115.

[193] **Dintinger, J., Klein, S., and Ebbesen, T. W.,** 2006. Molecule-surface plasmon interactions in hole arrays: Enhanced absorption, refractive index changes, and all-optical switching, *Adv. Mater.,* **18,** 1267-1270.

[194] **Gonzalez, M. U., Weeber, J. C., Baudrion, A. L., Dereux, A., Stepanov, A. L., Krenn, J. R., Devaux, E., and Ebbesen, T. W.,** 2006. Design, near-field characterization, and modeling of 45 circle surface-plasmon Bragg mirrors, *Phys.Rev. B,* **73,** Article Number: 155416.

[195] **Lopez-Tejeira, F., Rodrigo, S. G., Martin-Moreno, L., Garcia-Vidal, F. J., Devaux, E., Ebbesen, T. W., Krenn, J. R., Radko, I. P., Bozhevolnyi, S. I., Gonzalez, M. U., Weeber, J. C., and Dereux, A.,** 2007. Efficient unidirectional nanoslit couplers for surface plasmons, *Nat. Phys.,* **3,** 324-328.

[196] **Murray, W. A., and Barnes, W. L.,** 2007. Plasmonic Materials, *Adv. Mater.,* **19,** 3771-3782.

[197] **Zhang, J. Z., Noguez, C.,** 2006. Plasmonic Optical Properties and Applications of Metal Nanostructures, *Plasmonics,* **3,** 127-150.

[198] **Zhang, J. Z., Wang, Z. L., Liu, J., Chen, S., Liu, G. Y.,** 2003. Self-assembled nanostructures, Kluwer Academic/Plenum, New York.

[199] **Liu, G.Y., Xu, S., and Qian, Y.L.,** 2000. Nanofabrication of self-assembled monolayers using scanning probe lithography, *Acc. Chem. Res.,* **33,** 457-466

[200] **Wang, Z. L.,** 2000. Transmission electron microscopy of shape-controlled nanocrystals and their assemblies, *J. Phys. Chem. B,* **104,** 1153-1175.

[201] **Wang, Z. L., Poncharal, P., and de Heer, W. A.,** 2000. Nanomeasurements in transmission electron microscopy, *Microsc. Microanal.,* **6,** 224-230.

[202] **Cao, G.,** 2004. *Nanostructures and nanomaterials: synthesis, properties and applications,* Imperial College Press, London.

[203] **Khlebtsov, N. G.,** 2008. Determination of Size and Concentration of Gold Nanoparticles from Extinction Spectra, *Anal. Chem.,* 80, 6620-6625.

[204] **Ferrari, A. C., Meyer, J. C., Scardaci, V., Casiraghi, C., Lazzeri, M., Mauri, F., Piscanec, S., Jiang, D., Novoselov, K. S., Roth, S., and Geim, A. K.,** 2006. Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers, *Phys. Rev. Lett.,* **97,** Article Number: 187401.

[205] **Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., and Van Duyne, R. P.,** 2008. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Annu. Rev. Anal. Chem.,* **1,** 601-626.

[206] **Kneipp, K., Kneipp, H., And Kneipp, J.,** 2006. Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold NanoaggregatessFrom Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells, *Acc. Chem. Res.*, **39,** 443-450.

[207] **Fleischman, M., Hendra, P. J., and McQuillan, A. J.,** 1974. Raman-Spectra of Pyridine Adsorbed at a Silver Electrode. *Chem. Phys. Lett.,* **26,** 163-166.

[208] **Jeanmaire, D. L., and Van Duyne, R. P.,** 1977. Surface Raman Spectroelectrochemistry. 1. Heterocyclic, Aromatic, and Aliphatic-Amines Adsorbed on Anodized Silver Electrode. *J. Electroanal. Chem.*, **84,** 1-20.

[209] **Albrecht, M. G., and Creighton, J. A.,** 1977Anomalously Intense Raman Spectra of Pyridine at a Silver Electrode, *J. Am. Chem. Soc.*, **99,** 5215-5217.

[210] **Campion, A., and Kambhampati, P.,** 1998. Surface-enhanced Raman scattering, *Chem. Soc. Rev.*, **27,** 241-250.

[211] **Moskovits, M.,** 1978. Surface roughness and the enhanced intensity of Raman scattering by molecules adsorbed on metals, *J. Chem. Phys.*, **69,** 1459-1461.

[212] **Moskovits M.,** 1985. Surface-Enhanced Spectroscopy, *Rev. Mod. Phys.*, **57,** 783-826.

[213] **Otto, A.,** 1984. *In Light scattering in solids IV. Electronic scattering, spin effects, SERS and morphic effects,* Cardona, M., Guntherodt, G., Eds., Springer-Verlag: Berlin, Germany, pp 289-418.

[214] **Persson, B. N. J.** 1981. On the theory of surface-enhanced Raman scattering. *Chem. Phys. Lett.,* **82,** 561-565.

[215] **Haynes C., Mcfarland, A. D., and Van Duyne, R. P.,** 2005. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, 339A-346A.

[216] **Creighton, J. A., Blatchford, C. G., and Albrecht, M. G.,** 1979. Plasma Resonance Enhancement Of Raman-Scattering By Pyridine Adsorbed On Silver Or Gold Sol Particles Of Size Comparable To The Excitation Wavelength, *J. Chem. Soc. Fraday Trans. 2,* **75,** 790-798.

[217] **Aroca, R. F., Alvarez-Puebla , R. A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S., and Garcia-Ramos, J. V.,** 2005. Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures, *Advances in Colloid and Interface Science,* **116,** 45-61.

[218] **Schwartzberg, A. M,. Grant, C. D., Wolcott, A, Talley, C. E. Huser, T. R. Bogomolni, R., and Zhang, J. Z.,** 2004. Unique Gold Nanoparticle Aggregates as a Highly Active Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate, *J. Phys. Chem. B,* **108,** 19191-19197.

[219] **Rivas, L., Sanchez-Cortes, S., Garcıa-Ramos, J. V., and Morcillo, G.,** 2000. Mixed Silver/Gold Colloids: A Study of Their Formation, Morphology, and Surface-Enhanced Raman Activity, *Langmuir,* **16,** 9722-9728.

[220] **Huang, Y., Yang, Y., Chen, Z., Li, X., Nogami, M.,** 2008. Fabricating Au–Ag core-shell composite films for surface-enhanced Raman scattering, *J. Mater. Sci.,* **43,** 5390-5393.

[221] **Chattopadhyay, S., Lo, H. C., Hsu, C. H. Chen, L. C., and Chen, K. H.,** 2005. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Using Self-Assembled Silver Nanoparticles on Silicon Nanotips, *Chem. Mater.,* **17,** 553-559.

[222] **Saito, Y., Wang, J. J., Smith, D. A., and Batchelder, D. N.,** 2002. A Simple Chemical Method for the Preparation of Silver Surfaces for Efficient SERS, *Langmuir,* **18,** 2959-2961.

[223] **Alvarez-Puebla, R, Cui, B., Bravo-Vasquez, J. P., Veres, T., and Fenniri, H.,** 2007. Nanoimprinted SERS-Active Substrates with Tunable Surface Plasmon Resonances, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 6720-6723.

[224] **Wen, R., and Fang, Y.,** 2005. An investigation of the surface-enhanced Raman scattering (SERS) effect from a new substrate of silver-modified silver electrode, *Journal of Colloid and Interface Science,* **292,** 469-475.

[225] **Park, S. M., Kim, K., and Kim, M. S.,** 1995. Adsorption Of Picolinic and Nicotinic Acids On A Silver Sol Surface Investigated By Raman-Spectroscopy, *J. Mol. Struct.,* **344,** 195-203.

[226] **Lambert, D.K.,** 1996. Vibrational Stark effect of adsorbates at electrochemical interfaces, *Electrochim. Acta,* **41,** 623-630.

[227] **Bell, S., Crayston, J. A., Dines, T. J., and Ellahi, S. B.,** 1996. Resonance Raman, surface-enhanced resonance Raman, infrared, and ab initio vibrational spectroscopic study of tetraazaannulenes, *J. Phys. Chem.,* **100,** 5252-5260.

[228] **Chowdhury, J., Ghosh, M., and Misra, T.N.,** 2000. Surface enhanced Raman scattering of 2,2 ' biquinoline adsorbed on colloidal silver particles, *Spectrochim. Acta Part A,* **56,** 2107-2115.

[229] **Baia, M., Baia, L., and Astilean, S.,** 2005. Gold nanostructured films deposited on polystyrene colloidal crystal templates for surface-enhanced Raman spectroscopy, *Chemical Physics Letters,* **404,** 3-8.

[230] **Sackmann, M., Bom, S., Balster T., and Materny, A.,** 2007. Nanostructured gold surfaces as reproducible substrates for surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.,* **38,** 277-282.

[231] **Le Ru, E. C., Etchegoin, P.G., Grand, J., Fe´lidj, N., Aubard, J., Le´vi, G., Hohenau, A., and Krenn, J.R.,** 2008. Surface enhanced Raman spectroscopy on nanolithography-prepared substrates, *Current Applied Physics,* **8,** 467-470.

[232] **Kostovski G., Whiteb, D. J., Mitchell A., Austin M. W., and Stoddart, P. R.,** 2009. Nanoimprinted optical fibres: Biotemplated nanostructures for SERS sensing, *Biosensors and Bioelectronics,* **24,** 1531-1535.

[233] **Abu Hatab, N. A., Oran, J. M., and Sepaniak, M. J.,** 2008. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates Created via Electron Beam Lithography and Nanotransfer Printing, *ACS Nano,* **2,** 377-385.

[234] **Cerf, A., Molna´r, G., and Vieu, C.,** 2009. Novel Approach for the Assembly of Highly Efficient SERS Substrates, *ACS Appl. Mater. Interfaces,* **1,** 2544-2550.

[235] **Wells, S. M., Retterer, S. D., Oran, J. M. and Sepaniak, M. J.,** 2009. Controllable Nanofabrication of Aggregate-like Nanoparticle Substrate and Evaluation for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *ACS Nano,* **3,** 3845-3853.

[236] **Ruan, C., Eres, G., Wang, W., Zhang, Z., and Gu, B.,** 2007. Controlled Fabrication of Nanopillar Arrays as Active Substrates for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Langmuir,* **23,** 5757-5760.

[237] **Kahraman, M., Tokman, N., and Culha, M.,** 2008. Silver Nanoparticle Thin Films with Nanocavities for Surface-Enhanced Raman Scattering, *ChemPhysChem,* **9,** 902-910.

[238] **Culha, M., Kahraman, M., Tokman, N., and Turkoglu, G.,** 2008. Surface-Enhanced Raman Scattering on Aggregates of Silver Nanoparticles with Definite Size, *J. Phys. Chem. C,* **112,** 10338-10343.

[239] **Lu, L., Randjelovic, I., Capek, R., Gaponik, N., Yang, J., Zhang, H., and Eychmuller, A.,** 2005. Controlled Fabrication of Gold-Coated 3D Ordered Colloidal Crystal Films and Their Application in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Chem. Mater.,* **17,** 5731-5736.

[240] **Wang, H., Levin, C. S., and Halas, N. J.,** 2005. Nanosphere Arrays with Controlled Sub-10-nm Gaps as Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates, *J. Am. Chem. Soc.,* **127,** 14992-14993.

[241] **Wang, H., Kundu, J., and Halas, N. J.,** 2007. Plasmonic Nanoshell Arrays Combine Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopies on a Single Substrate, *Angew. Chem.,* **119,** 9198-9202.

[242] **Suzuki, M., Niidome, Y., Kuwahara, Y., Terasaki, N., Inoue, K., and Yamada, S.,** 2004. Surface-enhanced nonresonance Raman scattering from size- and morphology-controlled gold nanoparticle films, *J. Phys. Chem. B,* **108,** 11660-11665.

[243] **Nikoobakht, B., and El-Sayed , M. A.,** 2003. Surface-enhanced Raman scattering studies on aggregated gold nanorods, *J. Phys. Chem. A,* **107,** 3372-3378.

[244] **Zou, X., and Dong, S.,** 2006. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Silver Nanoplates in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 21545-21550.

[245] **Chattopadhyay, S., Lo, H. C., Hsu, C. H., Chen, L. C., and Chen, K. H.,** 2005. Surface-enhanced Raman spectroscopy using self-assembled silver nanoparticles on silicon nanotips, *Chem. Mater.,* **17,** 553-559.

[246] **Park, H. K., Yoon, J. K., and Kim, K.,** 2006. Novel fabrication of Ag thin film on glass for efficient surface-enhanced Raman scattering, *Langmuir,* **22,** 1626-1629.

[247] **Gupta, R., and Weimer, W. A.,** 2003. High enhancement factor gold films for surface enhanced Raman spectroscopy, *Chem. Phys. Lett.,* **374,** 302-306.

[248] **Kho, K. W., Shen, Z. X., Zeng, H. C., Soo, K. C., and Olivo, M.,** 2005. Deposition method for preparing SERS-active gold nanoparticle substrates, *Anal. Chem.,* **77,** 7462-7471.

[249] **Kneipp, K., Kneipp, H., Deinum, G., Itzkan, I., Dasari, R. R.,and Feld, M. S.,** 1998. Single-Molecule Detection of a Cyanine Dye in Silver Colloidal Solution Using Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering. *Appl. Spectrosc.,* **52,** 175-178.

[250] **Kneipp, K., Kneipp, H., Kartha, V. B., Manoharan, R., Deinum, G., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S.,** 1998. Detection and identification of a single DNA base molecule using surface-enhanced Raman scattering (SERS). *Phys. Rev. E,* **57,** R6281-R6284.

[251] **Xu, H., Bjerneld, E. J., Käll, M., and Börjesson, L.,** 1999. Spectroscopy of Single Hemoglobin Molecules by Surface Enhanced Raman Scattering, *Physical Review Letters,* **83,** 4357-4360.

[252] **Michaels, A. M., Jiang, J., and Brus, L.,** 2000. Ag Nanocrystal Junctions as the Site for Surface-Enhanced Raman Scattering of Single Rhodamine 6G Molecules, *J. Phys. Chem. B,* **104,** 11965-11971.

[253] **Garcia de Abajo, F. J.,** 2007. Colloquium: Light scattering by particle and hole array, *Rev. Mod. Phys.,* **79,** 1267-1290.

[254] **Graham, D., Faulds, K., and Smith,W. E.,** 2006. Biosensing using silver nanoparticle and surface enhanced resonance Raman scattering, *Chem. Commun.,* **42,** 4363-4371.

[255] **Suzuki, M., Niidome, Y., Kuwahara, Y., Terasaki, N, Inoue, K. and Yamada, S.,** 2004. Surface-Enhanced Nonresonance Raman Scattering from Size- and Morphology-Controlled Gold Nanoparticle Films, *J. Phys. Chem. B,* **108,** 11660-11665.

[256] **Seney, C. S., Gutzman, B. M., and Goddard, R. H.,** 2009. Correlation of Size and Surface-Enhanced Raman Scattering Activity of Optical and Spectroscopic Properties for Silver Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C,* **113,** 74-80.

[257] **Njoki, P. N., Lim, I. I. S., Mott, D., Park, H. Y., Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., and Zhong, C. J.,** 2007. Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 14664-14669.

[258] **Bell, S. E. J., and McCourt, M. R.,** 2009. SERS enhancement by aggregated Au colloids: effect of particle size, *Phys. Chem. Chem. Phys.,* **11,** 7455-7462.

[259] **Sant'Ana, A. C., Rocha, T. C. R., Santos, P. S., Zanchet, D., and Temperini, M. L. A.,** 2009. Size-dependent SERS enhancement of colloidal silver nanoplates: the case of 2-amino-5-nitropyridine, *J. Raman Spectrosc.,* **40,** 183-190.

[260] **Tiwari, V. S., Oleg, T., Darbha, G. K., Hardy, W., Singh, J.P., and Ray, P. C.,** 2007. Non-resonance SERS effects of silver colloids with different shapes, *Chemical Physics Letters,* **446,** 77-82.

[261] **Ciou, S. H., Cao, Y. W., Huang, H. C., Su, D. Y., and Huang, C. L.,** 2009. SERS Enhancement Factors Studies of Silver Nanoprism and Spherical Nanoparticle Colloids in The Presence of Bromide Ions, *J. Phys. Chem. C,* **113,** 9520-9525.

[262] **Kwon, K., Lee, K. Y., Lee, Y. W., Kim, M, Heo, J., Ahn, S. J., and Han, S. W.,** 2007. Controlled Synthesis of Icosahedral Gold Nanoparticles and Their Surface-Enhanced Raman Scattering Property, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 1161-1165.

[263] **Guo, H., Ruan, F., Lu, L., Hu, J., Pan, J., Yang, Z., and Ren, B.,** 2009. Correlating the Shape, Surface Plasmon Resonance, and Surface-Enhanced Raman Scattering of Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. C,* **113,** 10459-10464.

[264] **Zhang, J., Li, X., Sun, X., and Li, Yadong.,** 2005. Surface Enhanced Raman Scattering Effects of Silver Colloids with Different Shapes, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 12544-12548.

[265] **Zou, X., and Dong, S.,** 2006. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Silver Nanoplates in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. B,* **110,** 21545-21550.

[266] **Nikoobakht, B., and El-Sayed, M. A.,** 2003. Surface-Enhanced Raman Scattering Studies on Aggregated Gold Nanorods, *J. Phys. Chem. A,* **107,** 3372-3378.

[267] **Jana, N. R., and Pal, T.,** 2007. Anisotropic metal nanoparticles for use as surface-enhanced Raman substrates, *Adv. Mater.*, **19,** 1761-1763.

[268] **Orenforff, C. J., Gearheart, L., Jana, N. R., and Murphy, C. J.,** 2005. Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **8,** 165-170.

[269] **Kneipp, K., Kneipp, H., Manoharan, R., Hanlon, E. B., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S.,** 1998. Extremely Large Enhancement Factors in Surface-Enhanced Raman Scattering for Molecules on Colloidal Gold Clusters. *Appl. Spectrosc.*, **52,** 1493-1497.

[270] **Sztainbuch, I. W.,** 2006. The effects of Au aggregate morphology on surface-enhanced Raman scattering enhancement, *J.Chem. Phys.*, **125,** Article Number: 124707.

[271] **Kahraman, M., Aydin, O., and Çulha, M.,** 2009. Size Effect of 3D Aggregates Assembled from Silver Nanoparticles on Surface-Enhanced Raman Scattering, *ChemPhysChem,* **10,** 537-542.

[272] **Faulds, K., Littleford, R. E., Graham, D., Dent, G., and Smith ,W. E.,** 2004. Comparison of Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering from Unaggregated and Aggregated Nanoparticles, *Anal. Chem.,* **76,** 592-598.

[273] **Alvarez-Puebla, R. A., Arceo, E., Goulet, P. J. G. Garrido, J. J., and Aroca, R. F.,** 2005. Role of Nanoparticle Surface Charge in Surface-Enhanced Raman Scattering, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 3787-3792.

[274] **Alvarez-Puebla, R. A,. and Aroca, R. F.,** 2009. Synthesis of silver nanoparticles with controllable surface charge and their application to surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Chem.,* **81,** 2280–2285.

[275] **Mitchell, Breeana. L., Patwardhan, A. J., Ngola, S. M., Chan, S., and Sundararajan, N.,** 2008. Experimental and statistical analysis methods for peptide detection using surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, **39,** 380-388.

[276] **Graham, D., Smith, W. E., Linacre, A. M. T., Munro, C. H., Watson, N. D., White, P. C.,** 1997. Selective Detection of Deoxyribonucleic Acid at Ultralow Concentrations by SERRS, *Anal. Chem.,* **69,** 4703-4707.

[277] **Brus, L.,** 2008. Noble metal nanocrystals: plasmon electron transfer photochemistry and single-molecule Raman spectroscopy, *Acc. Chem. Res.,* **41,** 1742-1749.

[278] **Lee, S. J., Guan, Z., Xu, H., and Moskovits, M.,** 2007. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy and Nanogeometry: The Plasmonic Origin of SERS, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 17985-17988.

[279] **Le Ru, E. C., Meyer, M., Blackie E., and Etchegoin, P. G.,** 2008. Advanced aspects of electromagnetic SERS enhancement factors at a hot spot, *J. Raman Spectrosc.,* **39,** 1127-1134.

[280] **Camden, J. P., Dieringer, J. A., Wang, Y., Masiello, D. J., Marks, L. D., Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P.,** 2008. Probing the Structure of Single-Molecule Surface-Enhanced Raman Scattering Hot Spots, *J. Am. Chem. Soc.*, **130,** 12616-12617.

[281] **Camargo, P. H. C., Rycenga, M., Au, L., and Xia, Y.,** 2009. Isolating and Probing the Hot Spot Formed between Two Silver Nanocubes, Angew. Chem. Int. Ed., 48, 2180-2184.

[282] **Lee, S. L., Morril, A., Moskovits, M.,** 2006. Hot spots in nanoire bundles for surface-enhanced Raman spectroscopy, *JACS,* **128,** 2200-2201.

[283] **Jiang, J., Bosnick, K., Maillard, M., and Brus, L.,** 2003. Single Molecule Raman Spectroscopy at the Junctions of Large Ag Nanocrystals, *J. Phys. Chem. B,* **107,** 9964-9972.

[284] **Safanov, V. P., Shalaev, V. M., Markel, V. A., Danilova, Y. E. , Lepeshkin, N. N., Kim, W., Rautian, S. G., Armstrong, R. L.,** 1998. Spectral dependence of selective photomodification in fractal aggregates of colloidal particles, *Phys. Rev. Lett.,* **80,** 1102-1105.

[285] **Kneipp, K., Kneipp, H., Corio, P., Brown, S. D. M., Shafer, K., Motz, J., Perelman, L. T., Hanlon, E. B., Marucci, A., Dresselhaus, G., and Dresselhaus, M. S.,** 2000. Surface-enhanced and normal Stokes and anti-Stokes Raman spectroscopy of single-walled carbon nanotubes, *Phys. Rev. Lett.,* **84,** 3470-3473.

[286] **Xu, H. X., Aizpurua, J., Kall, M., and Apell, P.,** 2000. Electromagnetic contributions to single-molecule sensitivity in surface-enhanced Raman scattering, *Phys. Rev. E,* **62,** 4318-4324

[287] **Abalde-Cela, S., Aldeanueva-Potel, P., Mateo-Mateo, C., Rodrı´guez-Lorenzo, L., Alvarez-Puebla, R. A., and Liz-Marzan, L. M.,** 2010. Surface-enhanced Raman scattering biomedical applications of plasmonic colloidal particles, *J. R. Soc. Interface,* **7,** S435-S450.

[288] **Emory, S. R., Haskins, W. E., and Nie, S.,** 1998. Direct Observation of Size-Dependent Optical Enhancement in Single Metal Nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.,* **120,** 8009-8010.

[289] **Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R. R., and Feld, M. S.,** 2002. Surface-enhanced Raman scattering and biophysics. *J. Phys. Condens. Matter.,* **14,** R597-R624.

[290] **Mie, G.,** 1908. Beiträge zur Optik trüber Medien, speziell kolloidaler Metallösungen, *Ann. Phys.,* **25,** 377-445

[291] **Barber, P. W., and Hill, S. C.,** 1990. Light Scattering by Particles: Computational Methods, Vol: 2, World Scientific Publishing, Singapore.

[292] **Yang, W. H., Schatz, G. C., and Van Duyne, R. P.,** 1995. Discrete Dipole Approximation For Calculating Extinction And Raman Intensities For Small Particles With Arbitrary Shapes, *J. Chem. Phys.,* **103,** 869-875.

[293] **Sosa, I. O., Noguez, C., and Barrera, R. G.,** 2003. Optical properties of metal nanoparticles with arbitrary shapes, *J. Phys. Chem. B,* **107,** 6269-6275.

[294] **Shlager, K. L., and Schneider, J. B.,** 1995. Selective Survey Of The Finite-Difference Time-Domain Literature, *IEEE Antenn. Propag. Mag.,* **37,** 39-57.

[295] **Gray, S. K., and Kupta, T.,** 2003. Propagation of light in metallic nanowire arrays: Finite-difference time-domain studies of silver cylinders, *Phys. Rev. B,* **68,** Article Number: 045415.

[296] **Stewart, S., Fredericks, P. M.,** 1999. Surface-enhanced Raman spectroscopy of amino acids adsorbed on an electrochemically prepared silver surface, *Spectrochimica Acta Part A,* **55,** 1641-1660.

[297] **Suh, J. S., and Moskovits, M.,** 1986. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Amino Acids and Nucleotide Bases Adsorbed on Silver, J. *Am. Chem. Soc.,* **108,** 471 1-4718.

[298] **Podstawka, E., Ozaki, Y., and Proniewicz, L. M.,** 2004. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Investigation of Amino Acids and Their Homodipeptides Adsorbed on Colloidal Silver, *Applied Spectroscopy*, **58,** 570-580.

[299] **Wei, F. Zhang, D., Halas, N. J., and Hartgerink, J. D.,** 2008. Aromatic Amino Acids Providing Characteristic Motifs in the Raman and SERS Spectroscopy of Peptides, *J. Phys. Chem. B*, **112,** 9158-9164.

[300] **Herne, T. M., Ahern, A. M., and Carrel, R. L.,** 1991. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Peptides: Preferential N-Terminal Adsorption on Colloidal Silver, *J. Am. Chem. Soc.*, **113,** 846-854.

[301] **Ngola, S. M., Zhang, J., Mitchell B. L., and Sundararajan, N.,** 2008. Strategy for improved analysis of peptides by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) involving positively charged nanoparticles, *J. Raman Spectrosc.*, **39,** 611-617.

[302] **Stewart, S., Fredericks, P.M.,** 1999. Surface-enhanced Raman spectroscopy of peptides and proteins adsorbed on an electrochemically prepared silver surface, *Spectrochimica Acta Part A*, **55,** 1615-1640.

[303] **Scholes, F. H., Bendavid, A., Glenn, F. L., Critchley, M., Davis T. J., and Sexton, B. A.,** 2008. Silica-overcoated substrates for detection of proteins by surface-enhanced Raman spectroscopy, *J. Raman Spectrosc.*, **39,** 673-678.

[304] **Han, X. X., Kitahama, Y., Itoh, T., Wang, C. X., Zhao, B., and Ozaki, Y.,** 2009. Protein-Mediated Sandwich Strategy for Surface-Enhanced Raman Scattering: Application to Versatile Protein Detection, *Anal. Chem.*, **81,** 3350–3355.

[305] **Bizzarri, A. R., and Cannistraro, S.,** 2007. SERS detection of thrombin by protein recognition using functionalized gold nanoparticles, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*, **3,** 306-310.

[306] **Dasa, G., Mecarini, F., Gentile, F., De Angelis, F., Kumar, M., Candeloro, P., Liberale, C., Cuda, G., and Di Fabrizio, E.,** 2009. Nano-patterned SERS substrate: Application for protein analysis vs. Temperature, *Biosensors and Bioelectronics*, **24,** 1693-1699.

[307] **Hu, J., Zheng, P. C., Jiang, J. H., Shen, G. L., Yu, R. Q., and Liu, G. K.,** 2009. Electrostatic Interaction Based Approach to Thrombin Detection by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, **81,** 87-93.

[308] **Cao, Y. C., Jin, R., Nam, J. M., Thaxton, C. S., and Mirkin, C. A.,** 2003. Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins, *J. Am. Chem. Soc.*, **125,** 14676-14677.

[309] **Fabris, L., Dante, M., Braun, G., Lee, S. J., Reich, N. O., Moskovits, M., Nguyen, T. Q., and Bazan, G. C.,** 2007. Heterogeneous PNA-Based SERS Method for DNA Detection, *J. Am. Chem. Soc.*, **129,** 6086-6087.

[310] **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, *J. Am. Chem. Soc.*, **129,** 6378-6379.

[311] **Wabuyele M. B., and Vo-Dinh, T.,** 2005. Detection of Human Immunodeficiency Virus Type 1 DNA Sequence Using Plasmonics Nanoprobes, *Anal. Chem.*, **77,** 7810-7815.

[312] **Cao, Y. W. C., Jin, R., and Mirkin, C. A.,** 2002. Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection, *Science*, **297,** 1536-1540.

[313] **Isola, N. R., Stokes, D. L., and Vo-Dinh, T.,** 1998. Surface-Enhanced Raman Gene Probe for HIV Detection, *Anal. Chem.*, **70,** 1352-1356.

[314] **Culha, M., Stokes, D., Allain, L. R., and Vo-Dinh, T.,** 2003. Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Based on a Self-Assembled Monolayer for Use in Gene Diagnostics, *Anal. Chem.*, **75,** 6196-6201.

[315] **Barhoumi, A., Zhang, D., Tam, F., and Halas, N. J.,** 2008. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of DNA, *J. Am. Chem. Soc.*, **130,** 5523-5529.

[316] **Sun, L., Yu, C., and Irudayaraj, J.,** 2008. Raman Multiplexers for Alternative Gene Splicing, *Anal. Chem.*, **80,** 3342-3349.

[317] **Sun, L, Yu, C., Irudayaraj, J.,** 2007. Surface-enhanced Raman scattering based nonfluorescent probe for multiplex DNA detection. *Anal. Chem.*, **79,** 3981-3988.

[318] **Stuart, D. A., Yonzon, C. R., Zhang, X., Lyandres, O., Shah, N. C., Glucksberg, M. R., Walsh, J. T., and Van Duyne, R. P.,** 2005. Glucose Sensing Using Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Spectroscopy: Gold Surfaces, 10-Day Stability, and Improved Accuracy, *Anal. Chem.*, **77,** 4013-4019.

[319] **Stuart, D. A., Yuen, J. M., Shah, N., Lyandres, O., Yonzon, C. R., Glucksberg, M. R., Walsh, J. T., and Van Duyne, R. P.,** 2006. In Vivo Glucose Measurement by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, **78,** 7211-7215.

[320] **Shanmukh, S., Jones, L., Driskell, J., Zhao, Y. P., Dluhy, R., Tripp, R. A.,** 2006. Rapid and Sensitive Detection of Respiratory Virus Molecular Signatures Using a Silver Nanorod Array SERS Substrate *Nano Lett.*, **6,** 2630-2636.

[321] **Alexander, T. A.** 2008. Development of Methodology Based on Commercialized SERS-Active Substrates for Rapid Discrimination of Poxviridae Virions *Anal. Chem.*, **80,** 2817-2825.

[322] **Patel, I. S., Premasiri,W. R., Moir D. T., and Ziegler, L. D.,** 2008. Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification, *J. Raman Spectrosc.*, **39,** 1660-1672.

[323] **Premasiri, W. R., Moir, D. T., Klempner, M. S., Krieger, N., Jones, G. 2nd, Ziegler, L. D.,** 2005. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria, *J. Phys. Chem. B,* **109,** 312-320.

[324] **Laucks, M., Sengupta, A., Junge, K., Davis, E. J., and Swanson, B. D.,** 2005. Comparison of Psychro-active Arctic Marine Bacteria and Common Mesophillic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Appl Spectrosc.,* **59,** 1222-1228.

[325] **Jarvis R. M., and Goodacre, R.,** 2004. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.,* **76,** 40-47.

[326] **Efrima, S. and Bronk, B. V.,** 1998. Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria, *J. Phys. Chem. B,* **102,** 5947-5950.

[327] **Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Cze´gec, J., and Efrima, S.,** 2002. Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects,* **208,** 357-362.

[328] **Zeiri, L., and Efrima, S.,** 2005. Surface-enhanced Raman spectroscopy of bacteria: the effect of excitation wavelength and chemical modification of the colloidal milieu, *J. Raman Spectrosc.,* **36,** 667-675.

[329] **Efrima S. and Zeiri, L.,** 2009. Understanding SERS of bacteria, *J. Raman Spectrosc.,* **40,** 277-288.

[330] **Jarvis R. M., and Goodacre, R.,** 2008. Characterisation and identification of bacteria using SERS, *Chem. Soc. Rev.,* **37,** 931-936.

[331] **Jarvis, R. M., Brooker A., and Goodacre, R.,** 2006. Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria, *Faraday Discuss.*, **132**, 281-292.

[332] **Jarvis, R. M., Law, N., Shadi, I. T., O'Brien, P., Lloyd, J. R., and Goodacre, R.,** 2008. Surface-Enhanced Raman Scattering from Intracellular and Extracellular Bacterial Locations, *Anal. Chem.,* **80,** 6741-6746.

[333] **Jarvis, R. M., Brooker A., and Goodacre, R.,** 2004. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface, *Anal. Chem.,* **76,** 5198-5202.

[334] **Goeller, L. J., and Riley, M. R.,** 2007. Discrimination of Bacteria and Bacteriophages by Raman Spectroscopy and Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Appl. Spectrosc.,* **61,** 679-685.

[335] **Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Eichler, J., and Efrima, S.,** 2004. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria, *Appl. Spectrosc.,* **58,** 33-40.

[336] **Sengupta, A., Mujacic, M., Davis, E. J.,** 2006. Detection of bacteria by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Bioanal. Chem.,* **386,** 1379-1386.

[337] **Kahraman M., Zamaleeva, A. I. Fakhrullin R. F., and Culha, M.,** 2009. Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering, *Anal. Bioanal. Chem.,* **395,** 2559-2567.

[338] **Culha, M., Adigüzel, A., Yazici, M M., Kahraman, M., Sahin, F.,and Güllüce, M.,** 2008. Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Appl. Spectrosc.,* **62,** 1226-1232.

[339] **Cam, D., Keseroglu, K., Kahraman, M., Sahin F., and Culha, M.,** 2010. Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectrosc.,* **41,** 484-489.

[340] **Kahraman, M., Yazici, M. M., Sahin, F., Bayrak, O. F., and Culha, M.,** 2007. Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silve Nanoparticles, *Appl. Spectrosc.,* **61,** 479-485.

[341] **Sayin, I., Kahraman, M., Sahin, F., Yurdakul, D., and Culha, M.,** 2009. Characterization of Yeast Species Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Appl. Spectrosc.,* **63,** 1276-1282.

[342] **Culha, M., Kahraman, M., Cam, D., Sayin, I., and Keseroglu, K.,** 2010. Rapid identification of bacteria and yeast using surface-enhanced Raman scattering, *Surf. Interface Anal.,* **42,** 462-465.

[343] **Willets, K. A.,** 2009. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) for probing internal cellular structure and dynamics, *Anal. Bioanal. Chem.,* **394,** 85-94.

[344] **Chourpa, I., Lei, F. H., Dubois, P., Manfaita, M., and Sockalingum, G. D.,** 2008. Intracellular applications of analytical SERS spectroscopy and multispectral imaging, *Chem. Soc. Rev.,* **37,** 993-1000.

[345] **Kneipp, J., Kneipp,H., Rajadurai,A., Redmonda, R. W. and Kneipp, K.,** 2009. Optical probing and imaging of live cells using SERS labels, *J. Raman Spectrosc.,* **40,** 1-5.

[346] **Tang, H.W., Yang, X. B., Kirkham, J., and Smith, D. A.,** 2007. Probing Intrinsic and Extrinsic Components in Single Osteosarcoma Cells by Near-Infrared Surface-Enhanced Raman Scattering, *Anal. Chem.,* **79,** 3646-3653.

[347] **Wang, Y., Li, D., Li, P., Wang, W., Ren, W., Dong, S., and Wang, E.,** 2007. Surface Enhanced Raman Scattering of Brilliant Green on Ag Nanoparticles and Applications in Living Cells as Optical Probes, *J. Phys. Chem. C,* **111,** 16833-16839.

[348] **Lee, S., Kim, S., Choo, J., Shin, S. Y., Lee, Y. H., Choi, H. Y., Ha, S., Kang, K., and Oh, C. H.,** Biological Imaging of HEK293 Cells Expressing PLC1 Using Surface-Enhanced Raman Microscopy, *Anal. Chem.,* **79,** 916-922.

[349] **Kneipp, Janina., Kneipp, H., McLaughlin, M., Brown, D., and Kneipp, K.,** 2006. In Vivo Molecular Probing of Cellular Compartments with Gold Nanoparticles and Nanoaggregates, *Nano Letters,* **6,** 2225-2231.

[350] **Ochsenkuhn, M., A., Jess, P. R. T., Stoquert, H., Dholakia, K., and Campbell, C. J.,** 2009. Nanoshells for Surface-Enhanced Raman Spectroscopy in Eukaryotic Cells: Cellular Response and Sensor Development, *ACS Nano,* **3,** 3613-3621.

[351] **Aydin, O., Kahraman, M., Kilic, E., and Culha, M.,** 2009. Surface-Enhanced Raman Scattering of Rat Tissues, *Appl Spectrosc.,* **63,** 662-6688.

[352] **Aydin, O., Altaş, M., Kahraman, M., Bayrak, O. F., and Culha, M.,** 2009. Differentiation of Healthy Brain Tissue and Tumors Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Appl. Spectrosc.,* **63,** 1095-1100.

[353] Malvern Instruments Ltd. Printed in England, 2008. *Zetasizer Nano User Manual.*

[354] ZetaSizer, Malvern, Uygulama notu: *Characterisation of protein melting point.*

[355] **Solomons, G., and Fryhle, C.,** 2008. *Organic Chemisty,* Wiley.

[356] **Decher, G.,** 1997. Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites, *Science,* **277,** 1232-1237.

[357] **Mulvaney, P.,** 1996. Surface Plasmon Spectroscopy of Nanosized Metal Particles, *Langmuir,* **12,** 788-800.

[358] **Denkov, N. D., Velev, O. D., Kralchevsky, P. A., Ivanov, I. B., Yoshimura, H., and Nagayama, K.,** 1992. Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles on substrates, *Langmuir,* **8,** 3183-3190.

[359] **Denkov, N. D., Velev, O. D., Kralchevsky, P. A., Ivanov, I. B., Yoshimura, H., and Nagayama, K.,** 1993. Two-dimensional crystallization, *Nature,* **361,** 26-26.

[360] **Prevo, B. G., and Velev, O. D.,** 2004. Controlled, Rapid Deposition of Structured Coatings from Micro- and Nanoparticle Suspensions, *Langmuir,* **20,** 2099-2107.

[361] **Prevo, B. G., Hwang, Y., and Velev, O. D.,** 2005. Convective Assembly of Antireflective Silica Coatings with Controlled Thickness and Refractive Index, *Chem. Mater.,* **17,** 3642-3651.

[362] **Canpean, V., Astilean, S., Petrisor Jr., T., Gabor, M., and Ciascai, I.,** 2009. Convective assembly of two-dimensional nanosphere lithographic masks, *Materials Letters,* **63,** 1834-1836.

[363] **Kuncicky, D. M., Christesen, S. D., and Velev, O. D.,** 2005. Role of the Micro- and Nanostructure in the Performance of Surface-Enhanced Raman Scattering Substrates Assembled from Gold Nanoparticles, *Appl. Spectrosc.,* **59,** 401-409.

[364] **Meng, L., Wei, H., Nagel, A., Wiley, B. J., Scriven, L. E., and Norris, D. J.,** 2006. The Role of Thickness Transitions in Convective Assembly, *Nano Letters,* **6,** 2249-2253.

[365] **Tessier, P. M., Velev, O. D. Kalambur, A. T., Rabolt, J. F., Lenhoff, A. M., and Kaler, E. W.,** 2000. Assembly of Gold Nanostructured Films Templated by Colloidal Crystals and Use in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.,* **122,** 9554-9555.

[366] **Kahraman, M., Yazici, M. M., Sahin, F., Bayrak, O. F., and Culha, M.,** 2007. Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles, *Appl Spectrosc.,* **61,** 479-485.

[367] **Kahraman, M., Yazici, M. M., Sahin, F., and Culha, M.,** 2008. Convective Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Langmuir*, **24,** 894-901.

ÖZGEÇMİŞ



Ad Soyad: Mehmet KAHRAMAN

Doğum Yeri ve Tarihi: Kahramanmaraş ve 29/09/1981

Adres: İstiklal Mah. 15. Sok. No: 13 Kahramanmaraş

Lisans Üniversite: Çukurova Üniversitesi

Yayın Listesi:

- Konnova, S. A., **Kahraman, M.,** Zamaleeva, I. A., Culha, M., Paunov, V. N., and Fakhrullin, R. F., 2011. Functional artificial free-standing yeast biofilms, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **88,** 656-663.
- Baysal, A., Akman, S., Demir, S., and **Kahraman, M.,** 2011. Slurry sampling electrothermal atomic absorption spectrometric determination of chromium after separation/enrichment by mercaptoundecanoic acid modified gold coated TiO_2 nanoparticles, *Microchemical Journal*, **99,** 421-424.
- Baysal, A., Saatci, A. D., **Kahraman, M.,** and Akman, S. 2011. FAAS slurry analysis of lead and copper ions preconcentrated on titanium dioxide nanoparticles coated with a silver shell and modified with cysteamine, *Microchimica Acta*, **173,** 495-502.
- **Kahraman, M.,** Keseroğlu, K., and Çulha, M., 2011. On sample preparation for surface-enhanced raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra, *Applied Spectroscopy*, **65,** 500-506.
- Çulha, M., **Kahraman, M.,** Karataş, O. F., and Aydın, O., 2011. Nanoplasmonics in Biosensing and Nanobiomedicine, Book Chapter *in Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, American Scientific Publishers, California USA, **18,** 289-305.
- Keskin, S., **Kahraman, M.,** and Çulha, M., 2011. Differential Separation of Protein Mixtures using Convective Assembly and Detection with Surface Enhance Raman Scattering, *Chemical Communications*, **47,** 3424-3426.
- Gunduz, S., Akman, S., and **Kahraman, M.,** 2011. Slurry analysis of cadmium and copper collected on 11-mercaptoundecanoic acid modified TiO_2 core-Au shell nanoparticles by flame atomic absorption spectrometry, *Journal of Hazardous Materials*, **186,** 212–217.
- **Kahraman, M.,** Sur, I., and Çulha, M., 2010. Label-Free Detection of Proteins from Self-Assembled Protein-Silver Nanoparticle Structures using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Analytical. Chemistry*, **82,** 7596–7602.

- Culha, M., **Kahraman, M.,** Çam, D., Sayın, İ., and Keseroğlu, K., 2010. Rapid Identification of Bacteria and Yeast Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Surface and Interface Analysis*, **42,** 462-465.
- Cam, D., Keseroglu, K., **Kahraman, M.,** Sahin, F., and Culha, M., 2010. Multiplex Identification of Bacteria in Bacterial Mixtures with Surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectroscopy*, **41,** 484-489.
- Gunduz, S., Akman, S., Baysal, A., and **Kahraman, M.,** 2010. The Use of Silver Nanoparticles as an Effective Modifier for the Determination of Arsenic and Antimony by Electrothermal Atomic Absorption Spectrometry, *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy*, **65,** 397-300.
- Abdullin, T. I., Bondar, O. V., Shtyrlin, Yu. G., **Kahraman, M.,** and Culha, M., 2010. Pluronic Block Copolymer-Mediated Interactions of Organic Compounds with Noble Metal Nanoparticles for SERS Analysis, *Langmuir,* **26,** 5153-5159.
- Sur, I., Cam, D., **Kahraman, M.,** Baysal, A., and Culha, M., 2010. Interaction of Multi-Functional Silver Nanoparticles with Living Cells, *Nanotechnology,* **21,** Art No: 175104.
- **Kahraman, M.,** Aydın, Ö., and Çulha, M., 2009. Oligonucleotide-Mediated Ag-Au Core-Shell Nanoparticles, *Plasmonics,* **4,** 293-301.
- Kahraman, M., Zamaleeva, A. I., Fakhrullin, R. F., and Culha, M. 2009. Layer-by-Layer Coating of Bacteria with Noble Metal Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Analytical and Bioanalytical Chemistry,* **395,** 2559-2567.
- Sayin, I., **Kahraman, M.,** Sahin, F., Yurdakul, D., and Culha, M., 2009. Characterization of Yeast Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Applied Spectroscopy*, **63,** 1276-1282.
- Baysal, A., **Kahraman, M.,** and Akman, S., 2009. The Solid Phase Extraction of Lead Using Silver Nanoparticles–Attached to Silica Gel Prior to its Determination by FAAS, *Current Analytical Chemistry,* **5,** 352-357.
- Aydın, Ö., Altaş, M., **Kahraman, M.,** Bayrak, Ö. F., and Çulha, M., 2009. Differentiation of Healthy Brain Tissue and Tumors Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Applied Spectroscopy,* **63,** 1095-1100.
- Aydın, Ö., **Kahraman, M.,** Kılıç, E., and Çulha, M., 2009. Surface-Enhanced Raman Scattering of Rat Tissues" *Applied Spectroscopy*, **63,** 662-668.
- Culha, M., Karatas, O. F., Aydin, O., **Kahraman, M.,** Keseroğlu, K., Sayin, I., and Bayrak, O. F., 2009. Towards PCR-free Mutation Detection Based on Surface-enhanced Raman Scattering, *Proc. SPIE* Vol. **7192,** 719205,
- Fakhrullin, R. F., Zamaleeva, A. I., Morozov, M. V., Tazetdinova, D. I., Alimova, F. K., Hilmutdinov, A. K., Zhdanov, R. I., **Kahraman, M.,** and Culha, M., 2009. Living Fungi Cells Encapsulated in Polyelectrolyte Shells Doped with Metal Nanoparticles, *Langmuir*, **25,** 4628-4634.
- **Kahraman, M.,** Aydın, Ö., and M. Çulha, 2009. Size Effect of 3D Aggregates Assembled from Silver Nanoparticles on Surface Enhanced Raman Scattering, *ChemPhysChem.*, 10, 537-542.

- Çulha, M., Adiguzel, A., Yazici, M. M., **Kahraman, M.,** Sahin, F., and Gulluce, M., 2008. Characterization of Thermophilic Bacteria Using Surface-enhanced Raman Scattering, *Applied Spectroscopy,* **62,** 1226-1232.
- Çulha, M., **Kahraman, M.,** Tokman, N., and Türkoğlu, G. 2008. Surface-enhanced Raman Scattering on Aggregates of Silver Nanoparticles with Definite Size, *Journal of Physical Chemistry C,* **112,** 10338-10343.
- **Kahraman, M.,** Tokman, N., and Çulha, M., 2008. Silver Nanoparticle Thin Films with Nanocavities for Surface-enhanced Raman Scattering, *ChemPhysChem.,* **9,** 902-910.
- **Kahraman, M.,** Yazıcı, M. M., Şahin, F., and Çulha. M., 2008. Convective-Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Langmuir,* **24,** 894-901.
- **Kahraman, M.,** Yazıcı, M. M., Şahin, F., and Çulha. M., 2007. Experimental Parameters Influencing Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacteria, *J. of Biomedical Optics,* **12,** 1-6.
- **Kahraman, M.,** Yazıcı, M. M., Şahin, F., Bayrak, Ö. F., Topçu, E., and Çulha, M., 2007. Towards Single Microorganism Detection Using Surface-Enhanced Spectroscopy, *Inter. J. Environ. Anal. Chem.,* **87,** 763-770.
- Culha, M., **Kahraman, M.,** Yazıcı, M. M., and Sahin. F., 2007. Utilizing Silver and Nanoparticles for Investigation of bacterial Cell Wall Biochemical Structure, 2007 NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show - NSTI Nanotech 2007, *Technical Proceedings,* **2,** 538-541.
- **Kahraman, M.,** Yazıcı, M. M., Şahin, F., Bayrak, Ö. F., and Çulha, M., 2007. Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles, *Applied Spectroscopy,* **61,** 479-485.