İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ Au NANOPARÇACIKLARIN TERSİNİR YÜZEY ETKİLEŞİMLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aylin GÜRSOYKONT

Anabilim Dalı : Kimya Mühendisliği

Programı : Kimya Mühendisliği

HAZİRAN 2009

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ Au NANOPARÇACIKLARIN TERSİNİR YÜZEY ETKİLEŞİMLERİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Aylin GÜRSOYKONT
(506061002)

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 04 Mayıs 2009
Tezin Savunulduğu Tarih : 04 Haziran 2009

Tez Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Ramazan KIZIL (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Birgül TANTEKİN ERSOLMAZ (İTÜ)
Yrd. Doç. Dr. Hüseyin YILMAZ (GYTE)

HAZİRAN 2009

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca yardımlarını ve desteğini benden esirgemeyen tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Ramazan KIZIL' a teşekkürlerimi ve saygılarımı sunarım.

Deneysel çalışmam süresince yardımlarını ve desteklerini esirgemeyen ITU Kimya Mühendisliği Bölümü öğrencileri Esin Gülşah BESTEL ve Arman YEŞİLKAYA'ya teşekkürlerimi sunarım.

UV ölçümlerinde bana yardımcı olan ITU Kimya Bölümü master öğrencisi Damla Ecevit'e ve ITU Kimya Bölümü öğretim üyesi Sayın Prof. Dr. Sezai Saraç'a teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca benden maddi, manevi desteğini esirgemeyen aileme ve arkadaşlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Mayıs 2009

Aylin GÜRSOYKONT

Kimya Mühendisi

İÇİNDEKİLER

Sayfa

KISALTMALAR ..... **vii**
ÇİZELGE LİSTESİ ..... **ix**
ŞEKİL LİSTESİ ..... **xi**
ÖZET ..... **xiii**
SUMMARY ..... **xv**
1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI **3**
2.1 Nanoteknoloji 3
2.2 Nanoteknolojik Araştırma Ve Uygulama Alanları 5
2.3 Au Nanoparçacıklar 7
2.3.1 Tarihçe 7
2.3.2 AuNP'lerin özellikleri 7
2.3.3 AuNP' leri hazırlama teknikleri 9
2.4 AuNP' lerin Yüzey Modifikasyon Teknikleri 10
2.4.1 Tek katman korumalı kümeler 10
2.4.2 Yer değişim reaksiyonları 12
2.4.3 Alkantiyollerin kimyasal bağlanması 12
2.5 AuNP'lerin Uygulamaları 14
2.5.1 Biyoalgılayıcılar (Biyosensörler) 14
2.5.2 Kolorimetrik assayler 15
2.6 Au Nanoteller 16
2.6.1 Au nanotellerin üretimi 16
2.6.2 Au nanotellerin uygulamaları 18
2.7 Biyotin Ve Streptavidin Etkileşimi 18
3. DENEYSEL ÇALIŞMA **21**
3.1 Deneysel Çalışmanın Amacı 21
3.2 Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar 21
3.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı 22
3.4 Deneyin Yürütülüşü 23
3.4.1 AuNP sentezi 23
3.4.2 AuNP'lerin yüzey modifikasyonu (AuNP-biyotin konjugatlarının elde edilmesi) 24
3.4.3 Au nanotellerin streptavidin ile kaplanması 26
3.4.4 Biyotinlenmiş AuNP'lerin streptavidin kaplı Au nanoteller ile etkileşimi 27
3.4.5 Biyotinlenmiş AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği 28
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA **29**
4.1 AuNP'lerin Yüzey Modifikasyonu 29
4.2 Biyotinlenmiş AuNP'lerin Streptavidin Kaplı Au-Nanoteller ile Tersinir Etkileşimi 34

4.3 Biyotinlenmiş AuNP'lerin Streptavidin ile Etkileşiminin Katı Yüzey Üzerindeki Tersinirliği 35
5. VARGILAR VE DEĞERLENDİRME 39
KAYNAKLAR..... 41
EKLER..... 47

KISALTMALAR

16-MHDA **:** 16-merkaptohegzadekanoik asit
AEE **:** 2-(2-aminoetoksi) etanol
AuNP **:** Altın nanoparçacık
BA **:** (+)-biyotinil-3,6,9-triokzaandekandiamin
DNA **:** Deoksiribonükleik asit
EDC **:** N-3-(dimetilaminopropil)-N′-etilkarbodiimit
NHS **:** N-hidroksisusinimit

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 3.1 : Kullanılan çözeltilerin bileşimleri 22

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Nanoteknolojiye yapılan yatırımlar 5
Şekil 2.2 : Tanecik boyutu ile değişen kolloidal altın çözeltisi renkleri 8
Şekil 2.3 : Tiyol ile fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacık 11
Şekil 2.4 : Tek katman korumalı kümeler hazırlamak için kullanılan tiyol molekülleri 11
Şekil 2.5 : Au nanoparçacıkların noniyonik yüzey aktif madde varlığında alkantiyoller ile modifikasyonu 13
Şekil 2.6 : Streptavidin 18
Şekil 2.7 : Streptavidin-biyotin etkileşimi 19
Şekil 3.1 : Deneysel çalışmanın akış şeması 21
Şekil 3.2 : Sitrat indirgeme yöntemi ile Au nanoparçacık sentezlenmesi sırasındaki renk değişimi 23
Şekil 3.3 : 16-Merkaptohekzadekanoik asit 24
Şekil 3.4 : AuNP üzerine karboksil grubu ile sonlanan alkan tiyolün (16-MHDA) kimyasal olarak tutunması 24
Şekil 3.5 : AuNP'lerin biyotin ile fonksiyonel hale getirilmesi 26
Şekil 3.6 : Au nanotellerin streptavidin ile kaplanması 27
Şekil 3.7 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin, Au-nanotel üzerine kaplanmış streptavidin ile bağlanması 27
Şekil 3.8 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği 28
Şekil 4.1 : Çıplak AuNP absorbans-dalga boyu grafiği 29
Şekil 4.2 : AuNP'lerin 16-MHDA ile modifikasyonu 30
Şekil 4.3 : AuNP'lerin pH 7' de 16-MHDA ile modifikasyonu 31
Şekil 4.4 : 16-MHDA ile modifiye edilmiş AuNP' lerin NHS ve EDC ile reaksiyonu 32
Şekil 4.5 : 16-MHDA ile modifiye edilmiş altın nanoparçacıkların NHS ve EDC ile reaksiyonu 33
Şekil 4.6 : Amin reaktif NHS esterlerinin BA ve AEE ile reaksiyonu 33
Şekil 4.7 : AuNP'lere BA ve AEE eklenmesi 34
Şekil 4.8 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin kaplı Au-nanoteller ile etkileşimi ... 35
Şekil 4.9 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin kaplı Au-nanoteller ile etkileşimi. .. 35
Şekil 4.10 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği 36
Şekil 4.11 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği 36

FONKSİYONALİZE EDİLMİŞ Au NANOPARÇACIKLARIN TERSİNİR YÜZEY ETKİLEŞİMLERİ

ÖZET

Nanometre ölçeğindeki materyallerin, şekil ve boyutlarına bağlı olarak son derece farklı optik ve elektronik özellikler sergilediği bulunmuştur. Bu malzemeler arasında özellikle soy metal nanoparçacıklar oldukça ilgi çekmektedirler.

Au nanoparçacıklar (AuNP), sahip oldukları benzersiz optik ve elektronik özellikleri dolayısıyla birçok farklı uygulamada kullanmaktadır. Bu uygulamaların başında; DNA tanısı için kolorimetrik denemeler, biyosensörler ve nanoparçacık tabanlı biyoanaliz gelmektedir. Au nanoparçacıkların, nanoboyutta sahip oldukları özelliklerinden daha etkili bir şekilde yararlanmak için Au nanoparçacıkların yüzeyleri modifiye edilmektedir.

Bu çalışmada fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıkların katı yüzey üzerine bağlanıp sökülebileceği gösterilmiştir. Fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıkların katı yüzey üzerine bağlanıp sökülebileceğini göstermek için öncelikle Au nanoparçacıklar Turkevitch yöntemi ile sentezlenmiş ardından nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu noniyonik bir yüzey aktif madde varlığında karboksil sonlu alkantiyollerin kimyasal olarak bağlanması ile gerçekleştirilmiştir. Daha sonra karboksil grupları; biyotinil-3,6,9,-trioksaandekandiamin ve 2-(2-aminoetoksi) etanol ile reaksiyona sokularak, biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklar elde edilmiştir. Bu aşamada Au nanoteller streptavidin ile kaplanmış, daha sonra streptavidin- biyotin spesifik moleküler ilişkisi kullanılarak katı yüzey üzerinde biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklarla etkileşimleri incelenmiştir. Bu etkileşimin katı yüzey üzerinde tersinirliğini gözlemlemek için ortama serbest biyotin eklenmiştir. Au nanoparçacık-biyotin konjuge sistemleri 400-700 nm aralığında absorbans ölçümleri ile karakterize edilmiş ve tersinir agregasyon ise alan emisyon taramalı elektron mikroskobu kullanılarak görüntülenmiştir.

Sonuçlar, biyotin-streptavidin etkileşimi sayesinde Au-nanotellerin üzerine bağlanan Au nanoparçacıkların, ortama serbest biyotin eklenmesi ile tersinir hale getirilebileceği gösterilmiştir. Bu çalışmayla biyotin ile fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıkların katı yüzey üzerinde tersinir etkileşimleri literatürde ilk kez gösterilmiştir.

REVERSIBLE SURFACE INTERACTIONS OF FUNCTIONALIZED GOLD NANOPARTICLES

SUMMARY

It has been proved that nanometer-scaled materials, such as Au-nanoparticles, exhibit unique optical and electrical properties. These properties are often size and shape dependent. Among these materials, especially noble metal nanoparticles are of great attention to scientists.

Au-nanoparticles are being employed to nano-sensing and nano-device manufacturing owing to their unique optical and electronic properties. Examples include colorimetric assays for detection of DNA, nanoparticle-based bioanalysis and nanoelectronic devices.Gold nanoparticles have unique optical and electronic properties. These properties make gold nanoparticles suitable for various applications such as colorimetric assays for detection of DNA, biosensors and nanoparticle-based bioanalysis and nanoelectronic devices. In order to fully take advantage of the unique properties of Au-nanoparticles, it is necessary to impart them with different surface functionalities.

In this study we demonstrate reversible agregation of gold nanoparticles on solid surfaces. Firstly, gold nanoparticles were synthesized by Turkevitch' s method. Then, carboxyl-terminated alkanethiol was chemisorbed onto the surface of Au nanoparticles in the presence of a nonionic surfactant. Subsequently, the carboxyl groups were reacted with biotinyl-3,6,9,-trioxaundecanediamine and 2-(2-aminoethoxy)ethanol. Thus, biotinylated Au nanoparticles were produced. After functionalization of Au-nanoparticles with biotin, Au nanowires were covered with a protein called streptavidin. Then, specific biomolecular interaction between streptavidin and biotin is used for investigation of Au-nanoparticle – Au nanowire assembly. Reversibility of the aggregation between nanoparticles and nanowires was studied by adding free biotin to the medium. Au nanoparticle and biotin conjugated system was characterized by using UV-vis spectrophotometer in the 400-700 nm range. Reversible interaction of biotin functionalized Au-nanoparticle was monitored by field emission scanning electron microscopy.

Results show that Au nanoparticles bound on Au-nanowire by means of biotin-streptavidin interaction can be made reversible by addition of free biotin, enabling competition chemistry. Results show fort he first time the reversible interaction of biotin functionalized Au nanoparticles on any solid surfaces.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Nanoteknoloji son yıllarda oldukça önemli bir terim haline gelmiştir ve nanoteknoloji ile yapılabilecek yenilikler, değişiklikler anlaşıldıkça, nanoteknolojinin önümüzdeki yıllarda yeni nesil teknoloji olarak bir teknoloji devrimi yaratacağı düşünülmektedir [1].

Soy metal nanoparçacıklar, özellikle Au nanoparçacıklar, sahip oldukları benzersiz optik, elektronik ve termal özellikleri ve bu özellikleri sayesinde fizik, kimya, biyoloji, tıp ve malzeme bilimi gibi çeşitli dallarda potansiyel uygulamalara sahip olması dolayısıyla son derece ilgi görmektedir [2]. Au nanoparçacıklar, elektron mikroskoplarında kontrast ajanları olarak [3], DNA tanısı için kolorimetrik denemelerde [4,5], biyosensörlerde (biyoalgılayıcı) [6,7] ve katalizde [8] kullanılmaktadır. Bu nanoparçacıkların kullanımının hızlı bir şekilde yaygınlaştığı bir diğer alan da biyoteknolojidir. Biyoteknolojide, nanoparçacıklar ve biyolojik moleküller birleştirilerek nanoparçacık-biyomolekül konjugatları hazırlanabilmekte ve nanoparçacıkların optik özelliklerinden ve spesifik moleküler tanıma yeteneklerinden faydalanılmaktadır [8]. Nanoparçacık-biyomolekül konjugatları biyoalgılama (biosensing) [9,10,11], nanoparçacık tabanlı biyoanaliz [12] ve DNA hibritleşmesinde [4] yaygın olarak kullanılmaktadır.

Au nanoparçacıkların nanoboyutta sahip oldukları benzersiz özelliklerinden daha etkili bir şekilde yararlanmak için Au nanoparçacıklar fonksiyonel hale getirilmektedirler. Au nanoparçacıkların fonksiyonel hale getirilmeleri için iki temel yaklaşım kullanılmaktadır. Bu yaklaşımlardan ilki; tiyollerin nanoparçacıkların yüzeyine, Au-S kovalent bağı ile, kimyasal olarak bağlanması sonucu yüzey modifikasyonunun gerçekleştirilmesidir. Diğeri ise organik tek-katmanlı kolloidal metallerin tek adım prosedürü ile, yani Au tuzlarının indirgenmesi ve kendiliğinden düzenlenen katmanların oluşumunun eş zamanlı olarak gerçekleşmesi ile, sentezlenmesidir [13]. Altın nanoparçacıkların yüzey kompozisyonları, kendiliğinden düzenlenebilen katmanlar (self-assembled monolayers (SAMs)) kullanılarak birçok

fonksiyonel grup ve hatta fonksiyonel grupların karışımları ile modifiye edilebilmektedir [14,15].

Fonksiyonel hale getirilmiş Au nanopartiküller / nanoparçacıklarla yapılan çalışmalarda agregasyonun kontrolü üzerine yoğun olarak çalışılmış ancak bu çalışmaların büyük çoğunluğu tersinir olmayan agregasyonu incelemiştir. Literatürde çok az tersinir agregasyon çalışmaları yer almaktadır [16]. Aslında, biyotin bağlanmış Au nanoparçacıkların agregasyonunun tersinirliği henüz tam olarak ispatlanmamıştır [17]. Tersinir agregasyon, yüzeye tutunan moleküllerin ayrılmasına ve tekrar bağlanmasına olanak tanıyarak, biyosensör teknolojisinde ve yarışmalı ayrılma denemelerinde son derece yararlı olacaktır.

Tersinir agregasyonu göstermek için iki metod kullanılmaktadır. Bunlardan ilki; sıcaklığın değiştirilmesi ile termal denatürasyona ya da aşılanmış (grafted) polimerin hidrofilik-hidrofobik faz geçişine sebep olarak kolloidal agregasyonun kontrol edilmesidir [5,18-20]. Bir diğeri ise; bir kimyasal ajan eklenerek parçacıklar arasındaki bağın kimyasal olarak ayrılmasına ya da çözeltinin pH ve /veya iyonik gücünün değişmesine sebep olmaktır [21]. Örneğin, Aslan ve arkadaşları (2004) biyotin bağlanmış Au nanoparçacıkların çözelti içerisinde streptavidin ile agregasyonunun çözünür biyotin eklenerek tersine çevrilebileceğini göstermiştir [22].

Bu çalışmanın amacı; fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıkların katı yüzeylerde tersinir etkileşimde bulunabileceklerini göstermektir. Bunun için; ilk olarak Au nanoparçacıklar sentezlenmiş, ardından sentezlenen bu nanoparçacıklar uygun kimya teknikleri ile işlenmiş ve biyotin molekülü ile fonksiyonel hale getirilmiştir. Biyotin ile fonksiyonel hale getirilen Au nanoparçacıkların katı yüzey üzerindeki tersinir agregasyonu, streptavidin-biyotin moleküler etkileşimi kullanılarak incelenmiştir. Altın nanoparçacık - biyotin konjuge sistemleri absorbans ölçümleri ile karakterize edilmiş ve tersinir agregasyon ise alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (field emission scanning electron microscope) kullanılarak görüntülenmiştir. Bu çalışmada amaçlanan; streptavidin-biyotin etkileşimine dayanan nanoparçacık agregasyonu temelli kolay, hızlı ve ucuz tanı sistemleri geliştirilebileceğinin gösterilmesidir.

2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

2.1 Nanoteknoloji

Yunancada cüce anlamına gelen " nano " bir fiziksel büyüklüğün bir milyarda biridir. Nanoteknoloji ise atomik ya da moleküler boyutta özel teknik ve yöntemlerle yapıların ve materyallerin inşa edilmesi, fonksiyonel hale getirilmesi ve bu ölçeğin temel özelliklerinden yararlanılması olarak açıklanmaktadır [1].

Nanoteknoloji; fizik, kimya, biyoloji ve mühendislik gibi disiplinler arası bir konuma sahip olmasının yanı sıra, endüstri, uzay, ilaç, elektronik, tarım ve sağlık gibi bütün alanlara potansiyel etkileri bulunmaktadır. Bu nedenle birçok gelişmiş ülke tarafından, en kritik araştırma alanı olarak desteklenmektedir.

Çoğu bilim insanı tarafından nanoteknoloji 21. yüzyılın teknolojisi olarak kabul edilse de bu alandaki çalışmalar çok eskilere dayanmaktadır. 100 yıl önce sanatçılar tarafından geliştirilen ve kullanılan çok ince ve dayanıklı boyaların, özel renkli camların üretimi aslında nanoteknolojinin ilk uygulamalarıdır.

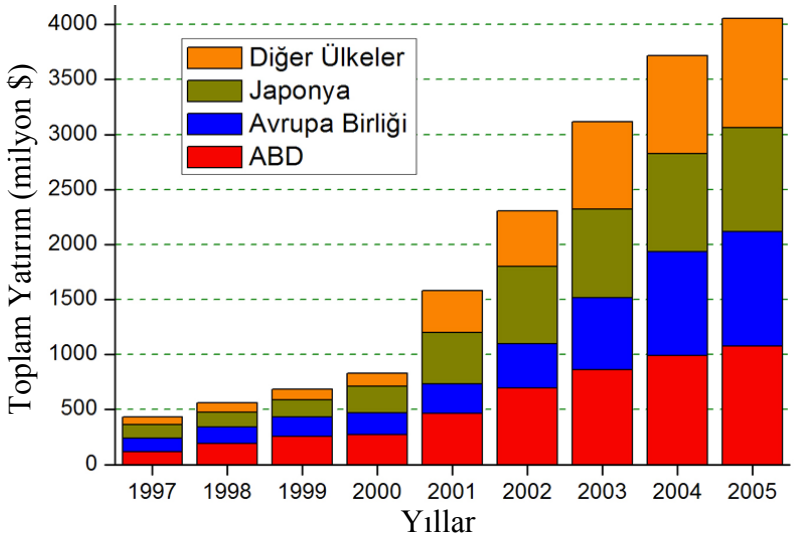
Nanoteknoloji kelimesini ilk defa kullanan Tokyo Bilim Üniversitesi'nden Norio Taniguchi olmuştur. 1974'de yayınlanan bir makalede Taniguchi'nin nanoteknoloji tanımı şöyledir: ‘Nano-teknoloji genel olarak malzemelerin atom atom ya da molekül molekül işlenmesi, ayrılması, birleştirilmesi ve bozulmasıdır’ [23]. Nanoteknoloji bir terim olarak ortaya çıkmadan önce fikir olarak dile getirilmiştir. Nanoteknolojinin ortaya çıkışı 1959 yılında ünlü fizikçi Richard Feynman’ın atomların ve moleküllerin, moleküler boyutlarda yeni malzeme ve cihazların üretilmesi ile kontrol edilebileceğini vurguladığı ‘There is a Plenty of Room at the Bottom’ adlı ünlü konuşmasına dayandırılmaktadır [24]. Ancak nanoteknoloji alanında yapılan ilk araştırmaların moleküler boyuttaki robotların üretimi ile başladığı kabul edilmektedir [25]. Nanoteknolojinin gelişmesini sağlayan buluş ise Tarama Tünelleme Mikroskobu'nun keşfedilmesidir. 2000 yılında ABD'nin nanoteknolojiye yatırım yapması sonucu Dünya'nın birçok ülkesinde nanoteknoloji araştırmaları başlamıştır.

Türkiye'de son yıllarda nanoteknolojiyi araştırmak ve geliştirmek için önemli adımlar atılmaya başlanmıştır. Nanoteknoloji, Tübitak'ın 2023 Vizyon Programı'nda öncelikli alanlardan biri olarak değerlendirilmiştir [26]. Ülkemizde nanoteknoloji için atılan en önemli adımlardan biri Ulusal Nanoteknoloji Araştırma Merkezi'nin (UNAM) kurulmasıdır. Bu merkezin amacı Türkiye'de nanoteknoloji hakkında yapılan araştırmaların hızlanmasını ve artmasını sağlamaktır. Devlet Planlama Teşkilatı (DPT) tarafından 28 milyon YTL yatırım yapılan merkez son derece modern aletlerle donatılmıştır [26]. Ayrıca TÜBİTAK MAM gibi merkezlerde ve üniversitelerde nanoteknoloji araştırmaları yapılmaktadır.

Avrupa Birliği ülkelerinde 2002-2006 yıllarını kapsayacak şekilde yürütülen 6. Çerçeve Programında nanoteknoloji öncelikli alan olarak yer almış ve bu alanda yürütülecek çalışmaları desteklemek üzere 1.3 milyar euro bütçe ayrılmıştır [27]. Ayrıca Avrupa Birliği ülkelerinin bir çoğunda nanoteknoloji alanında gerçekleştirilen araştırma ve geliştirme çalışmalarını destekleyen ulusal programlar da bulunmaktadır.

Amerika Birleşik Devletleri'nde ise 1999 yılında yayınlanan ulusal nanoteknoloji bildirgesi ile ülkenin nanoteknoloji alanındaki öncelikleri belirlenmiş ve bu konuda yapılan Ar-Ge çalışmaları için bütçeler ayrılmıştır. 2000 yılında nanoteknoloji alanında yapılan Ar-Ge çalışmalarına hükümet tarafından sağlanan destek 420 milyon dolar civarında iken 2001 yılı bütçesinde bu alana ayrılan pay yaklaşık 520 milyon dolara ulaşmış, 2003 yılı için ise yaklaşık 700 milyon dolar olarak belirlenmiştir. 2005 yılından başlayarak ise 4 yıl süreyle nanoteknoloji alanında gerçekleştirilen araştırma ve geliştirme projelerinde kullanılmak üzere 3.7 milyar dolar tutarında fon ayrılması onaylanmıştır [27].

Amerika Birleşik Devletleri'nden sonra nanoteknoloji alanında en fazla Ar-Ge harcaması yapan ülkelerden bir diğeri ise Japonya'dır. Japonya'da nanoteknoloji üzerine yapılmakta olan yatırım her yıl %15 ile %20 oranında artmaktadır [27].



Şekil 2.1 : Nanoteknolojiye yapılan yatırımlar [28]

2.2 Nanoteknolojik Araştırma Ve Uygulama Alanları

Nanoteknolojik araştırmalar:

- Nano ölçekteki yapıların analizi,
- Nano boyuttaki yapıların fiziksel özelliklerinin araştırılması ve anlaşılması,
- Nano ölçekli malzemenin üretimi,
- Nano duyarlıkta aletlerin geliştirilmesi,
- Nanoskopik ve makroskopik dünya arasında bağ kurulmasına yardımcı olacak yöntemlerin bulunup geliştirilmesi gibi konuları kapsar [25].

Nanoteknoloji elektronik ve yarı iletken teknolojisinden, biyosensörlere, nanotüplerden nanotanecik sistemlerine, katalizörlerden akıllı moleküllere, yüzey kaplamalardan, nanoboyutta boyamalara, mikro cerrahiden nano robotlara kadar bir çok alanda kullanım alanı bulmuştur. Başlıca uygulamalarını üç alanda toplayabiliriz [25]. Bunlar:

1-Endüstriyel Alan: Mikromakineler, mikropompalar, mikrosensörler geliştirme, opto-elektronik elemanların imali, bir araya getirilmesi, nano boyutlu kaplamalar, tek katmanlı katalizörlerle tepkimelerin kontrolü, nano boyutlu elemanlar arası bağlantılar, çip ve CD üretimi.

2-Tıp ve Sağlık Alanı: Mikro-nano cerrahi(özellikle göz ve beyin cerrahisi), tanısal kitler, hücre, doku ve moleküler (DNA gibi) hasar belirlenmesi ve onarımı,

biyosensörler, floresans ve fosforesans nanotanecik sistemleri içeren yarı iletken maddeleri kullanarak antikor ve DNA dedektörleri gelişimi, bu sistemleri kullanarak kan örneklerinde birçok patojenik ve hasarlı yapıların aynı anda ve paralel belirlenmesi,

3- Bilimsel Araştırmalar: Yüzey karekterizasyonu ve modifikasyonu, yüzey işlemleri, nano litografi, akıllı moleküllerin geliştirilmesi, atom ve moleküllerin istenilen yer taşınması veya önce ayrılarak sonra tekrar birleştirilmesi, mikroorganizmaların taşınması, DNA-modifikasyonu, nanoteknolojinin yeni kullanım alanlarının araştırılmasıdır.

Nanoteknolojinin günümüzdeki uygulama örnekleri [25];

1-Karbon nanotüp ve nano litografi,

2-Karbon lifler üreterek hidrojen bataryası olarak kullanma,

3-Nano kütüphaneler,

4-Veri bilgi depolama (Noval data storage system),

5- Hücre onarım robotları (Cell repair units),

6- Nano robot ve nano ölçekli ilaç taşıyıcıların yapımı,

7- Nanocerrahi,

8- Plastik şişelerin tek katmanlı silisyum dioksitle kaplayarak cam ve plastiğin üstün özelliklerinin birleştirilmesi,

9- Polietilen üretiminde zincir yapısı değişimi ile çelikten sağlam taşıyıcı halat üretimi,

10- Elektronik devrelerin imali,

11- Tekstilde nanoteknoloji uygulaması ile nanometre kalınlıkta liflerden, özellikle karbon liflerden kumaş hazırlanması, kumaşların tek katmanlı bir madde ile kaplanarak su tutmayan ve yanmayan ama esnekliğini koruyan kumaş üretimi.

12- Nano partiküllerden boya hazırlayarak çizilmez ve dayanıklı yüzey boyamaları ve yüzey işlemleri,

13- Nano boyutta organometalik katalizörlerle yüzeyin kaplanması ve yüzey tepkimelerinin kontrolüdür.

2.3 Au Nanoparçacıklar (AuNP)

Altın, insanlık tarihinin ilk zamanlarından beri ilgi çeken oldukça etkileyici bir elementtir. Geçtiğimiz son yirmi yıldan itibaren ise; nanoteknoloji ve nanobilimin gelişip, 1-100 nm ölçeğindeki materyallerin gösterdiği benzersiz özelliklerin farkedilmesiyle altına olan ilgi iyice artmıştır [29]. Altın yüzyıllardır bilinmesine ve kullanılmasına rağmen, günümüzde bu materyalin kullanımı, özelliklerinin araştırılması ve yeni uygulamaların geliştirilmesi ile ilgili yapılan çalışmalar hızla ilerlemektedir.

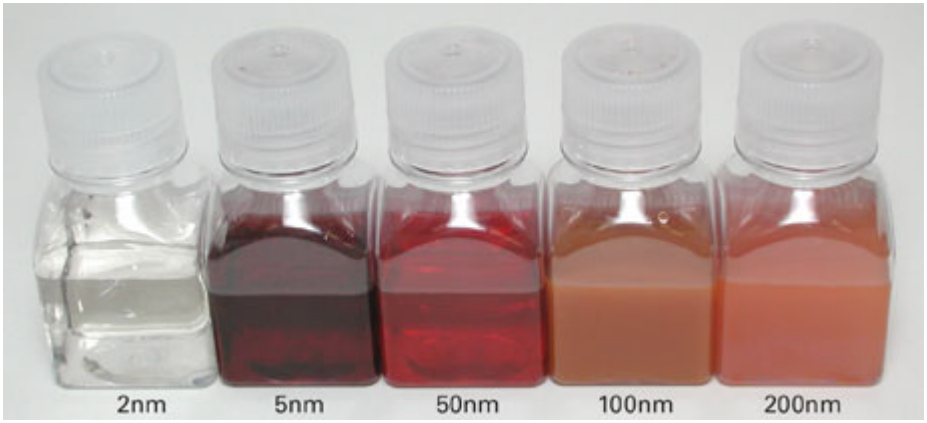
2.3.1 Tarihçe

Au nanoparçacıklar ya da diğer bir ismiyle kolloidal altının kullanımına tarih boyunca rastlanılmaktadır. Kolloidal altın; kırmızı renk cam yapımında ve seramiğin renklendirilmesinde kullanılmıştır ve günümüzde de hala kullanılmaya devam etmektedir [14]. Au nanoparçacıkların bu amaçla kullanımına verilebilecek en ünlü örnek ise Lycurgus Kupası'dır [30,31]. Opak yeşil renkteki bu kupa, yapısındaki kolloidal altın varlığından dolayı ışığa tutulduğunda kırmızı renk almaktadır. 1618 yılında filozof ve doktor Francisci Antonii tarafından yazılan kitabın kolloidal altın hakkında yazılan ilk kitap olduğu düşünülmektedir. Bu kitapta, kolloidal altın çözeltilerinin epilepsi, dizanteri, zührevi hastalıklar ve kalp gibi çeşitli hastalıklarda kullanımından bahsedilmektedir [14].

Au nanoparçacıkların sentezi ve karakteristik özelliklerinin analizi için yapılan ilk sistematik ve ayrıntılı çalışma ise; Michael Faraday'ın kolloidal çözeltilerin renklerinin, parçacıkların küçük boyutları ile ilgili olduğunu açıkladığı çalışma [32] olarak kabul edilebilir. Faraday' ın yaptığı bu çalışma nitel (kalitatif) bir çalışma olmasına rağmen; metalik nanoparçacıkların renklerinin kaynağı konusunda daha ayrıntılı teorilerin araştırılmasına ve çeşitli uygulamalarda Au nanoparçacıklarının kullanılmasına önderlik etmiştir [33].

2.3.2 AuNP'lerin özellikleri

Au nanoparçacıklar en kararlı metal nanoparçacıklarıdır. Kolloidal altın yada Au nanoparçacıklar, altının sudaki çözeltisinde mikrometreden daha küçük boyutlu parçacıkların askıda kalmasıyla meydana gelmektedir. Au nanoparçacıklar farklı renk, boyut ve şekillerde bulunabilirler.



Şekil 2.2 : Tanecik boyutu ile değişen kolloidal altın çözeltisi renkleri [34]

Au nanoparçacıkların, renkleri parçacık büyüklükleri ile alakalıdır [32]. Örneğin; 100nm' den daha küçük tanecik boyutuna sahip Au nanoparçacıklar kırmızı renk ve tonlarına sahipken; tanecik boyutu 100 nm ve üstünde olan çözeltiler Au parçacık boyutu nedeniyle farklı renklerde görünmektedir. Bu durum Au nanoparçacıkların yüzey elektronlarının (yüzey plazmonlarının) toplu osilasyonları (titreşimi) ile bağlantılıdır [14,35]. Görünen ışık Au nanoparçacıkların üzerine geldiğinde ışığın rezonant dalga boyu Au nanoparçacıklar tarafından tutulur ve yüzey elektronlarının osilasyonuna sebep olur. Küçük Au nanoparçacıklar (yaklaşık 13 nm çapında) yeşil ışığı tutarlar ve bu da görünen ışık spektrumunda yaklaşık 520 nm'de yüzey plazmon bandına karşılık gelir, böylece Au nanoparçacıklar kırmızı renkte görünürler [35]. Küçük Au nanoparçacıklarda yüzey elektronları gelen ışıkla dipol modda titreşirler. Nanoparçacıkların boyutları arttıkça, gelen ışık nanoparçacıkları homojen olarak polarize edemez. Bu durum yüzey plazmon bandının kırmızıya kaymasına ve genişlemesine sebep olur [14].

Au nanoparçacıklar; yüksek serbest elektron yoğunlukları dolayısıyla elektron mikroskopisini de içeren çok geniş uygulama alanına sahiptir. Metalik nanoparçacıkların sahip olduğu bu serbest elektronlar, nanoparçacıklara benzersiz optik özellikler kazandırmaktadır [3,36,37]. Bu nanoparçacıklar görünür ışık bölgesinde güçlü bir absorpsiyon bandı sergilerler, ve bu durum gelen ışıkla elektronların (yada yüzey plazmonların) toplu osilasyonuna (titreşimine) sebep olur, bu olay yüzey plazmon rezonansı (localized surface plasmon resonance (LSPR)) olarak bilinmektedir [33].

2.3.3 AuNP' leri hazırlama teknikleri

Kontrollü ve tekrar edilebilir özelliklere sahip Au nanoparçacıkları üretecek, yinelenebilir metotların geliştirilmesi, altın nanoparçacıkların malzeme bilimi ve hücre biyolojisi gibi çeşitli alanlarda uygulama bulmalarını mümkün kılmıştır [3,36,37].

Metalik nanoparçacıklar; kimyasal [3,36,37], radyolitik [38,39] ve fotolitik reaksiyonlar [40,41] gibi çeşitli yöntemler kullanılarak sentezlenebilir. İndirgeyici kimyasal ajanlar ekleyerek metal tuzlarının indirgenmesi nanoparçacıkların sulu çözeltilerini hazırlamak için kullanılan en eski prosedürdür [29]. Au nanoparçacıkların sentezi için birçok farklı indirgeyici ajan kullanılmaktadır. Bu ajanlardan en çok kullanılanlar; sodyum sitrat [42,43], tannik asit [3,37], hidrazin [44], hidrojen [45,46], karbon monoksit [47] olarak sıralanabilir. Ayrıca; alkoller [48,49] ve eterler [49,50] de metalik nanoparçacıkların sentezinde indirgeciyi çözücü olarak kullanılmaktadır.

1951 yılında Turkevich ve arkadaşları, altın çözeltilerinin hazırlanması için ilk güvenilir prosedürü ortaya koymuştur ve bu metot tetrakloroaurik asitin ($HAuCl_4$), sodyum sitrat ile indirgenmesine dayanmaktadır [51].

Au nanoparçacıkların sentezi için kullanılan diğer yaklaşımlardan biri iki fazlı sentez sistemi olup ilk Faraday tarafından ortaya konulmuştur [32]. Sulu altın tuzu karbon disülfit içinde fosfor buharı ile indirgenir [32]. Daha sonra Brust ve diğ. (1994), bu iki fazlı yaklaşımı daha yeni tekniklerle birleştirerek; Au parçacık üzerine alkantiyollerin kendiliğinden düzenlenebilen katmanlarının (SAMs) oluşturulmasını sağlayıp Au nanoparçacıkları elde etmek için tek adım yöntemini geliştirmiştir [52,53]. Bu teknikte, Au tuzlarının indirgenmesi ve kendiliğinden düzenlenebilen katmanların şekillenmesi eş zamanlı olarak gerçekleşmektedir. Redoks reaksiyonları uygun bir indirgeyici ve faz transfer ajanı seçilerek gerçekleştirilmektedir. Orijinal prosedürde, kloroauratın sulu çözeltisi, faz transfer ajanı olan toluen içindeki tetraoktil amonyum bromür çözeltisi ile karıştırılmış ardından oluşan karışım; bütün tetrakloroaurat organik tabakaya geçene kadar kuvvetli bir şekilde karıştırılmıştır. Daha sonra alkantiyol, indirgeyici ajanın ardından organik faza eklenmiştir. İndirgeyici ajan olarak dodekantiyol içindeki sodyum borhidrür kullanılmıştır. Böylece kendiliğinden düzenlenebilen katmanlarla korunmuş ve bu katmanlar

sayesinde yüzeydeki fonksiyonel gruba bağlı olarak farklı özelliklere sahip kararlı Au nanoparçacıklar elde edilmiştir [52,53].

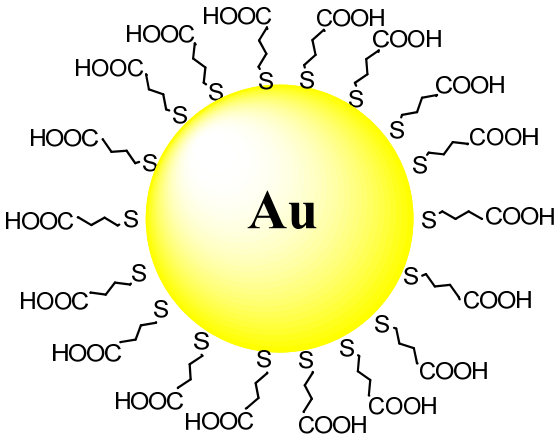
2.4 AuNP' lerin Yüzey Modifikasyon Teknikleri

Au nanoparçacıkların sahip olduğu benzersiz optik ve elektronik özelliklerden tam olarak yararlanabilmek için, bu nanoparçacıklara farklı yüzey özellikleri eklemek gerekmektedir. Ancak nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu sırasında, bu nanoparçacıkların kararlılıklarını korumak son derece önemlidir [29]. Au nanoparçacıkların yüzeylerinin kimyasal modifikasyonu; alkantiyoller, polimerler, dendrimerler kullanılarak gerçekleştirilebilir [29]. Yüzey modifikasyonu için mevcut olan kolloidal altının yüzeyi modifiye edilebilir ya da tek adım metodu ile organik tek katmanlı altın nanoparçacıklar sentezlenebilir.

2.4.1 Tek katman korumalı kümeler

Alkantiyollerin altın yüzeyler üzerine kimyasal olarak bağlanması, yüzey üzerinde düzgün kimya oluşturulması için kolay bir yöntemdir. Bu sebeple alkantiyoller kullanılarak yapılan yüzey modifikasyonu, nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu için mantıklı bir seçimdir. Bu yöntem geçtiğimiz 20 yıldan bu yana geniş olarak araştırılan bir konudur [54,55]. Ancak, alkantiyollerin kimyasal tutunması kolloidal altın üzerindeki yükleri yok edip, karasız hale gelmesine ve böylece tersinmez topaklaşmaya sebep olabilmektedir [56].

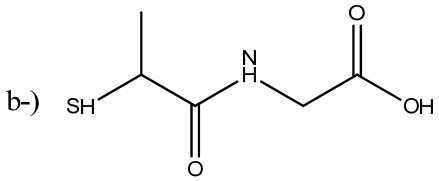
Tiyol ile fonksiyonel hale getirilmiş kararlı Au nanoparçacıkları tek adım prosedürü ile sentezlemek mümkündür. Bunu sağlamak için daha önceden de bahsedildiği gibi Brust ve diğ. (1994) tarafından ortaya konan metot [52,53] kullanılmaktadır. Bu metot ile organik tek katman tarafından korunan nanoparçacıklar elde edilir ve bu parçacıklar genellikle tek katman korumalı kümeler olarak adlandırılırlar.

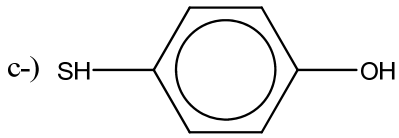


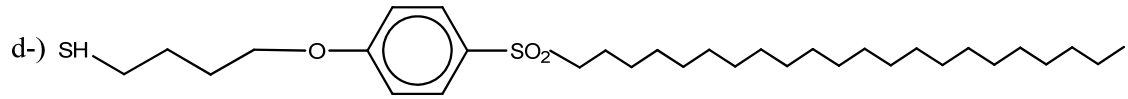
Şekil 2.3 : Tiyol ile fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacık

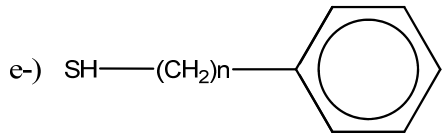
Alkantiyol molekülleri, nanoparçacıkları koruyarak; kimyasal algılama, kataliz, biyoalgılama gibi yeni teknoloji uygulamalarının geliştirilmesine olanak tanır [57]. Düz zincirli alkantiyoller [57], tiyopronin [58], p- merkaptofenol [59], aromatik alkantiyol [53], fenil alkantiyoller [60] gibi birçok tiyol molekülü tek katman korumalı kümeleri hazırlamak için kullanılabilir.

a-) $SH-(CH2)_n-CH_3$ (n= 3- 23)









(n=2 yada 4)

Şekil 2.4 : Tek katman korumalı kümeler hazırlamak için kullanılan tiyol molekülleri

a-) Düz zincirli alkantiyoller, b-) tiyopronin, c-) p- merkaptofenol, d-) aromatik alkantiyol, e-) fenil alkantiyoller

2.4.2 Yer değişim reaksiyonları

Alkantiyoller ile birleştirilmiş birçok nanoparçacık bulunmasına rağmen daha farklı yüzey özellikleri elde etmek için yüzeylere farklı kimyasal gruplar da eklenebilmektedir. Bunun için uygulanan metotlardan birisi yer değişim reaksiyonlarıdır ve bu yöntem birçok grup tarafından kullanılmaktadır [57,61]. Murray ve diğ. (1999) tek katman korumalı kümelerin yer değiştirme reaksiyonu ile üretimi için birçok çalışma yapmıştır [57,60]. Buna göre; tek katman korumalı kümelerin alkantiyollerinin, diğer alkantiyollerin kimyasal tutunması sonucu yer değiştirmesi için, tek katman korumalı kümeler alkantiyol çözeltisinde bir müddet bekletilir [29]. Yer değiştirme reaksiyonu boyunca alkantiyoller ile fonksiyonel hale getirilmiş tek katman korumalı kümeler ($(RS)_mMPC$), aşağıdaki reaksiyona **(2.1)** göre farklı alkantiyol molekülleri (R′S) ile fonksiyonel hale getirilmektedir [57].

$$x(R'SH) + (RS)_m\,MPC \longrightarrow x(RSH) + (R'S)_x\,(RS)_{m-x}\,MPC \qquad \textbf{(2.1)}$$

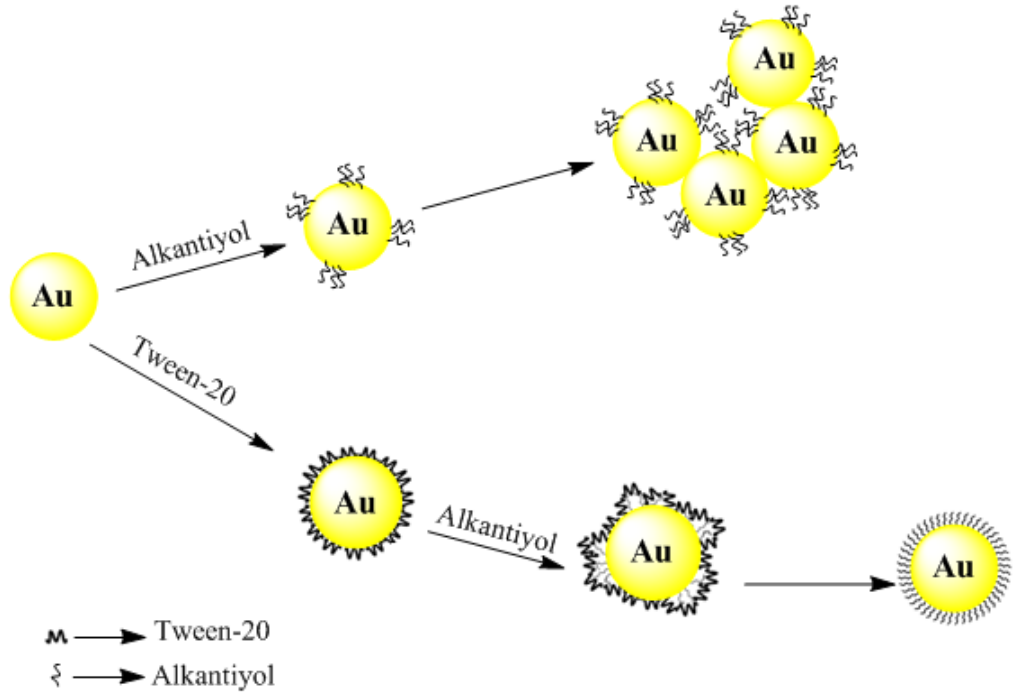
Bu reaksiyonda x ile gösterilen yeni alkantiyol molekülünün miktarını, m ile gösterilen ise orijinal alkantiyolün miktarını göstermektedir.

2.4.3 Alkantiyollerin kimyasal bağlanması

Au nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu için kullanılan yöntemlerden bir diğeri ise alkantiyollerin Au nanoparçacıkların yüzeyine kimyasal bağlanmasıdır. Au nanoparçacıkların yüzey modifikasyonunun alkantiyoller ile gerçekleştirilmesi tersinmez agregasyonun önlenmesi için iyi bir yoldur [29]. Alkantiyollerin, Au nanoparçacık yüzeyi ile etkileşimi; tiyol moleküllerin nanoparçacıkların yüzeyine Au-S kovalent bağı ile düzgün bir şekilde bağlanmasını sağlar. Au nanoparçacıkların yüzey modifikasyonunun alkantiyolllerin kimyasal bağlanması ile gerçekleştirilmesi, nanoparçacıkların başka proteinler yada biyomoleküller ile de fonksiyonel hale getirilmelerine olanak tanımaktadır [29].

Alkantiyollerin kolloidal altına doğrudan kimyasal tutunmaları, tek katman korumalı kümelere benzerlik göstermektedir. Ancak bu yöntemin bazı dezavantajları bulunmaktadır. Örneğin; bazı koşullar altında (pH, alkantiyol zincir uzunluğu, alkantiyol fonksiyonalitesi gibi) ve fonksiyonel hale getirilmeleri işlemi boyunca, nanoparçacıklar tersinmez olarak agrage olabilirler ya da topaklaşabilirler [58]. Bu durum yüzey modifikasyonu için bu metodun kullanılmasını sınırlar.

Aslan ve diğ. (2002), Au nanoparçacıkların alkantiyoller ile modifikasyonu sırasında tersinmez agregasyonu önlemek amacıyla bir metot ortaya koymuştur [13]. Bu metotta; karboksil uçlu alkantiyollerin Au nanoparçacıkların yüzeyine Au-S kovalent bağı ile kimyasal olarak bağlanması, noniyonik yüzey aktif madde varlığında gerçekleştirilmiştir [13]. Bunun için alkantiyollerin Au nanoparçacık yüzeyine kimyasal bağlanmasından önce, noniyonik yüzey aktif madde nanoparçacıkların yüzeyine fiziksel olarak tutundurulmuştur ve böylece Au nanoparçacıkların etrafında stabilize edici bir tabaka oluşturulmuştur. Bu tabakanın oluşturulmasından sonra alkantiyollerin Au nanoparçacıkların yüzeyine kimyasal olarak bağlanması gerçekleştirilmiştir. Nanoparçacıkların yüzeyine tutunan yüzey aktif moleküldeki oligo(etilen glikol) yarıları dolayısıyla oluşan sterik engelleme sonucu, Au nanoparçacıkların agregasyonu önlenmiştir [13].



Şekil 2.5 : Au nanoparçacıkların noniyonik yüzey aktif madde varlığında alkantiyoller ile modifikasyonu [13]

Noniyonik yüzey aktif maddenin Au nanoparçacıklara fiziksel olarak tutunması, alkantiyollerin kimyasal tutunması ile karşılaştırıldığında son derece zayıftır. Zayıf olarak tutunmuş yüzey aktif madde alkantiyollerin altın yüzey üzerine kimyasal olarak tutunmasıyla yok edilebilmektedir [13,29]. Bu metotla elde edilen, alkantiyol ile modifiye edilmiş Au nanoparçacıklar son derece kararlıdırlar ve tersinmez

agregasyona maruz kalmadan dondurulup, kurutulabilirler [13,29]. Bu nanoparçacıklar farklı moleküller ile türetilebilmektedir ve bu esnada parçacık agregasyonu söz konusu değildir [29].

2.5 AuNP'lerin Uygulamaları

Au nanoparçacıkların yüzyıllar boyunca kullanılan temel uygulama alanları cam ve tekstil sanayinde boyama için ve tedavi amaçlı kullanımdır. Ancak günümüzde Au nanoparçacıkların uygulamalarında, nanoteknolojinin ilerlemesine bağlı olarak son derece hızlı gelişmeler yaşanmaktadır.

Au nanoparçacıklar başta tıp olmak üzere birçok alanda farklı uygulamalara sahiptir. Au nanoparçacıklar yüzey modifikasyonlarının gerçekleştirilmesi ile DNA hibridizasyonunun kolorimetrik tanısı [4], nanoparçacık tabanlı biyoanaliz [12] ve biyoalgılayıcılar (biyosensörler) gibi çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadır.

2.5.1 Biyoalgılayıcılar (Biyosensörler)

Biyosensörler; antikorlar, enzimler, karbohidratlar ve nükleik asitler gibi biyolojik molekülleri kullanarak biyolojik olayları belirlemek yada takip etmek için kullanılmaktadır [62,63]. Biyosensörler; gıda işleme, çevre görüntüleme, çevredeki kirlilikleri tespit etme, virüsler ve biyolojik toksinler ve klinik tanıda kandaki glukoz seviyesini tespit etmede kullanılmaktadır [63].

Au nanoparçacıklar sahip oldukları benzersiz optik ve elektronik özellikleri dolayısıyla biyosensörler için çok önemli bir bileşendir. Örneğin Jia ve diğ. (2002), fonksiyonal hale getirilmiş Au nanoparçacıkları kullanarak, yaban turbundan elde edilen enzim olan yabanturbu peroksidaz (horseradish peroxidase (HRP)) biyosensörü geliştirmiştir [64]. Çalışmada tiyol grupları (SH) Au nanoparçacıkların yüzeyine kimyasal olarak tutundurulmuş ve ardından HRP Au nanoparçacıkların yüzeyine tutundurulmuştur [64]. Fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıklar kullanılarak geliştirilen bu biyosensör ile daha güçlü sinyaller alındığı tespit edilmiştir. Ayrıca bu biyosensörün daha yüksek duyarlılıkta olduğu tespit edilmiştir.

Glukoz oksidaz aktivitesini arttırmak için Chen ve diğ. (1996) boyutları 10 nm'den 30 nm'ye kadar değişen Au nanoparçacıkları glukoz biyosensörüne eklemiş ve nanoparçacıkların enzim aktivitesini arttırıcı etkisini belirlemiştir [65]. Ayrıca glukoz

oksidaz aktivitesini 10 nm boyutundaki altın nanoparçacıkların 30 nm boyutundakilere göre daha fazla arttırdığı da bu çalışmada bulunmuştur [65]. Bu çalışma daha iyi glukoz sensörü geliştirmek için iyi bir adım olmasına ve altın nanoparçacıkların enzim aktivitesini arttırıcı etkisi belirlenmesine rağmen bu konuda daha fazla araştırma yapılması gerekmektedir [29]. Glukoz sensörlerinde altın nanoparçacıkların enzim aktivitesini arttırdığına dair elde edilen gözlemler doğrultusunda, altın nanoparçacıkların DNA sensörleri için de kullanışlı olabileceği düşünülmüştür [66,67]. DNA bağlanması ve hibridizasyonu, kuartzkristal mikrobalans (QCM) kullanılarak nanogram seviyesinde eş zamanlı olarak belirlenebilmektedir [29]. Bu cihazın tanı limiti DNA ile fonksiyonel hale getirilmiş Au nanoparçacıkların QCM yüzeyinde kullanılması ile daha da geliştirilebilir olduğu ispatlanmıştır [29]. Lui ve diğ. (2002), QCM sisteminin tanı duyarlılığı üzerinde Au nanoparçacıkların boyutlarını incelemiştir ve 40 nm'ye kadar olan Au nanoparçacıkların duyarlılığı arttırdığını gözlemlemiştir [68]. Au nanoparçacıklar SPR immunotanı sistemlerinde de kullanılmaktadır. Lyon ve diğ. (1998), Au nanoparçacıkları SPR immunotanı sinyal güçlendirilmesi amacıyla kullanmıştır [69]. Au nanoparçacıklar SPR biyosensör yüzeyi ile birleştirilmiş bu sayede yüzeye immobilize edilmiş antibadi, antijen-Au nanoparçacık konjugatı ile etkileşime uğramış ve protein-protein etkileşimleri için SPR duyarlılığında artış gözlenmiştir [69].

2.5.2 Kolorimetrik deneyler

Au nanoparçacıkların en dikkat çekici uygulamalarından bir diğeri ise, bu nanoparçacıkların sahip oldukları optik özelliklerinden yararlanarak, oligonükleotitlerin kolorimetrik tanısında kullanılmalarıdır [4]. Au nanoparçacıklar kullanılarak yapılan oligonükleotit tanısı; hızlı tanı, kolorimetrik cevap gibi bir çok özellikler ile öne çıkmaktadır [4].

Oligonükleotitlerin Au nanoparçacıklarla tanısında; oligonükleotitilere kovalent bağlı ve hedeflenen zinciri tamamlayan iki altın nanoparçacık probu kullanılır. Bu proplar hedeflenen zincirle karşılaştıklarında DNA hibridizasyonu sonucu çapraz bağlanma gerçekleştirirler ve böylece binlerce Au nanoparçacık bir araya gelerek topaklaşma oluşur [29]. Topaklaşma prosesi rengin kırmızıdan maviye dönmesi ile gözlemlenir.

Bu metot yanlış eşleşmiş DNA dizilerinin tanısı için oldukça hızlı ve kolaydır [4,70,71].

Bu tekniğin ilk uygulayıcısı Mirkin ve diğ. (2000), Au nanoparçacıkları kullanarak polinükleotit tanısı için kolorimetrik bir metot geliştirmiştir [71]. Bu metotta, Au nanoparçacıklar iki farklı DNA zinciri ile modifiye edilmiş ve modifiye edilmiş bu Au nanoparçacıklar hedef DNA ile karıştırılmıştır ve böylece parçacık topaklaşması gerçekleştirilmiştir [56]. Au nanoparçacıkların topaklaşması çıplak gözle veya UV-vis spektroskopi ile kolaylıkla izlenebilmektedir.

2.6 Au Nanoteller

Son yıllarda nanometre boyutundaki materyaller ve aletler için alternatif teknolojiler oldukça ilgi çekmektedir. Bu sebeple metal nanoteller, bir çok uygulamada kullanılmalarına olanak tanıyan kendilerine özgü özellikleri dolayısıyla, en çok ilgi çeken materyallerden birisidir [72]. Ayrıca metal nanoteller elektrokimyasal üretim, fotokimyasal sentez gibi birçok teknikle kolaylıkla üretilebildikleri için de dikkat çekmektedirler.

Metal nanotellerin çapları, tek bir atomdan birkaç yüz nm'ye kadar geniş bir aralıkta olup; uzunlukları ise birkaç atom ve mikron aralığında değişebilmektedir. Uzunluk-çap oranındaki geniş çeşitlilikten dolayı farklı şekillerdeki telleri tarif etmek için literatürde birçok farklı isim kullanılmaktadır [72]. Örneğin; büyük uzunluk-çap oranı olan teller için (>20) nanotel adı kullanlırken, daha küçük uzunluk-çap oranındakiler için ise nanoçubuk adı kullanılmaktadır [72]. Kısa teller daha büyük iki elektrot arasında bağlantı olarak kullanıldığında ise genellikle nanobağlantılar olarak isimlendirilmektedirler [72].

Metal nanoteller kimyasal ve biyolojik sensörlerden, optik ve elektronik cihazlara kadar birçok yeni uygulamada umut vaadeden materyallerdir. Bu sadece metal nanotellerin benzersiz geometrilerinden değil ayrıca sahip oldukları benzersiz fiziksel, elektrik, manyetik ve mekanik özelliklerindendir [72].

2.6.1 Au nanotellerin üretimi

Metal nanotellerin üretimi için; katı şablon içinde elektrokimyasal biriktirme [73], fotokimyasal sentez [74], çekirdek ortamlı (seed-mediated) kimyasal indirgeme [75]

gibi birçok farklı yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı ise katı şablon içinde elektrokimyasal biriktirme metodudur. Bu teknikte Au nanotellerin üretiminden önce uygun şablonların üretilmesi, nanotel üretimindeki en kritik adımdır [72].

Metal nanotellerin şablona dayalı üretimi için kullanılan şablonlar; negatif, pozitif, yüzey adım şablonlarını içermektedir [72]. Negatif şablon metodunda; katı materyal içine önceden hazırlanmış silindirik nanoboşluklar (nanogözenekler) model olarak kullanılmaktadır. Metaller nanoboşlukların içerisine yerleştirilir ve böylelikle nanoboşlukların çapında çapa sahip nanoteller üretilir. Nanoboşlukları, metallerle doldurmak için birçok yöntem bulunmaktadır ancak elektrokimyasal metot daha genel ve uygun bir metottur [72]. Bu metot 'kaba kuvvet' olarak isimlendirilebilir. Çünkü nanotellerin çapları, kimyasal ilkelere dayandırılarak değil nanoboşlukların geometrik kısıtlarına dayandırılarak tahmin edilir [37]. Uygun şablonların üretilmesi, nanotel üretimindeki ilk kritik adımdır. Bu sebeple çeşitli negatif şablon üretimi için birçok yöntem geliştirilmiştir. Örnek olarak; alüminyum membranlar, polikarbonat membranlar, mika levhalar ve diblok polimerik materyaller verilebilir [72]. Bu materyaller çok sayıda düzgün silindirik biçimde nanoboşluklar içermektedirler.

Şablonların üretilmesinden sonra, silindirik nanoçapa sahip boşlukların içleri elektrokimyasal biriktirme yöntemi kullanılarak iletken materyaller ile doldurulup, metalik nanoteller üretilir [72]. Bu şekilde nanotel üretiminin en büyük avantajı, yüksek iletkenlikte nanoteller üretilmesine olanak tanımasıdır. Çünkü elektrobirikim elektron transferine dayanır. Elektrokimyasal biriktirme yöntemi sadece saf metallerin nanotelleri ile sınırlı değildir, metal alaşımlarının da nanotellerini üretebilir. Elektrobirikim yönteminin bir başka avantajı da, metal nanotellerin uzunluk-çap oranlarının kontrol edilebilmesidir. Bu birçok uygulama için oldukça önemlidir. Örneğin; nanotellerin optik özellikleri uzunluk-çap oranıyla bağlantılıdır [37]. Birçok farklı metalden oluşan nanoteller, farklı metal iyonları içeren bir çözelti içinde potansiyeli kontrol ederek üretilebilir.

İstenen nanoteller elde edildiğinde, tellerin şekillenmesi için kullanılan şablon kaldırılmalıdır. Bunun için ise şablon materyalinin uygun bir çözücü içinde çözünmesi işlemi uygulanır [72].

Pozitif şablon metodu; ise tel benzeri nanoyapıların üretimi için kullanılmaktadır [72]. Bu metotta DNA ve karbon nanotüpler şablon olarak kullanılır ve nanoteller şablonların dış yüzeyinde şekillenir. Negatif modelden farklı olarak, nanotellerin çapları şablonların boyutlarına bağlı değildir, şablon üzerine akımsız biriktirme prosesi ile biriken madde miktarı ayarlanarak kontrol edilebilir [72]. Birikme gerçekleştikten sonra şablon uzaklaştırılarak tel benzeri yapılar elde edilir.

2.6.2 Au nanotellerin uygulamaları

Au nanoteller birçok yeni uygulama için umut vaadeden materyallerdir. Bu sadece metal nanotellerin benzersiz geometrilerinden değil ayrıca sahip oldukları benzersiz fiziksel, elektrik, manyetik ve mekanik özelliklerindendir [72].

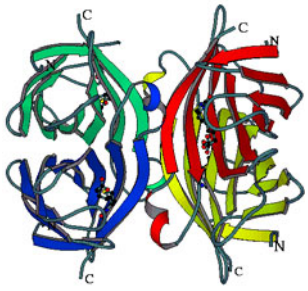
Au nanotellerin kullanım alanları ise;

- Manyetik materyaller ve cihazların üretimi,
- Optik uygulamalar,
- Nanoelektronik ve nanoelektrokimyasal uygulamalar,
- Kimyasal sensörler olarak sıralanabilir [72].

2.7 Biyotin Ve Streptavidin Etkileşimi

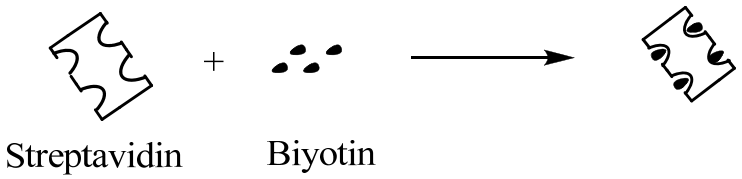
Streptavidin-biyotin kompleksi birçok önemli biyoteknolojik uygulama için temel dayanak olup, yüksek afiniteli protein-ligand etkileşimlerini çalışmak için oldukça ilginç bir model sistemdir [76].

Biyotin; küçük bir molekül (244,31 Da) olup, H vitamini olarak da bilinmektedir [77]. Biyotinin kimyasal formülü $C_{10}H_{16}N_2O_3S$'dir. Streptavidin, ise homotetramerik bir protein olup, *Streptomyces avidinii'* den elde edilmektedir [78].



Şekil 2.6 : Streptavidin [79]

Streptavidin molekülleri, molekülün karşılıklı taraflarında iki çift biyotin bağlama bölgesine sahiptir, yani bir streptavidin molekülü dört adet biyotin bağlama bölgesine sahiptir [22]. Streptavidin ve biyotin arasındaki güçlü ve kovalent olmayan etkileşim doğada bilinen en güçlü etkileşimlerden birisidir ($K_a \approx 10^{13}$ M^{-1}) [80]. Biyotin-streptavidin arasındaki bu güçlü etkileşim streptavidin-biyotin kompleksinin birçok uygulamada kullanılmasını sağlamaktadır [78].

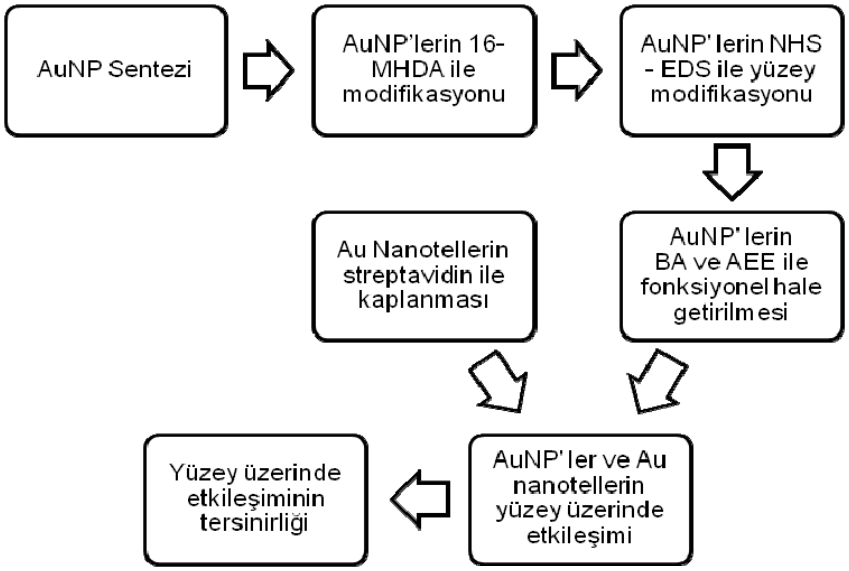


Şekil 2.7 : Streptavidin-biyotin etkileşimi

3. DENEYSEL ÇALIŞMA

3.1 Deneysel Çalışmanın Amacı

Deneysel çalışmanın amacı; kovalent yoldan biyotin bağlanmış Au nanoparçacıkların (AuNP), streptavidin-biyotin ilişkisi kullanılarak, katı bir yüzey üzerinde tersinir etkileşiminin incelenmesidir. Bu doğrultuda, ilk olarak Au nanoparçacıklar kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenmiş, ardından elde edilen AuNP'ler yüzey kimyası teknikleri kullanılarak biyotin ile fonksiyonel hale getirilmiş ve bu sayede AuNP-organik molekül nanobiyokonjugatı elde edilmiştir. Daha sonra bu nanobiyokonjugat sisteminin, streptavidin kaplanmış Au nanoteller ile etkileşimi ve bu etkileşimin tersinirliği, bir katı yüzey (Au nanotel) üzerinde incelenmiştir.



Şekil 3.1 : Deneysel çalışmanın akış şeması

3.2 Kullanılan Kimyasal ve Cihazlar

Deneysel çalışmada; altın klorür 3 hidrat ($HAuCl_4.3H_2O$) , sodyum sitrat ($Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$), sodyum fosfat monobazik (NaH_2PO_4), sülfürik asit (H_2SO_4), hidrojen peroksit (H_2O_2), Au nanotel çözeltisi, etanol, Tween-20 (yüzey aktif madde), 16-merkaptohegzadekanoik asit (16-MHDA) ve 2-(2-aminoetoksi)etanol

(AEE), N-3-(Dimetilaminopropil)-N′-etilkarbodiimit (EDC), N-hidroksisusinimit (NHS) ve (+) -biyotinil-3,6,9- triokzaandekandiamin (BA), streptavidin kullanılmıştır.

Deneysel çalışmalarda; sulu çözeltilerin pH değerleri HI 221 model bir pH metre ile ölçülmüştür. Örneklerin optik absorpsiyon değerleri Perkin Elmer Lambda 45 model optik absorpsiyon spektrofotometrede, 10 mm ışık yollu kuvartz küvetler kullanılarak kaydedilmiştir. Biyotin bağlı AuNP ve Au nanoteller arasındaki etkileşimler JEOL JSM-7000F model alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (field emission scanning electron microscope) kullanarak görüntülenmiştir.

3.3 Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanışı

Deneysel çalışmada kullanılan çözeltiler ve bileşimleri Çizelge 3.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1 : Kullanılan çözeltilerin bileşimleri

Çözelti Adı	**Karışım miktarı**
Kral suyu	3 birim HCl + 1 birim HNO_3
Pirana çözeltisi	7 birim H_2SO_4 ile 3 birim H_2O_2
1 mM $HAuCl_4$ çözeltisi	0,08 g $HAuCl_4$ + 200 ml saf su
66,3 mM $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ çözeltisi	0,39 g $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ + 20 ml saf su
10 mM, pH:7 Sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi	0,78 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ + 500 ml saf su
0,5 mM 16-MHDA çözeltisi	0,014425 g 16-MHDA + 100 ml etanol
pH:7 Tween20 çözeltisi	0,91 g Tween20 + 500 ml sodyum fosfat tampon çözeltisi
50 mM NHS çözeltisi	0,0575 g NHS + 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi
200 mM EDC çözeltisi	0,3834 g EDC + 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi
22 mM AEE çözeltisi	2,2 µl AEE + 1ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi
2,4 mM BA çözeltisi	0,001 g BA + 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi

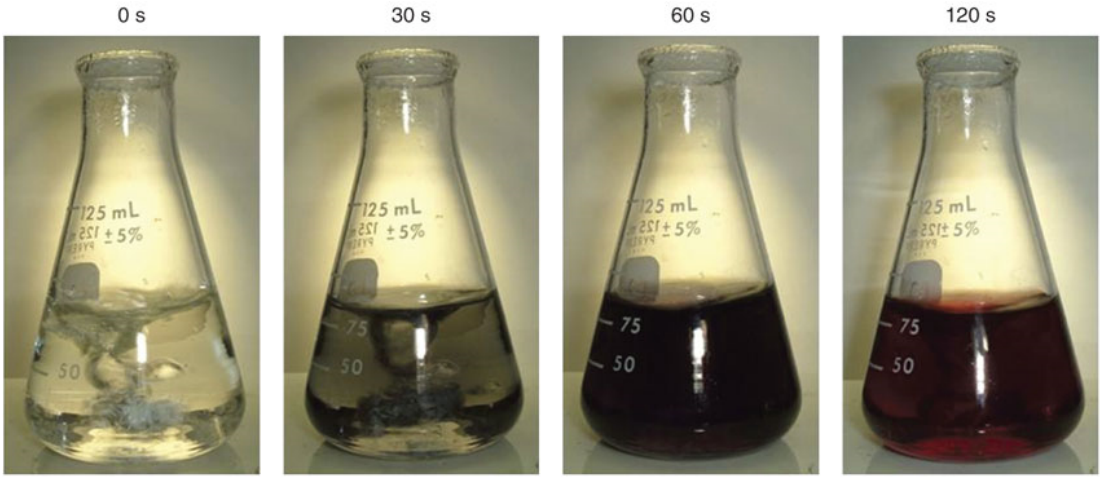
- ❖ Hesaplamalar için Ek A1' e bakınız.

Cam malzemelerin üzerinde herhangi bir metalik çekirdekleşme ajanı ve organik kirletici bulunmaması gerekmektedir. Bu sebeple deneysel çalışmada kullanılacak olan tüm cam malzemeler, kullanılmadan önce ilk olarak kral suyu (1:3 nitrik asit: hidroklorik asit) ile ve ardından pirana çözeltisi (3:7 hidrojen peroksit: sülfürik asit) ile çok dikkatli bir şekilde yıkanarak, iyice temizlenmiştir.

3.4 Deneyin Yürütülüşü

3.4.1 AuNP sentezi

AuNP'ler, ilk kez Turkevitch [51] tarafından ortaya konulan ve çok iyi bilinen bir yöntem olan sitrat indirgeme metodu ile sentezlenmiştir. Bunun için, 1mM' lık 500ml $HAuCl_4$ çözeltisi bir erlen içinde hazırlanmış ve erlen içindeki bu çözelti bir yandan ısıtılırken bir yandan da manyetik karıştırıcı ile karıştırılmıştır. Kaynama noktasına erişmesinin ardından taze olarak hazırlanan 66,3 mM 50 ml sodyum sitrat çözeltisi; ani bir şekilde erlen içine eklenmiştir. Reaksiyonun ilerleyişi çözeltideki renk değişiminden takip edilebilmektedir (Şekil 3.2). Başlangıçta sarı renkli olan $HAuCl_4$ çözeltisi, sodyum sitrat çözeltisinin eklenmesinden sonra Şekil 3.2' de görüldüğü gibi ilk olarak berraklaşmış ve ardından sırasıyla siyah, mor ve en son olarak da kırmızı renk almıştır. Çözeltinin kırmızı renk alması AuNP'lerin kimyasal indirgenmesinin gerçekleştiğini göstermektedir. Çözelti kırmızı renk aldıktan sonra sürekli karıştırılarak soğumaya bırakılmıştır, sonra da stok kahverengi şişelere taşınmıştır.



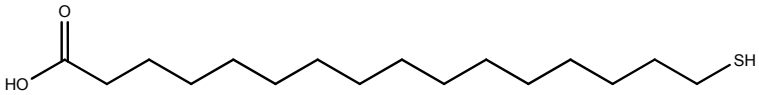
Şekil 3.2 : Sitrat indirgeme yöntemi ile Au nanoparçacık sentezlenmesi sırasındaki renk değişimi [81]

Sitrat indirgeme yönteminde (1mM 500ml $HAuCl_4.3H_2O$ ve 66,3 mM 50 ml Na sitrat kullanımı sonucu) yaklaşık 20±3 nm çapında küresel parçacıklar elde edilmektedir [82].

3.4.2 AuNP'lerin yüzey modifikasyonu (AuNP-biyotin konjugatlarının elde edilmesi)

AuNP' lerin etkin bir şekilde fonsiyonel hale getirilmeleri, yoğun konsantrasyonda tutulmamaları için absorbans değerlerinin 0,8-1,0 aralığında olması gerekmektedir [13]. Bu sebeple sitrat indirgeme yöntemi ile sentezlenen AuNP'lerin absorbans değerleri farklı miktarlarda deiyonize su ile seyreltilerek ölçülmüştür. Yapılan ölçümler sonucunda 0,8-1,0 arasındaki absorbans değerlerine karşılık gelen en uygun seyreltme oranının stok çözeltiden 1:1 seyreltme olduğu belirlenmiştir. Buna göre deneysel çalışmada kullanılacak olan AuNP çözeltisi 1:1 oranında seyreltilerek kullanılmıştır.

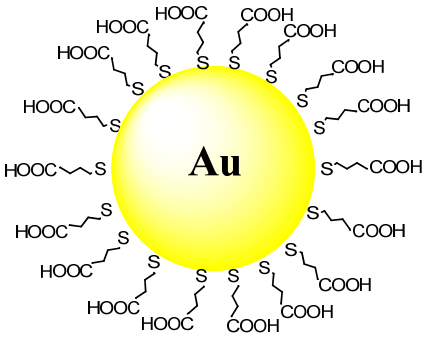
1:1 oranında seyreltilerek hazırlanan 20 ml AuNP çözeltisi içine 35 ml Tween-20 çözeltisi (1,82 mg/ml, pH:7) eklenmiş ve oluşan bu çözelti 1 saat boyunca karıştırılmıştır. Böylece, Tween 20'nin AuNP'ler üzerine fiziksel olarak tutunması sağlanmıştır. Ardından 0,5 mM 16-MHDA (Şekil 3.3) çözeltisi hazırlanmış ve hazırlanan bu çözeltiden 35 ml, AuNP + Tween-20 çözeltisi içerisine eklenmiştir.



$HS(CH_2)_{15}COOH$

Şekil 3.3 : 16-Merkaptohekzadekanoik asit

Oluşan bu çözelti 16-MHDA'in AuNP'lerin üzerine kimyasal olarak tutunması için en az 3 saat boyunca karışmaya bırakılmıştır. Karıştırma işlemi sonucunda 16-MHDA' in AuNP' lerin üzerine kimyasal olarak bağlanması (kovalent bağlanma, Au-S) sonucu oluşan yapı Şekil 3.4' de görülmektedir.

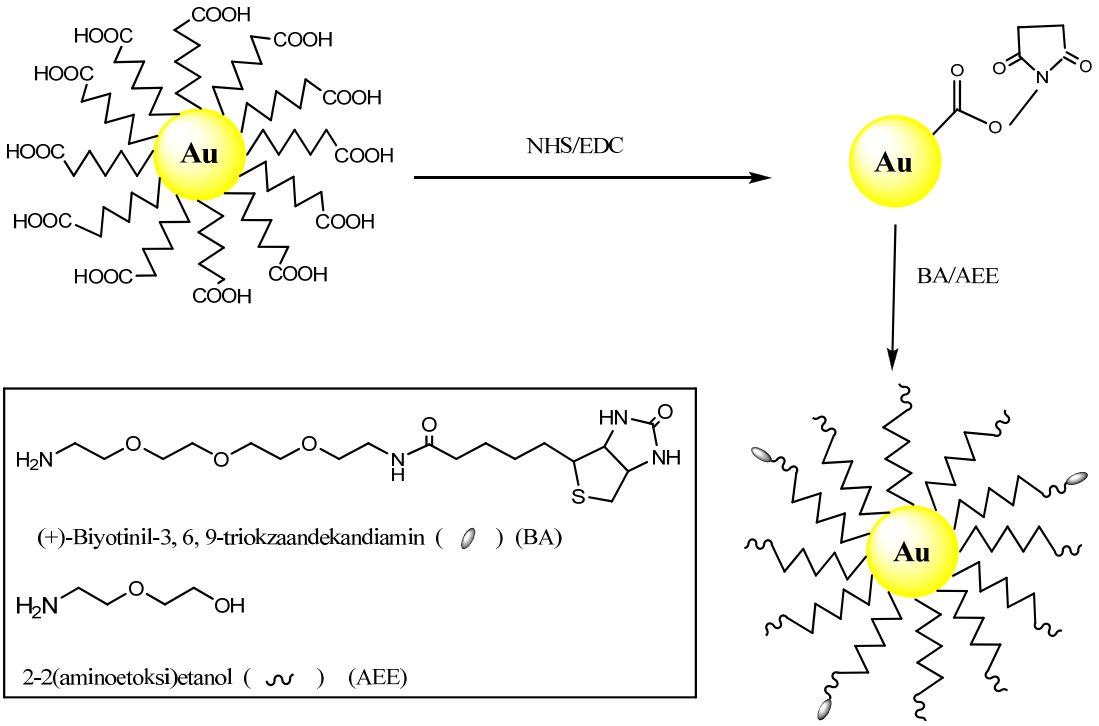


Şekil 3.4 : AuNP üzerine karboksil grubu ile sonlanan alkan tiyolün (16-MHDA) kimyasal olarak tutunması

Ardından oluşan son çözelti, reaksiyona girmeyen 16-MHDA ve fazla Tween 20' yi şekilde verildiği gibi alkan tiyol molekülü ile modifiye edilen AuNP'lerden uzaklaştırmak için 11000 rpm hızında 30 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan süzüntü uzaklaştırılmış ve santrifüj tüplerine 1' er ml Tween 20'li sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi (1,82 mg/ml, pH:7) eklenmiştir. Bu santrifüj işlemi 3 kez tekrar edilmiştir. En son santrifüj basamağından sonra süzüntü uzaklaştırılmıştır. Bu arada sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi (Tween 20 içermeyen) içinde 50 mM NHS ve 200 mM EDC çözeltisi taze olarak hazırlanmıştır. Hazırlanan 50 mM NHS ve 200 mM EDC çözeltisinden en son santrifüj basamağından sonra süzüntüsü uzaklaştırılan santrifüj tüplerine 500' er µl eklenmiştir. Eklenen NHS ve EDC' nin, 16-MHDA ile modifiye edilmiş AuNP' ler ile reaksiyona girmeleri için santrifüj tüpleri 5 dakika süresince karıştırılmıştır. Ardından oluşan bu yeni çözelti reaksiyona girmeyen NHS ve EDC' nin uzaklaştırılması için 1 dakika süresince 11000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda oluşan süzüntü ortamdan uzaklaştırılmış ve tekrar Tween 20 içeren sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisinden 1' er ml santrifüj tüplerine eklenmiştir. Tekrar 11000 rpm hızında ve 10 dakika süresince santrifüj yapılmış, böylece alkantiyol ile modifiye edilmiş AuNP' lerin yüzeyinde, bir sonraki adımda eklenecek olan BA ile reaksiyona girecek amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Santrifüj işleminden sonra oluşan süzüntü santrifüj tüplerinden uzaklaştırılmıştır. Ardından sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi içinde (Tween – 20 içermeyen) 22 mM AEE ve 2,4 mM BA çözeltisi taze olarak hazırlanmış ve santrifüj tüplerine 500' er µl BA+AEE çözeltisi eklenmiş, 10 dakika süresince karıştırılarak reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanmıştır. Ardından bu karışım, fazla BA ve AEE'yi ortamdan uzaklaştırmak için 10 dakika boyunca 11000 rpm hızında santrifüj edilmiştir. Santrifüj işlemi sonucu oluşan süzüntü uzaklaştırılmış, ve santrifüj tüplerine 1' er ml Tween 20 içeren sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi eklenmiştir. Bu santrifüj işlemi iki kez tekrar edilmiştir. Yapılan bu işlemler sonucunda biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklar elde edilmiştir. Şekil 3.5' te karboksil sonlu alkantiyol (16-MHDA) ile modifiye edilen AuNP'lerin biyotin ile fonksiyonel hale getirilme basamakları verilmiştir.

Yapılan deneysel çalışma sonucu elde edilen biyotin bağlanmış AuNP'ler, alkantiyollerin oksidasyonunu ve nanoparçacıkların ışık etkisiyle topaklanmasını

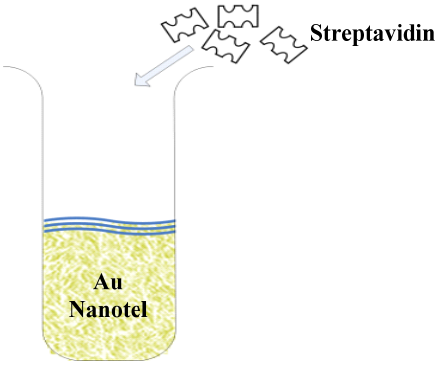
önlemek amacıyla santrifüj edildikten sonra 4°C sıcaklığında karanlık ortamda saklanmıştır.



Şekil 3.5 : AuNP'lerin biyotin ile fonksiyonel hale getirilmesi

3.4.3 Au nanotellerin streptavidin ile kaplanması

Daha önce hazırlanan Au-nanotel çözeltisinden 100 µl santrifüj tüplerine alınmış ve üzerlerine 1 ml' ye tamamlanacak şekilde deiyonize su eklenmiştir. Ardından 4000 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında süzüntü uzaklaştırılmış ve tekrar su eklenmiştir. Santrifüj işlemi bu şekilde 3 kez tekrar edilmiştir. Santrifüj aralarında 15 dakika beklenmiştir. En son santrifüj basamağından sonra süzüntü uzaklaştırılmış, 0,5 mg/ml konsantrasyonunda hazırlanan streptavidin çözeltisinden 300 µl santrifüj tüplerine eklenmiştir. Ardından hazırlanan bu tüpler, streptavidinin Au-nanoteller üzerine fiziksel olarak tutunmasının gerçekleşmesi için buzdolabında 1 gün boyunca beklemeye bırakılmıştır. Böylece Au-nanotellerin streptavidin ile kaplanma işlemi gerçekleştirilmiştir.

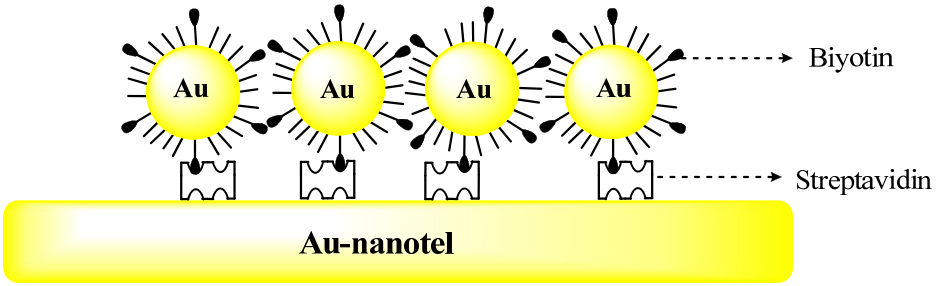


Şekil 3.6 : Au nanotellerin streptavidin ile kaplanması

Streptavidin eklenmiş Au-nanoteller, 1 gün boyunca aralıklı şekilde karıştırarak bekletildikten sonra, 4000 rpm hızında 5 dakika boyunca santrifüj edilmiş ve süzüntü ortamdan uzaklaştırılmış, tekrar su eklenmiştir. Bu santrifüj işlemi 2 kez tekrar edilmiştir ve santrifüj aralarında 15 dakika beklenmiştir.

3.4.4 Biyotinlenmiş AuNP'lerin streptavidin kaplı Au nanoteller ile etkileşimi

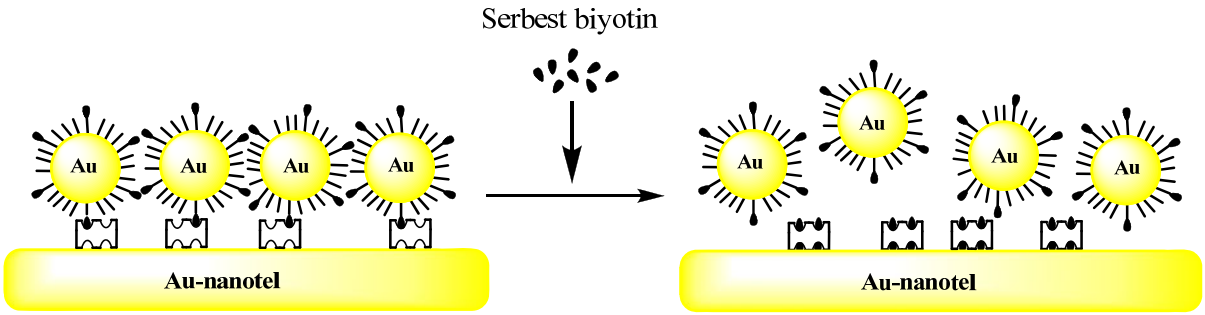
Streptavidin kaplanmış Au-nanotel çözeltisinden yaklaşık 100 µl, bir cam yüzey üzerine damlatılmış ve 2-3 dakika süresince beklenmiştir. Ardından, streptavidin kaplı Au- nanotellerin olduğu yüzey üzerine biyotin bağlanmış AuNP çözeltisinden 100 µl eklenmiş ve streptavidin-biyotin arasındaki etkileşimin gerçekleşmesi için yaklaşık 5 dakika boyunca karıştırılmıştır. Sonra, cam yüzey bol su ile durulanmış ve kurumaya bırakılmıştır. Yüzey üzerinde oluşan streptavidin-biyotin etkileşimini (Şekil 3.7) gözlemlemek için JEOL JSM-7000F model alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (field emission scanning electron microscope) kullanılmıştır.



Şekil 3.7 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin, Au-nanotel üzerine kaplanmış streptavidin ile bağlanması

3.4.5 Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği

Yüzey üzerindeki streptavidin-biyotin etkileşimi dolayısıyla çöken AuNP'lerin tersinirliğini incelemek için 11mM serbest biyotin çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra hazırlanan bu çözeltiden, streptavidin-biyotin etkileşiminin gerçekleştiği yüzeyin üzerini kaplayacak şekilde damlatılıp, 10 dakika süresince hafifçe karıştırılarak beklenmiştir. Ardından bol su ile yıkanarak, kurumaya bırakılmıştır. Yüzey kuruduktan sonra, biyotinlenmiş AuNP'lerin streptavidin ile katı yüzey üzerindeki etkileşiminin tersinirliğini (Şekil 3.8) gözlemlemek için JEOL JSM-7000F model alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (field emission scanning electron microscope) kullanılmıştır.



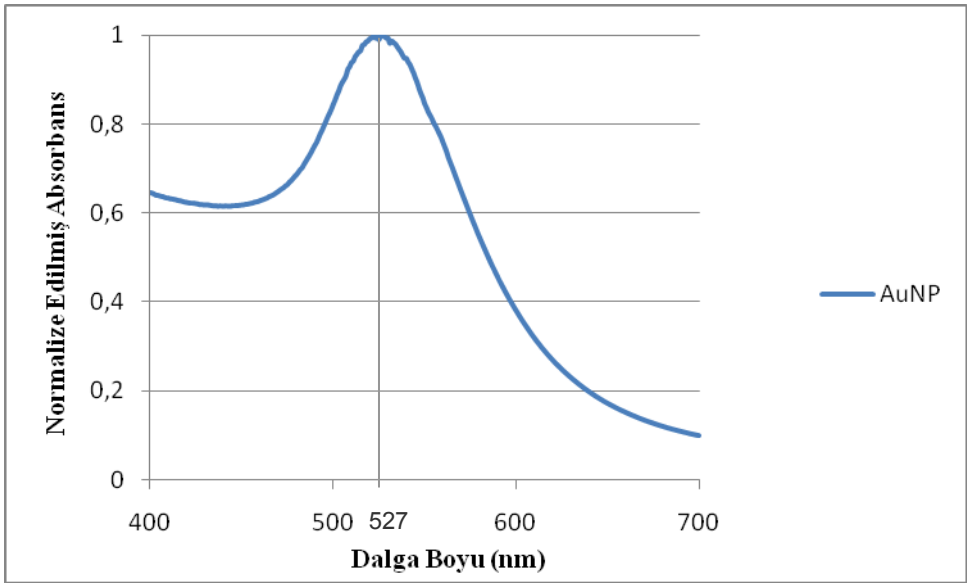
Şekil 3.8 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1 AuNP'lerin Yüzey Modifikasyonu

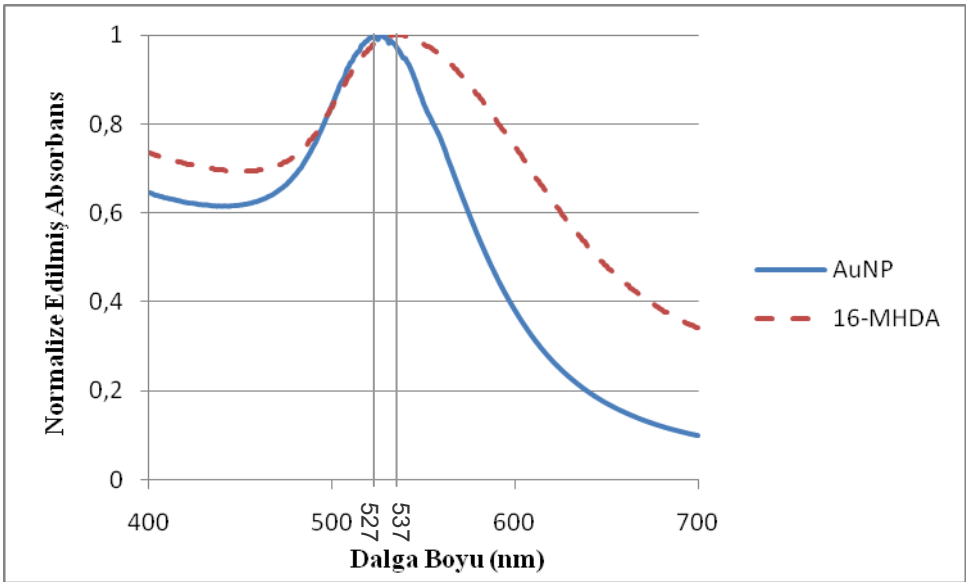
Bu çalışmada Au-nanoparçacıkların, biyotin ve 2-(2- aminoetoksi) etanol ile organik kimyasallarını taşıyor hale getirilmesi istenmiştir. Bu amaç için önce AuNP hazırlanmış daha sonra yüzey kimyası teknikleri ile bu kimyasallar AuNP' lere kovalent yoldan bağlanmıştır. Yüzey modifikasyonu işleminin her basamağının takibi için numunelerin her birinin 400-700 nm dalga boyu arasında absorpsiyon ölçümleri UV-Vis Spektrofotometre ile yapılmıştır. Bu absorbans ölçümlerinin nedeni, Au nanoparçacık yüzeyine bağlanan moleküllerin refraktif indeksi değiştirerek ve yüzey plazmon piklerinin (çıplak AuNP için 520 nm) daha büyük dalga boyu değerlerine (kırmızı bölgeye) doğru kaymasını vermesi ve bu yolla yüzeye eklenen her bir molekülün gözlemlenebilir olmasıdır.

Kontrol örneği olarak sitrat indirgeme yöntemi ile sentezlenen üzerinde herhangi bir molekül bulunmayan çıplak Au-nanoparçacık çözeltisinin absorbans değerleri 400-700 nm dalga boyu arasında ölçülmüştür. Bu çözeltinin (AuNP), yüzey plazmon piki 527 nm civarında bulunmuştur (Şekil 4.1).



Şekil 4.1 : Çıplak AuNP absorbans-dalga boyu grafiği

Daha sonra AuNP çözeltisine, Tween-20 (yüzey aktif madde) içeren sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi eklenerek, Tween-20'nin Au-nanoparçacıkların yüzeyine fiziksel olarak tutunması sağlanmıştır. Burada Au nanoparçacıklara Tween-20 eklenmesinin sebebi, alkantiyollerin (16-MHDA) nanoparçacıkların yüzeyine kimyasal olarak tutunması sırasında ve sonrasında nanoparçacıkların tersinmez agregasyonunun önüne geçilmesidir. Au nanoparçacıkların yüzeyine Tween-20'nin fiziksel olarak tutunmasından sonra, ortama 16-MHDA (16-merkaptohegzadekanoik asit) eklenerek tiyol moleküllerinin nanoparçacık yüzeyine kimyasal olarak (Au-S kovalent bağı ile) tutunmaları gerçekleştirilmiştir. 16-MHDA ile modifiye edilen Au nanoparçacıkların 400-700 nm arasındaki absorbans değerleri incelenmiş ve yüzey plazmon piki 537 nm civarında gözlemlenmiştir. Yüzey plazmon pikindeki bu kayma (527 nm'den 537 nm'ye), tiyol moleküllerinin Au nanoparçacıkların yüzeyine kimyasal tutunmalarının gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.2). Ayrıca, bu adımda spektrumun (plazmon pikinden sonra çıplak Au' ya göre mukayese edildiğinde aralarında kalan alan) çok fazla genişlememesi beklenmektedir. Çünkü, pikin arasında kalan alan nanoparçacıkların alkantiyollerin kimyasal tutunması ile agrage (topaklaşma) olup olmadığını ifade etmektedir.

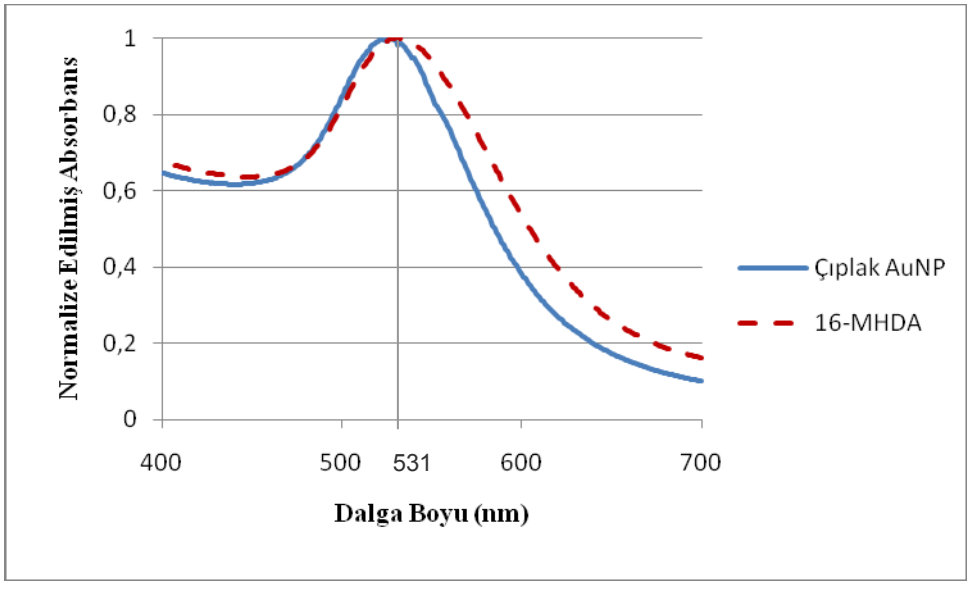


Şekil 4.2 : AuNP'lerin 16-MHDA ile modifikasyonu

Şekil 4.2' de görüldüğü gibi AuNP' lerin 16-MHDA ile modifikasyonu sonrasında spektrumdaki genişleme gözlenmiştir. Bu durum alkantiyollerin Au nanoparçacıklara kimyasal bağlanma sırasında agrage olduğunu göstermektedir. Alkantiyollerin kimyasal bağlanmasıyla oluşan agreasyonu önlemek için Au nanoparçacıkların pH

değerleri değiştirilmiştir. Başlangıçta pH'ı 5,5 olan Au nanoparçacık çözeltisinin pH'ı 1M NaOH ile 7' ye ayarlanmıştır. Nanoparçacıkların pH' ı 7' ye ayarlandıktan ve ardından 16-MHDA ile modifiye edildikten sonra 400-700 nm arasındaki absorbans değerleri incelenmiş ve yüzey plazmon pikinin 531 nm' ye kaydığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.3). Yüzey plazmon pikindeki bu kayma (527 nm' den 531 nm' ye) tiyol molekülleri ile AuNP' ler arasında kimyasal bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir.

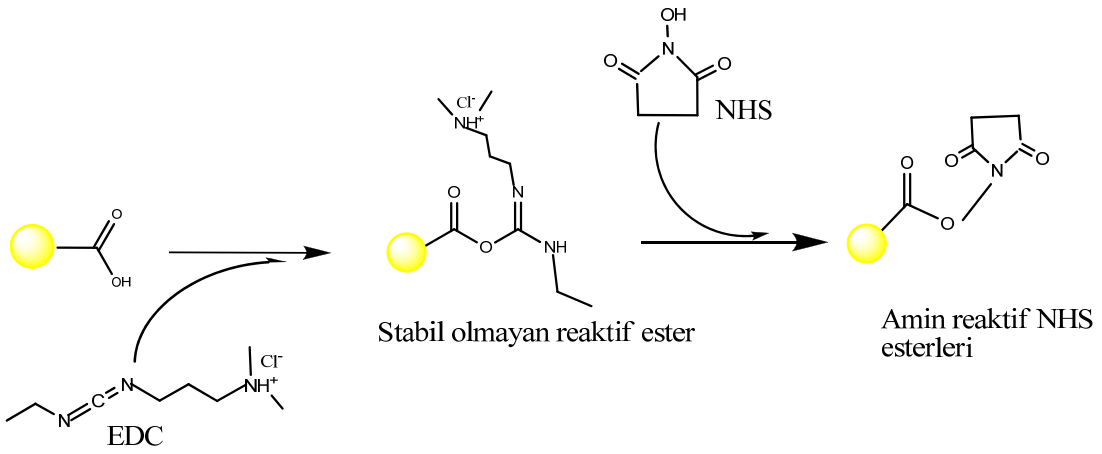
pH 5' ten daha düşük pH'larda çalışıldığında nanoparçacıkların kendiliğinden agrage olduğu görülmüştür. Karboksilik asit grupları, düşük pH' larda parçacıklar arası etkileşimin hidrojen bağları yoluyla kolaylaşması beklenen bir durumdur [83]. Böylece hidrojen bağları köprüsüyle parçacıklar bir araya gelip, agrage olmaktadırlar. pH 7' de çalışıldığında ise parçacık agregasyonu görülmemiştir. Bunun sebebi ise nötral pH değerlerinde negatif yüklü karboksil sonlu nanoparçacıklar arasındaki itici kuvvetlerin, nanoparçacıkların bir araya gelmelerini önlemesidir. Şekil 4.3' te görüldüğü gibi pH ayarlandıktan sonra spektrumda fazla genişleme gözlenmemiştir. Bu durum pH 7' de 16-MHDA ile modifiye edilen AuNP' lerin, tiyol moleküllerinin kimyasal bağlanması sonrasında agrage olmadığını göstermektedir.



Şekil 4.3 : AuNP'lerin pH 7' de 16-MHDA ile modifikasyonu

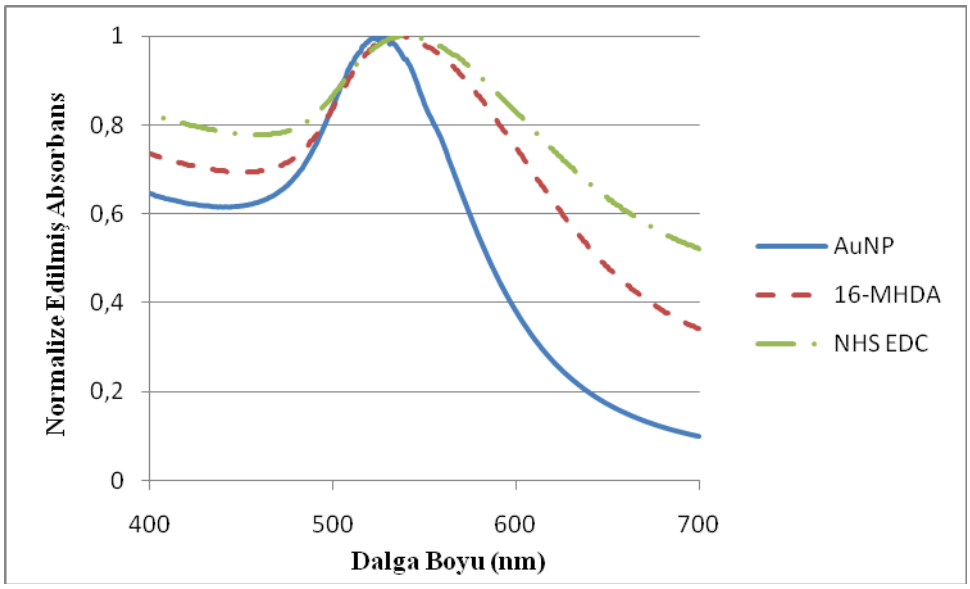
Ardından 16-MHDA ile modifiye edilmiş Au-nanoparçacıkların, NHS ve EDC ile reaksiyona girmeleri sağlanmıştır. Böylelikle, Au-nanoparçacıkların yüzeyinde aktif

yüzey esterleri (NHS esterleri) oluşması sağlanmıştır. NHS esterleri, NHS' in karbodiimit varlığında karboksilik gruplar ile reaksiyona girmesi sonucu oluşmaktadır. Bu sebeple suda çözünebilen bir karbodiimit olan EDC kullanılmıştır. EDC karboksilik asit grubu ile reaksiyona girerek karboksil gruplarını aktif hale getirmektedir. EDC'nin reaksiyonunun ardından NHS reaksiyona girerek amin reaktif NHS esterlerinin oluşmasını sağlamaktadır. Au nanoparçacıkların karboksil grubu ile sonlanan 16-MHDA ile modifikasyonunun ardından NHS ve EDC eklenmesi sonucu oluşan reaksiyon basamakları Şekil 4.4' te görülmektedir. Buna göre 16-MHDA ile modifiye edilen Au nanoparçacıklar ilk olarak EDC ile reaksiyona girmektedirler ve reaksiyon ürünü olarak stabil olmayan reaktif esterleri oluşturmaktadırlar. Ardından oluşan stabil olmayan reaktif esterler NHS ile reaksiyona girerek amin reaktif NHS esterlerini oluşturmaktadırlar. Bu reaksiyon sonucu oluşan amin reaktif NHS esterleri yeterli derecede stabilite sağlayarak, iki adımlı çapraz bağlanma prosedürlerinin gerçekleşmesine olanak tanımaktadır [84].



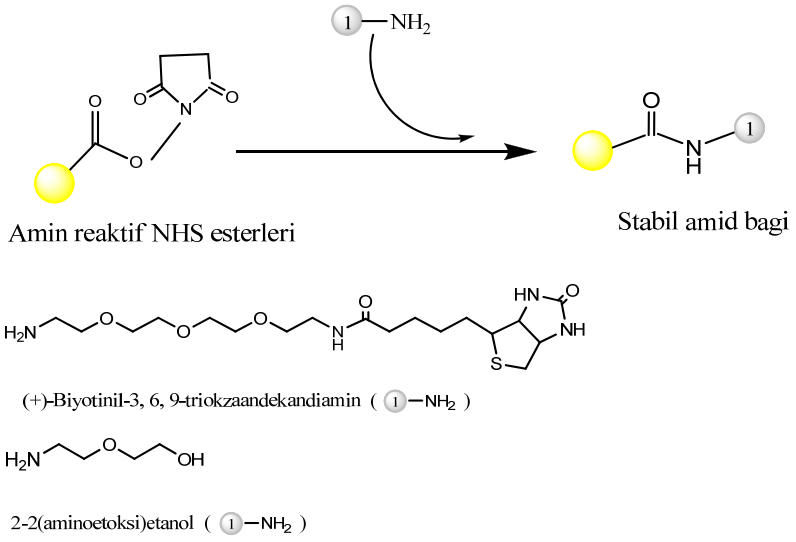
Şekil 4.4 : 16-MHDA ile modifiye edilmiş AuNP' lerin NHS ve EDC ile reaksiyonu

Bu reaksiyon sonunda ölçülen absorbans değeri incelenmiş ve yüzey plazmon pikinin iyice kaydığı (542 nm' ye) gözlemlenmiştir. Çünkü, 16-MHDA ile modifiye edilmiş Au nanoparçacıklarla reaksiyona giren NHS ve EDC, aktif yüzey esterleri oluşturup, yüzey yüklerinin azalmasına ve dolayısıyla nanoparçacıkların agregasyonuna sebep olmuştur (Şekil 4.5).



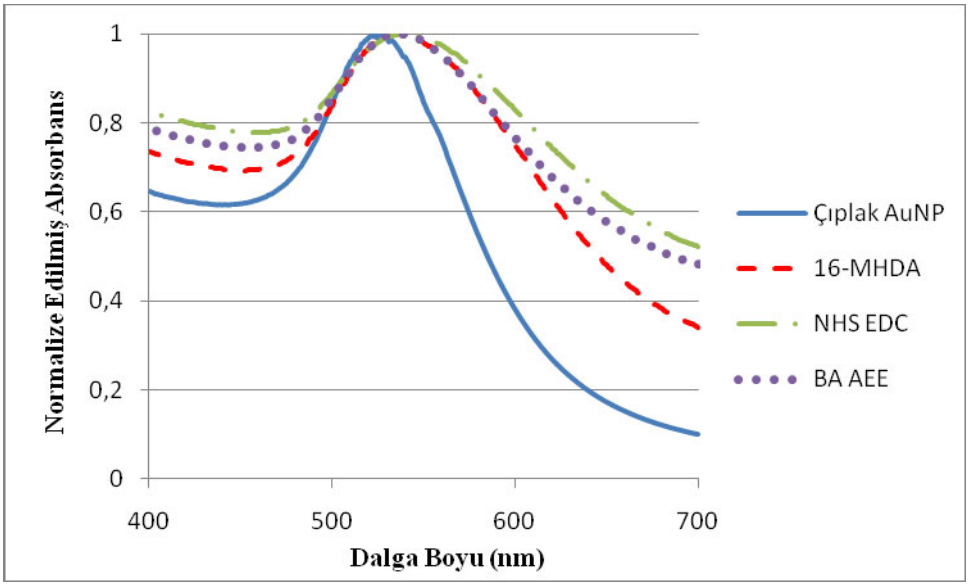
Şekil 4.5 : 16-MHDA ile modifiye edilmiş altın nanoparçacıkların NHS ve EDC ile reaksiyonu

Daha sonraki adımda ise BA ve AEE, Au nanoparçacık çözeltisine eklenmiştir. Bir önceki adımda 16-MHDA ile modifiye edilmiş Au nanoparçacıkların NHS ve EDC ile reaksiyona girmesi sağlanmış ve böylelikle amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştu. Burada NHS biyotinleştirme ajanı olarak kullanılmıştır. NHS ve EDC ile reaksiyon sonucu oluşan amin reaktif esterleri, BA ve AEE molekülündeki amin grupları ile reaksiyona girerek, kararlı amid bağları oluşturup iki molekülün birleşmesini sağlar [84]. Amin reaktif NHS esterleri ile amin grubu içeren moleküllerin reaksiyonu Şekil 4.6' da görülmektedir.



Şekil 4.6 : Amin reaktif NHS esterlerinin BA ve AEE ile reaksiyonu

BA ve AEE' nin , altın nanoparçacık çözeltisine eklenmesinin ardından yüzey plazmon piki 537 nm' ye kaymıştır (Şekil 4.7). Bu sayede biyotin ve aminoetoksi etanol, alkantiyollerin karboksil grupları ile kovalent olarak bağlanmıştır. Bu durumda ise aminoetoksi etanoldeki, oligo (etilen glikol) grupları sterik etki yaratarak Au nanoparçacıklar arasında itici kuvvetler oluşmasına ve böylece agregasyon meyilli Au-nanoparçacıkların birbirinden ayrılmalarına ve çözelti içinde yeniden dağılmalarına sebep olmuştur [22].



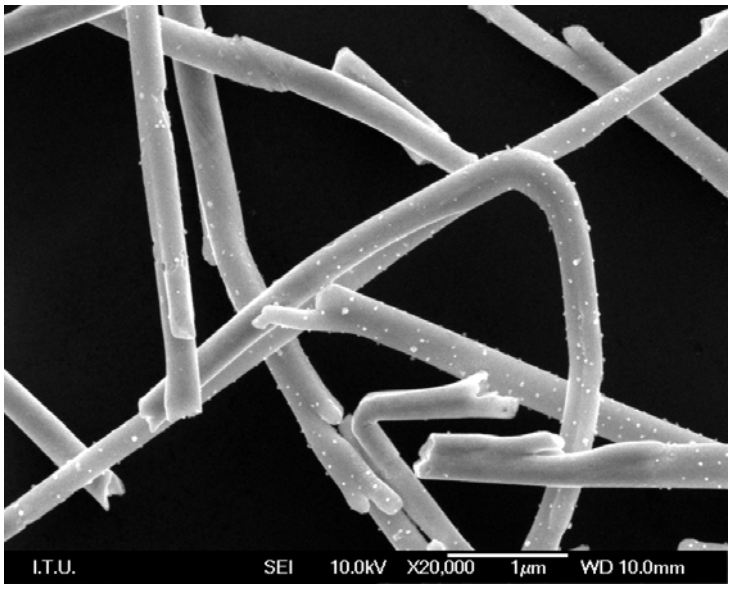
Şekil 4.7 : AuNP'lere BA ve AEE eklenmesi

4.2 Biyotin Bağlanmış AuNP'lerin Streptavidin Kaplı Au-Nanoteller ile Tersinir Etkileşimi

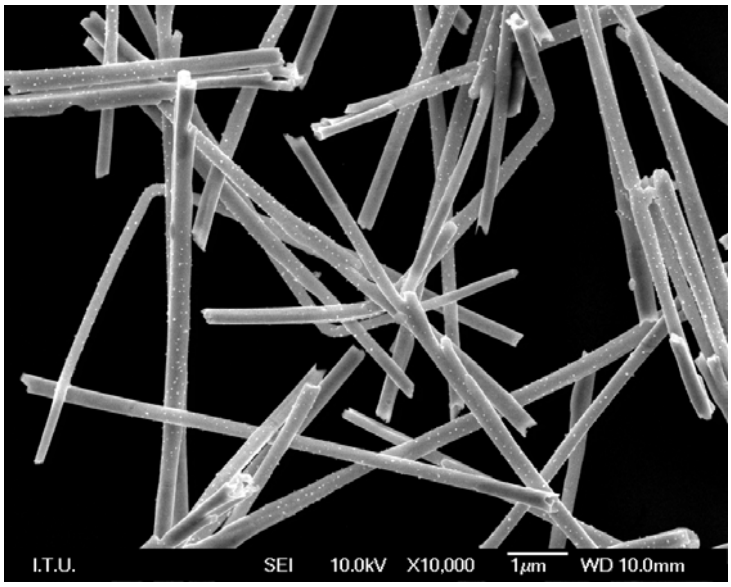
Streptavidin ile kaplanan Au nanotellerin, biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklarla etkileşimi katı yüzey üzerinde incelenmiştir. Bunun için streptavidin ile kaplı Au-nanoteller cam yüzey üzerine damlatılmış ardından biyotin bağlı Au nanoparçacıklar yüzey üzerindeki nanotellerin üzerini kaplayacak şekilde damlatılmış ve cam yüzey kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra bu cam yüzey alan emisyon taramalı elektron mikroskobunda incelenmiştir.

Alan emisyon taramalı elektron mikroskobu ile alınan görüntüden de anlaşıldığı gibi biyotinlenmiş AuNP'ler ile streptavidin kaplı Au-nanoteller arasında bir etkileşim söz konusudur (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Şekil 4.8' deki görüntü 20.000 kez, Şekil 4.9' deki görüntü ise 10.000 kez büyütülmüştür. Streptavidin kaplı Au-nanoteller bazı bölgelerde birbirleri üzerine yerleşmiş, bazı bölgelerinde ise kıvrılmalar göstermiştir.

Au-nanotellerin uçlarında çatallanmalar görülmektedir. Au-nanoteller üzerinde görünen küçük noktacıklar streptavidin-biyotin etkileşimi dolayısıyla nanoteller üzerine bağlanmış Au-nanoparçacıklardır. Au nanoparçacıklar, nanoteller bazı bölgelerde üstüste bindiği, nanotellerin miktarı yüksek olduğu için tüm teller üzerinde homojen bir dağılım göstermemektedirler.



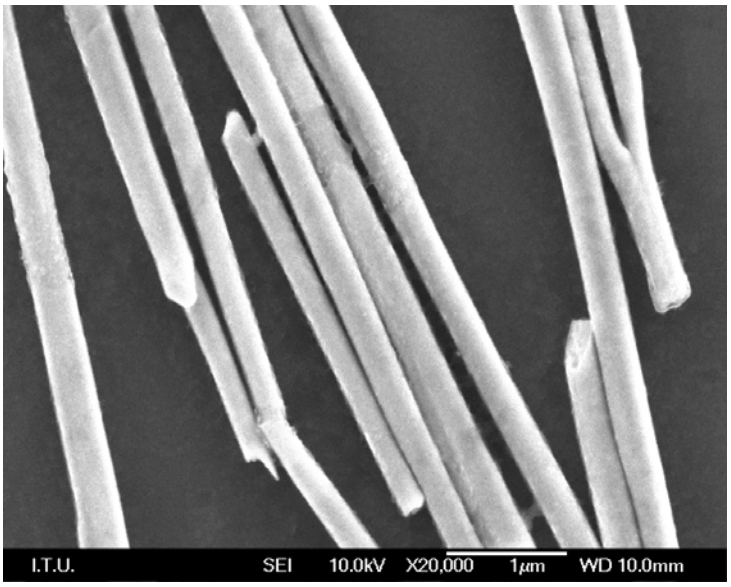
Şekil 4.8 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin kaplı Au-nanoteller ile etkileşimi



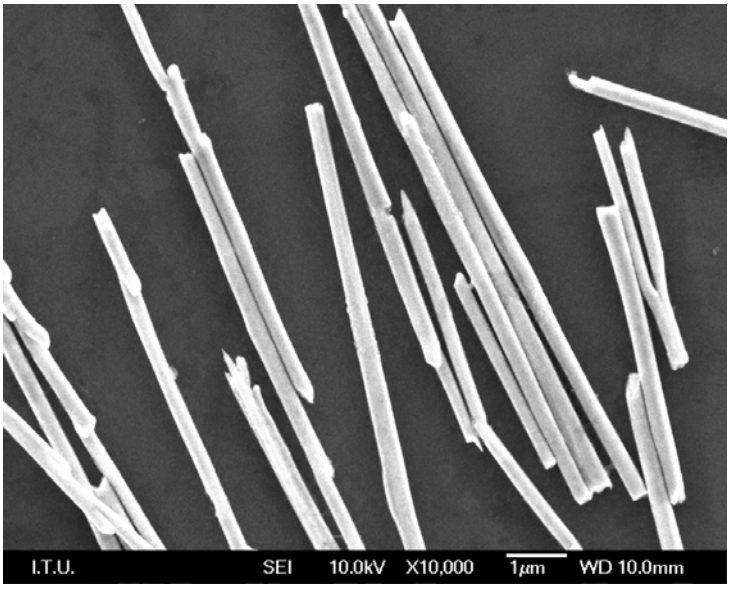
Şekil 4.9 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin kaplı Au-nanoteller ile etkileşimi

4.3 Biyotinlenmiş AuNP'lerin Streptavidin ile Etkileşiminin Katı Yüzey Üzerindeki Tersinirliği

Yüzey üzerinde streptavidin-biyotin etkileşimi dolayısıyla oluşan bağlanmanın tersinirliği yüzey üzerine serbest biyotin eklenerek incelenmiştir. Serbest biyotin cam yüzey üzerine eklendikten sonra, alan emisyon taramalı elektron mikroskobu (field emission scanning electron microscope) ile gözlenmiştir (Şekil 4.10, Şekil 4.11).



Şekil 4.10 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği



Şekil 4.11 : Biyotin bağlanmış AuNP'lerin streptavidin ile etkileşiminin katı yüzey üzerindeki tersinirliği

Şekil 4.10’ daki görüntü 20.000 kez, Şekil 4.11’ deki görüntü ise 10.000 kez büyütülmüştür. Şekil 4.8 ve Şekil 4.9’ de Au nanoteller üzerinde küçük noktacıklar şeklinde görülen Au nanoparçacıklar, yüzey üzerine serbest biyotin eklenmesi ardından alınan görüntülerde (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11) görünmemektedir. Bu durum, ortama serbest biyotin eklenmesi ile biyotinlenmiş Au nanoparçacıkların streptavidin kaplı Au-nanotellerden ayrıldığını göstermektedir. Ortama serbest biyotin eklenmesi ile streptavidin molekülüne bağlı biyotin bağlanmış AuNP’ ler ile serbest biyotin molekülleri arasında, streptavidin molekülünün biyotin bağlama bölgeleri için kompetatif (yarışmalı) etkileşim gerçekleşmektedir [22]. Eklenen serbest biyotin, streptavidin molekülüne bağlı biyotine göre daha fazla enerjiye sahip olduğundan; serbest biyotinin eklenmesi ile biyotin bağlı AuNP’ ler streptavidin kaplı Au-nanotellerden ayrılmaktadır.

5. VARGILAR VE DEĞERLENDİRME

1) Au-nanoparçacıklar sitrat indirgeme yöntemi ile sentezlenmiştir. Bu yöntem ile hazırlanan Au nanoparçacıkların tanecik boyutları başlangıç konsantrasyonuna göre kontrol edilebilmektedir ve bu yolla üretilen Au nanoparçacıklar yüzeylerine zayıf bağlanmış sitrat iyonları nedeni ile negatif yüke sahiptirler.

2) Sitrat indirgeme yöntemi ile hazırlanan Au-nanoparçacıkların yüzey modifikasyonunun etkili bir şekilde yapılabilmesi için absorbans değerlerinin 0,8-1,0 arasında olması gerekmektedir.

3) Sentezlenen Au nanoparçacıkların yüzey modifikasyonu yapılmadan önce yüzey aktif bir maddenin Au nanoparçacıkların yüzeyine fiziksel olarak tutundurulması ile nanoparçacıkların tersinmez agregasyonu önlenmiştir.

4) Au nanoparçacıkların üzerine 16-MHDA eklenerek, tiyol moleküllerinin Au nanoparçacıkların yüzeyine Au-S kovalent bağı ile kimyasal olarak bağlanması sağlanmıştır. Bu bağlanma sonucu spektrumdaki genişleme Au nanoparçacıkların tiyol moleküllerinin kimyasal bağlanması ile topaklaştığını göstermektedir. Bu topaklaşmanın önlenmesi için Au-nanoparçacık çözeltisinin pH değeri değiştirilmiştir. pH = 7' ye ayarlandığında spektrumda bir genişleme gözlenmemiş, Au nanoparçacıkların tiyol moleküllerinin kimyasal bağlanması ile topaklaşması önlenmiştir.

5) 16-MHDA ile modifiye edilen Au nanoparçacıklara NHS ve EDC eklenerek aktif yüzey esterleri oluşturulmuş ardından AEE ve BA eklenerek esterleşme reaksiyonları sonucu biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklar elde edilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen Au nanoparçacıklar son derece kararlıdırlar ve uygulanan bu yöntem spesifik olmayan adsorpsiyonun önlenmesinde son derece etkilidir.

6) Au-nanoteller streptavidin ile kaplanmış ve doğada bilinen en güçlü etkileşimlerden biri olan streptavidin biyotin etkileşimi kullanılarak Au nanoparçacıkların Au-nanoteller üzerine bağlanması gerçekleştirilmiştir. Alan

emisyon taramalı elektron mikroskobundan alınan biyotinlenmiş Au nanoparçacıkların, streptavidin kaplı Au-nanoteller üzerine bağlandığı görülmüştür.

7) Yüzey üzerinde Au-nanotellere tutunan Au nanoparçacıkların, bu katı yüzey üzerindeki tersinirliğini incelemek için yüzey üzerine serbest biyotin eklenmiştir. Etilen glikol grupları taşıyan biyotinlenmiş Au nanoparçacıklar ile streptavidinin etkileşimi, serbest biyotin ile streptavidinin etkileşimine göre daha zayıf olduğundan ortama serbest biyotin eklenmesi ile biyotin bağlanmış Au nanoparçacıklar streptavidinden ayrılmıştır. Böylelikle biyotin bağlanmış Au nanoparçacıkların streptavidin bağlanmış bir yüzeye tersinir olarak tutundurulabileceği gösterilmiştir.

Bu çalışma ile literatürde ilk kez biyotinlenmiş Au nanoparçacıkların bir katı yüzey üzerindeki tersinir etkileşimleri gösterilmiştir. Au nanoparçacıkların katı yüzey üzerindeki tersinir etkileşimine dayalı böyle bir nanosistem biyosensör çalışmaları için son derece önemlidir. Biyotin bağlanmış Au nanoparçacıkların streptavidin kaplı Au-nanotellere bir yüzey üzerinde tersinir olarak tutundurulabilmesi, ileride nanobiyotanı mekanizmalarının yüzeyinin rejenerasyonu için de önemlidir.

KAYNAKLAR

[1] **Wang, Z. L.,** 2004. What is Nanotechnology? And How Will This Small Wonder Make a Big Change in Manufacturing?, *Georgia Tech Policy Project on Industrial Modernization*.

[2] **Rashid, M. H., Bhattacharjee, R. R., Kotal, A., and Mandal, T. K.,** 2006. Synthesis of Spongy Gold Nanocrystals with Pronounced Catalytic Activities, *Langmuir*, **22**, 7141-7149.

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

[4] **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.

[5] **Mirkin, C. A., Letsinger, R. L., Mucic, R. C., and Storhoff, J. J.,** 1996. A DNAbased Method for Rationally Assembling Nanoparticles into Macroscopic Materials. *Nature,* **382**, 607–609.

[6] **Kim, J. H., Cho, J. H., Cha, G. S., Lee, C. W., Kim, H. B., and Paek, C. W.,** 2000. Conductimetric Membrane Strip Immunosensor with Polyanilinebound Gold Colloids as Signal Generator. *Biosens. Bioelectron*, **14**, 907–915.

[7] **Velev, O. D., Kaler, E. W.,** 1999. In Situ Assembly of Colloidal Particles into Miniaturized Biosensors, *Langmuir*, **15**, 3693–3698.

[8] **Li, H., Luk, Y. Y., Mrksich, M.,** 1999. Catalytic Asymmetric Dihydroxylation by Gold Colloids Functionalized with Self-Assembled Monolayers, *Langmuir*, **15**, 4957–4959.

[9] **Aslan, K., Perez-Luna, V. H.,** 2006. Nonradiative Interactions Between Biotin-Functionalized Gold Nanoparticles and Fluorophore-Labeled Antibiotin, *Plasmonics*.

[10] **Faulk, W. P., Taylor, G. M.,** 1971. An Immunocolloidal Method for the Electron Microscope, *Immunochemistry,* **8**, 1081- 1083.

[11] **Jena, B. K., Raj, C. R.,** 2007. Amperometric L-Lactate Biosensor Based on Gold Nanoparticles*, Electroanalysis,* **19**, 816–822.

[12] **Navani, N. K., Li, Y.,** 2006. Nucleic Acid Aptamers and Enzymes as Sensors, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10**, 272–281.

[13] **Aslan, K; Perez-Luna, V. H.,** 2002. Surface Modification of Colloidal Gold by Chemisorption of Alkanethiols in the Presence of a Nonionic Surfactant. *Langmuir,* **18**, 6059-6065.

[14] **Daniel, M.C., Astruc, D.,** 2004. Gold Nanoparticles: Assembly, Supramolecular Chemistry, Quantum-Size Related Properties, and Applications Towards Biology, Catalysis and Nanotechnology. *Chem. Rev.* **104,** 293-346.

[15] **Ingram, R. S., Hostetler, M. J., Murray, R. W.,** 1997. Poly-hetero-ω-functionalized Alkanethiolate-Stabilized Gold Cluster Compounds. *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 9175-9178.

[16] **Shim, J. Y., and Gupta, V. K.,** 2007. Reversible Aggregation of Gold Nanoparticles Induced by pH Dependent Conformational Transitions of a Self-Assembled Polypeptide. *Journal of Colloid and Interface Science*, **316**, 977-983.

[17] **Sastry, M., Lala, N., Patil, V., Chavan, S. P., and Chittiboyina, A. G.,** 1998. Optical Absorption Study of the Biotin-Avidin Interaction on Colloidal Silver and Gold Particles. *Langmuir*, **14**, 4138-4142.

[18] **Nath, N., Chilkoti, A.,** 2001. Interfacial Phase Transition of an Environmentally Responsive Elastin Biopolymer Adsorbed on Functionalized Gold Nanoparticles Studied by Colloidal Surface Plasmon Resonance, *J. Am.Chem. Soc*, **123**, 8197–8202.

[19] **Hazarika, P., Ceyhan, B., and Niemeyer, C. M.,** 2004. Reversible Switching of DNA-Gold Nanoparticle Aggregation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **43**, 6469- 6471.

[20] **Ryadnov, M. G., Ceyhan, B., Niemeyer, C. M., Woolfson, D. N.,** 2003. "Belt and Braces": A Peptide-Based Linker System of de Novo Design. *J. Am. Chem. Soc*. **125 32**, 9388-9394.

[21] **Levy, R., Thanh, N. T. K., Doty, R. C., Hussain, I., Nichols, R. J., Schiffrin, D. J., Brust, M., and Fernig, D. G.,** 2004. Rational and Combinatorial Design of Peptide Capping Ligands for Gold Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **126 32**, 10076-10084.

[22] **Aslan, K., Luhrs, C. C., Perez-Luna, V. H.,** 2004. Controlled and Reversible Aggregation of Biotinylated Gold Nanoparticles with Streptavidin. *J. Phys. Chem. B* **108 40**, 15631-15639.

[23] **Taniguchi, N.,** 1974. On the Basic Concept of Nano-Technology, *Proc. Intl. Conf. Prod.* London, Part II, British Society of Precision Engineering.

[24] **Feynman, R. P.,** 1960. There's Plenty of Room at the Bottom, *Eng. Sci.* **23**, 22-36.

[25] **Doğan, M.,** 2006. Nanoteknoloji ve Uygulamaları Kimya ile İlişkisi, *Kimya ve Sanayi Dergisi*, **39**, 12-18.

[26] **Anonim** *<http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files//vizyon2023 /Vizyon 2023_Strateji_Belgesi.pdf>*, alındığı tarih 22.03.2009

[27] **Anonim** *<http://www.nanoturk.com/Dunyada_NT.htm>*, alındığı tarih 22.03.2009

[28] **Anonim** *<http://www.fen.bilkent.edu.tr/~mb/dokumanlar/Nanoteknoloji Devrimi Geliyor_TED_Mesale.pdf>*, alındığı tarih 02.03.2009

[29] **Perez-Luna, V. H., Aslan, K., Betala, P.,** 2004. Colloidal Gold. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotecnology* **2**, 24-79.

[30] **Lee, L., Seddon, G., Stephens, F.,** 1976. Stained Glass. Crown, New York.

[31] **Savage, G.,** 1975. Glass and Glassware. Octopus Books, London.

[32] **Faraday, M.,** 1857. Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light. *Philosophical Transactions of the Royal Society* **147**, 145-181.

[33] **Lee, S.,** 2007. Surface Modification of Gold Nanoparticles and Their Application in Biomolecular Sensing, *Master Thesis*, Illinois Institue of Technology, Chicago.

[34] **Anonim** <*http://www.tedpella.com/gold_html/gold-colloids-wcopy.jpg*>, alındığı tarih 08.04.2009

[35] **Zhao, W., Brook, M. A., and Li, Y.,** 2008. Design of Gold Nanoparticle-Based Colorimetric Biosensing Assays, *ChemBioChem,* **9**, 2363-2371.

[36] **Javois, L. C.,** 1999. *Immunocytochemical Methods and Protocols*. Humana Press, Clifton, NJ.

[37] **Foss, C. A., Feldheim, D. L.,** 2001. *Metal Nanoparticles: Synthesis, Characterization, and Applications*. Dekker, New York.

[38] **Henglein, A.,** 1999. Radiolytic preparation of ultrafine colloidal gold particles in aqueous solution: Optical Spektrum, Controlled Growth, and Some Chemical Reactions. *Langmuir*, **15**, 6738-44.

[39] **Henglein, A., Meisel, D.,** 1998. Radiolytic Control of the Size of Colloidal Gold Nanoparticles. *Langmuir*, **14**, 7392-6.

[40] **Marignier, J. L., Beloni, J., Delcourt, M. O., Chevalier, J. P.,** 1985. Microaggregates of Non-noble Metals and Bimetallic Alloys Prepared by Radiation-Induced Reduction. *Nature*, **317**, 344-345.

[41] **Torigoe, K., Esumi, K.,** 1992. Preparation of Colloidal Gold by Photoreduction AuCl4 Cationic Surfactant Complexes, *Langmuir*, **8**, 59.

[42] **Cumberland, S. L., Strouse, G. F.,** 2002. Analysis of the Nature of Oxyanion Adsorption on Gold Nanomaterial Surfaces. *Langmuir*, **18**, 269-276.

[43] **Slot, J. W., Geuze, H. J.,** 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Europ. J. Cell Biol,* **38**, 87-93.

[44] **He, J. A., Valluzzi, R., Yang, K., Dolukhanyan, T., Sung, C., Kumar, J., Tripathy, S. K., Samuelson, L. A., Balogh, L., and Tomalia, D. A.,** 1999. Electrostatic Multilayer Deposition of a Gold-Dendrimer Nanocomposite, *Chem. Mater.*, **11**, 3268-3274.

[45] **Henglein, A.,** 2000. Preparation and optical absorption spectra of AucorePtshell and PtcoreAushell colloidal nanoparticles in aqueous solution. *J. Phys. Chem. B* **104**, 2201-3.

[46] **Henglein, A.,** 2000. Colloidal palladium nanoparticles: Reduction of Pd(II) by H2; PdcoreAushellAgshell particles. *J. Phys. Chem. B* **104**, 6683-85.

[47] **Elliot, D. J., Furlong, D. N., Grieser, F., Mulvaney, P., and Giersig, M.**, 1997. Preparation and Spectral Characteristics of Gold Particles in *Langmuir-Blodgett Films. Coll. Surf. A.* 141-150.

[48] **Hirai, H., Nakao, Y., Toshima, N.,** 1978. Preparation of Colloidal Rhodium in Polyvinylalcohol by Reduction with Methanol. *J. Macromol. Sci.-Chem. A* **12**, 1117-1141.

[49] **Hirai, H.,** 1979. Formation and Catalytic Functionality of Synthetic Polimer-Noble Metal Colloids. Macromol, *J., Sci.-Chem. A.* **13**, 633.

[50] **Longenberger, L., Mills, G.,** 1995. Formation of Metal Particles in Aqueous Solutions by Reactions of Metal Complexes with Polymers. *J. Phys. Chem.* **99**, 475-478.

[51] **Turkevich, J., Stevenson, P. C., Hillier, J.,** 1951. A Study of the Nucleation and Growth Processes in the Synthesis of Colloidal Gold. *Discuss. Faraday Soc.* **11**, 55-75.

[52] **Brust, M., Walker, M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Whyman, R.,** 1994. Synthesis of Thiol-derivatised Au Nanoparticles in a 2-phase Liquid-Liquid System *J. Chem. Soc. Commun.* pp.801-802.

[53] **Brust, M., Fink, J., M., Bethell, D., Schiffrin, D. J., Kiely, C.,** 1995. Synthesis and reactions of functionalised gold nanoparticles. *J. Chem. Soc. Commun.* pp1655 -1656.

[54] **Houston, J. E., Kim, H. I.,** 2002. Adhesion, Friction, and Mechanical Properties of Functionalized Alkanethiol Self-assembled Monolayers. *Acc. Chem. Res.* **35**, 547.

[55] **Bishop, A. R., Nuzzo, R. G.,** 1996. Self-Assembled Monolayers: Recent Developments and Applications. *Curr. Opinion. Coll. Interf. Sci. 1,* 127-136.

[56] **Mayya, K. S., Patil, V., Sastry, M.,** 1997. On the Stability of Carboxylic Acid Derivatized Gold Colloidal Particles: The Role of Colloidal Solution pH Studied by Optical Absorption Spectroscopy. *Langmuir* **13**, 3944-3947.

[57] **Templeton, A. C., Wuelfing, W. P., Murray, R. W.,** 2000. Monolayer-Protected Cluster Molecules. *Acc. Chem. Res.* **33**, 27-36.

[58] **Templeton, A. C., Chen, S., Gross, S. M., Murray, R.W.,** 1999. Water-Soluble, Isolable Gold Clusters Protected by Tiopronin and Coenzyme A Monolayers. *Langmuir*, **15**, 66-76.

[59] **Wuelfing, W. P., Gross, S. M., Miles, D. T.,** 1998. Nanometer Gold Clusters Protected by Surface-Bound Monolayers of Thiolated Poly(ethylene glycol) Polymer Electrolyte. *J. Am. Chem. Soc.* **120**, 12696-12697.

[60] **Chen, S., Murray, R. W.,** 1999. Arenethiolate Monolayer-Protected Gold Clusters. *Langmuir*, **15**, 682-689.

[61] **Hostetler, M. J., Murray, R. W.,** 1997. Colloids and Self- assembled Monolayers. *Curr. Opinion. Coll. Interf. Sci.* **2**, 42.

[62] **Otsuka, H., Akiyama, Y., Nagasaki, Y.,** 2001. Quantitative and Reversible Lectin-Induced Association of Gold Nanoparticles Modified with –lactosyl-mercapto-poly(ethylene gylcol), *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 8226-30.

[63] **McFadden, P.,** 2002. Broadband Biodetection: Holmes on a Chip, *Science*, **297**, 2075-6.

[64] **Jia, J., Wang, J., Wu, A., Cheng, G., Li, Z., Dong, S**., 2002. A Method to Construct a Third-Generation Horseradish Peroxidase Biosensor: Self-Assembling Gold Nanoparticles to Three-Dimensional Sol−Gel Network. *Anal. Chem,*.**74**, 2217-2223.

[65] **Chen, Z. J., Ou, X. M., Tang, F. Q., Jiang, L.,** 1996. Effect of Nanometer Particles on the Adsorbability and Enzymatic Activity of Glucose Oxidase. *Colloids and Surfaces B.* **7**, 173.

[66] **Patolsky, F., Ranjit, K. T., Lichtenstein, A., and Willner, I.,** 2000. Dendritic Amplification of DNA Analysis by Oligonucleotide-Functionalized Au-Nanoparticles. *Chem. Commun.*, **12**, 1025–1026.

[67] **Willner, I., Patolsky, F., Weizmann, Y., Willner, B., 2002.** Amplified Detection of Single-base Mismatches in DNA Using Microgravimetric Quartz-Crystal-Microbalance Transduction, *Talanta* **56**, 847-856.

[68] **Liu, T., Tang, J., Zhao, H., Deng, Y., and Jiang, L.,** 2002. Particle Size Effect of the DNA Sensor Amplified with Gold Nanoparticles. *Langmuir,* **18**, 5624-5626.

[69] **L. A. Lyon, L. A., Musick, M. D., and Natan, M. J.,** 1998. Colloidal Au-enhanced Surface Plasmon Resonance Immunosensing. *Anal. Chem.* **70**, 5177-5183.

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

[71] **Reynolds, R. A. III., Mirkin, C. A., Letsinger, R. L.,** 2000. Homogeneous, Nanoparticle-Based Quantitative Colorimetric Detection of Oligonucleotides. *J. Am. Chem. Soc.***122,** 3795-3796.

[72] **He, H., Tao, N.,** 2004. Electrochemical Fabrication of Metal Nanowires. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotecnology,* **10**, 1-18.

[73] **Yu, Y.Y.,** 1997. Gold Nanorods: Electrochemical Synthesis and Optical Properties. *J. Phys. Chem. B*, **101(34)**, 6661-6664.

[74] **Wirtz, C.R.M.,** 2003. Template-Fabricated Gold Nanowires and Nanotubes. *Advanced Materials*, **15(5)**, 455-458.

[75] **Murphy, C.J.,** 2005. Anisotropic Metal Nanoparticles: Synthesis, Assembly, and Optical Applications. *J. Phys. Chem. B,* **109**, 13857-13870.

[76] **Freitag, S., Le Trong, I., Klumb, L., Stayton, P. S., Stenkamp, R. E.,** 1997. Structural Studies of the Streptavidin Binding Loop. *Protein Science*, **6**, 1157-1166.

[77] **Diamand, E. P., Christopoulos, T. K.,** 1991. The Biotin-(Strept)Avidin System: Principlesand Applicationsin Biotechnology. *Clinical Chemistry*, **37**, 625-636.

[78] **Chaiet, L., Wolf, F. J.,** 1964. The Properties of Streptavidin, a Biotin Binding Protein Produced by Streptomyces. *Arch Biochem Biophys*, **106**, l-5.

[79] **Anonim** *<http://faculty.washington.edu/stenkamp/stefanieweb/strep2.gif>*, alındığı tarih 11.03.2009

[80] **Weber, P. C., Ohlendorf, D. H., Wendoloski, J. J., Salemme, F. R.,** 1989. Structural Origins of High-Affinity Biotin Binding to Streptavidin, *Science*, **243**, 85-88.

[81] **Anonim** *<http://www.nature.com/nprot/journal/v3/n2/images/nprot.2008.1-F2.jpg>,* alındığı tarih 05.05.2009

[82] **Lee, S., Perez-Luna V.,** 2005. Dextran-Gold Nanoparticle Hybrid Material for Biomolecule Immobilization and Detection. *Anal. Chem.* **77**, 7204-7211.

[83] **Simard, J., Briggs, C., Boal, A.,** 2000. Formation and pH-controled Assembly of Amphiphilic Gold Nanoparticles. *Chem. Comm.* 1943-1944.

[84] **Anonim** *<http://www.piercenet.com/Objects/View.cfm?type=ProductFamily & ID=02030312>*, alındığı tarih 05.05.2009

EKLER

EK A.1 : Çözeltilerin Hazırlanışı

EK A.1

- **1 mM 200 ml $HAuCl_4$ çözeltisi**

  M_{HAuCl4} = 393,83 g / mol.g

  M = n / V = (m / M_A) / V

  1 mM $HAuCl_4$ = (m / 393,83) / 200.10^{-3}

  m = 0,08 g $HAuCl_4$ tartılıp 200 ml suda çözülür.

- **66,3 mM 20 ml $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ çözeltisi**

  Sitrat/Au oranının 1:1 olması durumunda, çözeltilerin molaritelerinin eşit olması gerekmektedir.

  $M_{Na3C6H5O7.2H2O}$ = 294,1 g/mol.g

  n_{HAuCl4} = 1.10^{-3} mol/l x $220. 10^{-3}$ l

  = $2,2.10^{-4}$ mol.

  Sitrat/Au oranının eşit olması gerekmektedir;

  $m_{Na3C6H5O7.2H2O}$ = $2,2.10^{-4}$ mol x 294,1 g/mol.g

  = 0,065 g $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ tartılıp 20 ml suda çözülür.

  Deneyde kullanılan oran 6:1 için;

  0,065 g x 6 = 0,39 g $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ tartılıp 20 ml suda çözülür.

  $Na_3C_6H_5O_7.2H_2O$ çözeltisinin molaritesi;

  $M_{Na3C6H5O7.2H2O}$ = (0,39/294,1) / 20 ml

  = 66,3 mM

- **10 mM 500ml Sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi, pH=7**

  $M_{NaH2PO4.2H2O}$ = 156 g / mol.g

  m = 10.10^{-3} mol / l x 0,5 l x 156 g / mol.g

  = 0,78 g $NaH_2PO_4.2H_2O$ tartılıp 500 ml suda çözülür.

  pH = 7 olacak şekilde kuvvetli asit ve bazlarla titre edilir.

- **500 ml Tween-20 çözeltisi, pH = 7**

  $M_{Tween-20}$ = 1227,72 g / mol.g

  0,91 g. Tween-20 tartılıp, 500 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi içinde çözülür. pH = 7 olacak şekilde titre edilir.

- **0,5 mM 100ml 16-MHDA çözeltisi**

  $M_{16-MHDA}$ = 288,5 g / mol.g

  0,5 mM 16-MHDA = (m/288,5) / 100.10^{-3}

  m = 0,014425 g 16-MHDA tartılıp, 100 ml etanolde çözülür.

- **50 mM 1ml NHS çözeltisi**

  M_{NHS} = 115,09 g /mol.g

  50 mM NHS = (m / 115,09) / 1.10^{-3}

  m = 0,0575 g NHS tartılıp, 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi içinde çözülür.

- **200 mM 1 ml EDC çözeltisi**

  M_{EDC} = 191,7 g / mol.g

  200 mM EDC = (m / 191,7) / 1.10^{-3}

  m = 0,3834 g EDC tartılıp, 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisi içinde çözülür.

- **22 mM 1ml AEE çözeltisi**

  M_{AEE} = 105,14 g / mol.g

  d_{AEE} = 1,048 g / cm^3

  22 mM AEE = (m / 105,14) / 1.10^{-3}

  m = 0,0023 g AEE

  1,048 = 0,0023 / V

  V = 0,0022 ml = 2,2 µl AEE ölçülür, 1 ml sodyum fosfat monobazik çözeltisinde çözülür.

- **2,4 mM 1 ml BA çözeltisi**

  M_{BA} = 418,55 g / mol.g

  2,4 mM BA = (m / 418,55) / 1.10^{-3}

  m = 0,001 g BA tartılıp, 1 ml sodyum fosfat monobazik tampon çözeltisinde çözülür.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad:	Aylin GÜRSOYKONT
Doğum Yeri ve Tarihi:	Biga, 1983
Adres:	Bahçelievler Mah. Bosna Bulvarı, Altınköy1 Sitesi A1 Blok D:20 Çengelköy/Üsküdar Istanbul
Lisans Üniversite:	Yıldız Teknik Üniversitesi Kimya Mühendisliği