

MAYIS 2018

Yüksek Lisans - Kimya Bölümü

ÖKKEŞ ÇELİK

GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

*Legionella pneumophila*'nın YÜZEYDE  
ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA  
DAYALI HIZLI, HASSAS VE DOĞRU TANISI İÇİN  
YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

KİMYA BÖLÜMÜ

YÜKSEK LİSANS

ÖKKEŞ ÇELİK

MAYIS 2018

***Legionella pneumophila*'nın Yüzeyde Zenginleştirilmiş  
Raman Saçılmasına Dayalı Hızlı, Hassas ve Doğru Tanısı  
için Yöntem Geliştirilmesi**

**Gaziantep Üniversitesi**

**Kimya Bölümü**

**Yüksek Lisans**

**Danışmanlar**

**Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN**

**Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ**

**Ökkeş ÇELİK**

**Mayıs 2018**



© 2018 [Ökkeş ÇELİK]

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

Tezin Adı: *Legionella pneumophila*'nın Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılmasına Dayalı Hızlı, Hassas ve Doğru Tanısı için Yöntem Geliştirilmesi

Öğrencinin, Adı Soyadı: Ökkeş ÇELİK

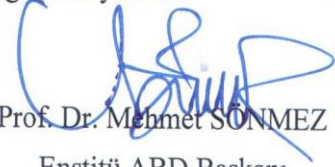
Tez Savunma Tarihi: 10/05/2018

Fen Bilimleri Enstitüsü onayı



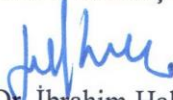
Prof. Dr. A. Necmeddin YAZICI  
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.



Prof. Dr. Mehmet SÖNMEZ  
Enstitü ABD Başkanı

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



Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ  
İkinci Tez Danışmanı



Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN  
Tez Danışmanı

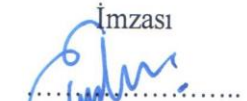


Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri :

Prof. Dr. Ekrem KİREÇÇİ

Doç. Dr. Hüseyin ZENGİN

Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN

İmzası  
  
  


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

**Ökkeş ÇELİK**

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT OF A METHOD FOR FAST, SENSITIVE AND ACCURATE DETECTION OF *Legionella pneumophila* BASED ON SURFACE ENHANCED RAMAN SCATTERING

ÇELİK, Ökkeş

M.Sc. in Chemistry Department

Supervisor: Assoc. Prof. Mehmet KAHRAMAN

Co-Supervisor: Assoc. Prof. İbrahim Halil KILIÇ

May 2018, 80 pages

Surface-enhanced Raman scattering (SERS) is a powerful technique for detection and identification of biological structures. SERS-based immunoassay methods are mostly used for the specific detection and identification of bacteria. In this study, a novel SERS-based immunobiosensor for detection of *Legionella pneumophila* was developed. First, SERS substrate is prepared by deposition of concentrated spherical silver nanoparticles (AgNPs) on a regular glass slides using convective assembly method. Second, the surface was modified with 4-aminothiophenol (4-ATP). 4-ATP was used not only to bound the antibody for *L. pneumophila* to the surface but also to monitor the changes in frequency of Raman peaks. Then the antibody is bound to the 4-ATP modified surface through amide bond. Finally, the modified surface is incubated with the bacteria and obtained SERS spectra from the surfaces. The changes in frequency of Raman peaks of 4-ATP molecule was monitored to detect the bacteria. The results demonstrated that, *L. pneumophila* can be detected with SERS-based immunobiosensor based on changes in frequency of Raman peaks of 4-ATP molecule.

**Keywords:** SERS, *L. pneumophila*, Detection, Bacteria, Immunobiosensor, Changes in Frequency

## ÖZET

### ***Legionella pneumophila*'nın YÜZEYDE ZENGİNLEŞTİRİLMİŞ RAMAN SAÇILMASINA DAYALI HIZLI, HASSAS VE DOĞRU TANISI İÇİN YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

**ÇELİK, Ökkeş**

**Yüksek Lisans Tezi, Kimya Bölümü**

**Tez Yönetici: Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN**

**Yardımcı Tez Yöneticisi: Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ**

**Mayıs 2018, 80 sayfa**

Yüzeyde zenginleştirilmiş Raman saçılımı (YZRS) biyolojik yapıların tespiti ve tanımlanması için güçlü bir tekniktir. YZRS dayalı immunoassay yöntemleri, özellikle bakterilerin spesifik tespiti ve tanımlanması için kullanılmaktadır. Bu çalışmada *Legionella pneumophila*'nın tespiti için yeni bir YZRS'ye dayalı immünobiosensör geliştirildi. İlk olarak, YZRS substratı, derişik yuvarlak gümüş nanoparçacıkların (AgNPs) bir cam slayt üzerine iletim derleme yöntemi kullanılarak biriktirme suretiyle hazırlandı. İkinci olarak, yüzey 4-aminotiyofenol (4-ATP) ile modifiye edildi. 4-ATP, sadece *L. pneumophila* için antikorun yüzeye bağlamak için değil, aynı zamanda Raman piklerinin frekansındaki değişiklikleri izlemek için de kullanıldı. Daha sonra antikor, 4-ATP ile modifiye edilmiş yüzeye amid bağı ile bağlandı. Son olarak, modifiye edilmiş yüzey, bakterilerle inkübe edildi ve yüzeylerden YZRS spektrumları elde edildi. Bakterileri tespit etmek için 4-ATP molekülünün Raman piklerinin frekanslarındaki değişiklikler izlendi. Sonuçlar, *L. pneumophila*'nın, 4-ATP molekülünün Raman piklerinin frekanslarında meydana gelen değişikliklere dayanarak YZRS'ye dayalı immünobiosensör ile tespit edebileceğini gösterdi.

**Anahtar Kelimeler:** YZRS, *L. pneumophila*, Tespit, Bakteri, İmmünobiosensör, Frekans Değişimleri



*Çok kıymetli aileme...*



## TEŞEKKÜR

Bu çalışma süresince tüm bilgilerini benimle paylaşmaktan kaçınmayan, her türlü konuda desteğini benden esirgemeyen ve tezimde büyük emeği olan, aynı zamanda hayata bakış açımı değiştiren Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden danışman hocam, Sayın Doç. Dr. Mehmet KAHRAMAN'a,

Çalışmamda büyük emeği olan mikrobiyoloji deneylerini yapan ve çok değerli yorumlarını esirgemeyen Gaziantep Üniversitesi öğretim üyelerinden ikinci danışman hocam, Sayın Doç.Dr. İbrahim Halil KILIÇ'a,

Gaziantep Üniversitemiz Tekstil Mühendisliği Bölümü Öğretim Üyesi Doç. Dr. Mehmet DAŞDEMİR'e

Tezimde emeği olan mikyobioloji deneylerini yapan çok değerli büyüğüm, Neşe ERDOĞAN'a, Kimya deneyleri aşamasında emeği olan değerli arkadaşım Gamze YAMAN'a

Sağlamış olduğu olanaklardan dolayı, Gaziantep Üniversitesi'ne

Bu çalışmada maddi destek sağlayan TÜBİTAK'a (214Z210 no'lu proje), ve aileme,

Sonsuz minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ABSTRACT .....	vi
ÖZET .....	vii
TEŞEKKÜR .....	viii
İÇİNDEKİLER.....	ix
TABLolar LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ .....	xviii
BÖLÜM 1.....	1
GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
BÖLÜM 2.....	6
GENEL BİLGİLER.....	6
2.1 Raman Spektroskopi .....	6
2.1.1 Raman Spektroskopinin Teorisi .....	6
2.1.2 Raman Spektrumlarının Uyarılması.....	7
2.1.3 Raman ve Rayleigh Saçılımının Mekanizması .....	8
2.1.4 Raman Cihazı .....	10
2.1.4.1 Işın Kaynakları .....	10
2.1.4.2 Raman Spektrometreleri.....	12
2.2 Plazmonik.....	13
2.3 Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopi.....	14
2.4 <i>Legionella pneumophila</i> .....	17
2.5 YZRS ile <i>Legionella pneumophila</i> 'nın Tanı Tayini .....	18

<b>BÖLÜM 3.....</b>	19
<b>MATERYAL VE METODLAR .....</b>	19
3.1 Kullanılan Cihazlar .....	19
3.2 Kullanılan Kimyasallar .....	19
3.3 Altın (AuNPs) ve Gümüş (AgNPs) Nanoparçacıkların Sentezi .....	20
3.4 YZRS Aktif Yüzeylerin Hazırlanması .....	22
3.5 YZRS Aktif Yüzeylerin Spesifik Antikorlarla Modifiye Edilmesi .....	23
3.6 <i>L. pneumophila</i> Stoklardan Canlandırılması.....	25
3.7 <i>L. pneumophila</i> için Doğrulama Testlerinin Yapılması.....	27
3.8 Mikroorganizmaların Derişimlerinin Ayarlanması.....	28
3.9 <i>L. pneumophila</i> Bakterilerin Antikorlarla Modifiye Edilen YZRS Aktif Yüzeylere Bağlanması .....	28
<b>BÖLÜM 4.....</b>	31
<b>BULGULAR VE TARTIŞMA .....</b>	31
4.1 Sentezlenen Nanoparçacıkların UV-Görünür Bölge Spektrofotometre ile Karakterizasyonu .....	31
4.2 Sentezlenen Nanoparçacıkların Zetasizer ile Karakterizasyonu .....	33
4.3 Sentezlenen Nanoparçacıkların AFM ile Karakterizasyonu .....	35
4.4 Sentezlenen Nanoparçacıkların Geçirimli Elektron Mikroskopu (TEM) ile Karakterizasyonu .....	38
4.5 YZRS Aktif Yüzeylerin Karakterizasyonu .....	39
4.6 YZRS Aktif Yüzeylerine Modifiye Edilen Spesifik Antikor Karakterizasyonu	50
4.7 YZRS Aktif Yüzeylere Bağlanan <i>L. pneumophila</i> Bakterilerin Karakterizasyonu .....	52
<b>BÖLÜM 5.....</b>	69
<b>SONUÇ.....</b>	69
<b>KAYNAKLAR .....</b>	73

## TABLULAR LİSTESİ

	<b>Sayfa</b>
<b>Tablo 2.1</b> Raman Spektroskopi için yaygın kullanılan lazer kaynakları.....	10
<b>Tablo 3.1</b> Patojen mikroorganizmalar için kullanılan antikorlar.....	29
<b>Tablo 4.1</b> AuNPs ve AgNPs Zetasizer analiz sonuçları.....	35
<b>Tablo 4.2</b> Farklı derişimlerdeki AgNPs yüzeylere inkübe edilen ATP molekülün C-S bağlarından elde edilen YZRS sinyallerinin pik değerleri.....	46
<b>Tablo 4.3</b> Çalışmalarda kullanılacak olan deney setleri.....	53
<b>Tablo 4.4</b> Baskıya bağlı olarak ATP moleküllerinden elde edilen spektrumların ortalama pik değerleri karşılaştırılması.....	64

## ŞEKİL LİSTESİ

### Sayfa

- Şekil 2.1** Dalga boyu 488 nm lazer ile uyarılan  $\text{CCl}_4$ 'ün Raman spektrumu (Strommen ve Nakamoto, 1981). ..... 8
- Şekil 2.2** Rayleigh ve Raman saçılmalarının Jablonski enerji-düzey diyagramı. .... 9
- Şekil 2.3** Bir Raman cihazının kısımları.....10
- Şekil 2.4** Antaresenin A) 514,5 nm'de argon-iyon kaynaklı normal Raman ve B) 1064 nm'de Nd-YAG kaynaklı bir FT-Raman cihazı ile alınmış spektrumları (Chase, 1987)..... 11
- Şekil 2.5** Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı (Chase, 1987)..... 12
- Şekil 2.6** a) yayılan yüzey plazmonları, b) lokalize (yayılmayan) yüzey plazmonları (Jensen vd., 2000)..... 13
- Şekil 2.7** Küresel bir nanoparçacıktaki LSPR'ların elektromanyetik uyarımının gösterimi. b) sitratla indirgenmiş gümüş kolloitlerin uyarımı. Gümüş NPs etrafında elektromanyetik alan zenginleştirmenin teorik simülasyonu. c) üçgen nanoparçacık (700 nm), d) küresel nanoparçacık ikilisi (520 nm), e) eliptik nanoparçacık (695 nm) (Hao ve Schatz, 2004). ..... 15
- Şekil 3.1** Metal tuzlarından kimyasal indirgeme yöntemi ile metalik nanoparçacıkların hazırlanmasının şematik gösterimi. .... 20
- Şekil 3.2** 13 nm AuNPs süspansiyonunun fotoğrafı. .... 20
- Şekil 3.3** 50-60 nm AgNPs süspansiyonunun fotoğrafı..... 21
- Şekil 3.4** İletim derleme yönteminin düzenek görüntüsü ..... 23
- Şekil 3.5** Sentezlenen nanoparçacıkların iletim-derleme yöntemi kullanılarak cam slide yüzeyine düzenli olarak biriktirilmesinin şematik gösterimi. ... 23

<b>Şekil 3.6</b> Antikorun karboksil ucunun EDC/NHS ile aktifleştirilmesi. ....	24
<b>Şekil 3.7</b> Model mikroorganizma için spesifik antikorların yüzeye kovalent olarak bağlanmasının şematik gösterimi .....	24
<b>Şekil 3.8</b> Deneylerde kullanılan eppendorf thermomixer cihazının fotoğrafı. ....	25
<b>Şekil 3.9</b> A) Kwikstik 0211 P referans stok kültüründen <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 B) BCYE C) SR 1 <i>L. pneumophila</i> ATCC 33152 36 saat inkübasyondan sonra BCYE besiyerinde D) Halk sağlığı laboratuvarından alınan SR 2-14 <i>L. pneumophila</i> 36 saat inkübasyondan sonra BCYE besiyerinde E) Stok kültürlerden canlandırılan <i>L. pneumophila</i> SR1 bakteri kolonileri F) Stok kültürlerden canlandırılan <i>L. pneumophila</i> SR2-14 bakteri kolonileri G) <i>L. pneumophila</i> ışık mikroskobu görüntüsü. ....	27
<b>Şekil 3.10</b> OXOID DR0800M Legionella Latex Test ve <i>L. pneumophila</i> Serogrup 1 ve Serogrup 2-14 aglünitasyonu. ....	28
<b>Şekil 3.11</b> Yapılan tüm deneysel basamakların şematik gösterimi ve AFM görüntüleri .....	30
<b>Şekil 4.1</b> AgNPs UV-görünür bölge absorbans spektrumu. ....	31
<b>Şekil 4.2</b> AuNPs UV-görünür bölge absorbans spektrumu .....	32
<b>Şekil 4.3</b> AuNPs ve AgNPs absorbans spektrumları. ....	32
<b>Şekil 4.4</b> AgNPs büyüklük dağılım grafiği.....	33
<b>Şekil 4.5</b> AuNPs büyüklük dağılım grafiği.....	33
<b>Şekil 4.6</b> AuNPs ve AgNPs büyüklük dağılım grafiği. ....	34
<b>Şekil 4.7</b> Süspansiyon ortamındaki AgNPs AFM görüntüleri A) 10x10 µm .....	36
B) 5x5 µm C) 1x1 µm. ....	36
<b>Şekil 4.8</b> Süspansiyon ortamındaki AuNPs AFM görüntüleri A) 5x5 µm) B) 1x1 µm.....	36
<b>Şekil 4.9</b> 50 nm AgNPs AFM görüntüsünün çizgi analizi .....	37
<b>Şekil 4.10</b> 13 nm AuNPs AFM görüntüsünün çizgi analizi.....	37

<b>Şekil 4.11</b> 13 nm AuNPs farklı büyütmelelerdeki TEM görüntüleri.....	38
<b>Şekil 4.12</b> 50-60 nm AgNPs TEM görüntüsü.....	39
<b>Şekil 4.13</b> Cam lam üzerine farklı derişimlerde AgNPs biriktirilmesiyle oluşturulan ince filmlerin fotoğrafları. ....	39
<b>Şekil 4.14</b> Farklı derişimlerde AgNPs kullanılarak hazırlanan ince filmlerin ışık mikroskop görüntüleri .....	40
<b>Şekil 4.15</b> Farklı derişimlerde AuNPs kullanılarak hazırlanan ince filmlerin ışık mikroskop görüntüleri. ....	41
<b>Şekil 4.16</b> AgNPs ince film AFM görüntüleri A) 10X10 µm B) 5X5 µm C) 1X1 µm.....	42
<b>Şekil 4.17</b> AgNPs ince film AFM 3D görüntüleri. ....	43
<b>Şekil 4.18</b> AuNPs ince film AFM görüntüleri A) 10X10 µm B) 5X5 µm C) 1X1 µm.....	43
<b>Şekil 4.19</b> AuNPs ince film AFM 3D görüntüleri .....	44
<b>Şekil 4.20</b> AgNPs filmin SEM görüntüsü.....	44
<b>Şekil 4.21</b> Farklı derişimdeki AgNPs yüzeyleri üzerindeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları. ....	45
<b>Şekil 4.22</b> Farklı derişimdeki AuNPs yüzeylerine inkübe edilen ATP moleküllerinin YZRS spektrumları. ....	47
<b>Şekil 4.23</b> Farklı derişimlerdeki AgNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerdeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları.....	48
<b>Şekil 4.24</b> AgNPs ve AuNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerdeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları.....	49
<b>Şekil 4.25</b> Hazır alınan Ag yüzeylerin SEM görüntüleri. ....	50
<b>Şekil 4.26</b> A) AgNPs ince film ve B) AgNPs ince film yüzeylerine bağlanan Antikorların AFM görüntüleri. ....	50
<b>Şekil 4.27</b> A) AgNPs ince film ve B) AgNPs ince film yüzeylerine bağlanan antikorların AFM 3D görüntüleri. ....	51

<b>Şekil 4.28</b> Antikor ile modifiye edilen AgNPs ince filmin farklı tarama alanlarındaki AFM görüntüleri A) 10X10 µm B) 5X5 µm C) 2X2 µm....	51
<b>Şekil 4.29</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> Ab69239 antikorlara bağlanan <i>L. Pneumophila</i> bakterilerinin SEM görüntüsü. ....	52
<b>Şekil 4.30</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> Ab69239 antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeye bağlanan <i>L. pneumophila</i> SR 2.14 bakterilerinin AFM görüntüleri A) 20x20 µm B) 5x5 µm C) 2x2 µm D) 2x2 µm (3D).....	53
<b>Şekil 4.31</b> ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları. ....	54
<b>Şekil 4.32</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab65287) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları. ....	55
<b>Şekil 4.33</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab65287) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye <i>L. pneumophila</i> (ATCC 3352) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları. ....	55
<b>Şekil 4.34</b> ATP, Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye <i>L. pneumophila</i> (ATCC3352) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması. ....	56
<b>Şekil 4.35</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları. ....	57
<b>Şekil 4.36</b> Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye <i>L. pneumophila</i> SR1 (İzolat 2) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları. ....	58
<b>Şekil 4.37</b> ATP, Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye <i>L. pneumophila</i> SR1 (İzolat 2) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması. ....	59



- Şekil 4.38** Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoruyla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YZRS spektrumları.....60
- Şekil 4.39** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması. .... 61
- Şekil 4.40** Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoruyla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 3) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YZRS spektrumları... 62
- Şekil 4.41** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 3) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması..... 63
- Şekil 4.42** YZRS aktif yüzeylerin şık mikroskop görüntüleri, Sol: Spesifik olmayan bakterilerin (*E.coli*) yüzeye bağlanması, Sağ: Spesifik olan bakterilerin (*L. pneumophila* (İzolat 2) yüzeye bağlanması. .... 65
- Şekil 4.43** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 2) bakterilerinin ve *E. coli* bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması. .... 66
- Şekil 4.44** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterilerinin ve *P. aeruginosa* bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.. 68

## SEMBOLLER VE KISALTMALAR LİSTESİ

SEM	: Taramalı Elektron Mikroskobu (Scanning Electron Microscopy)
AFM	: Atomik Kuvvet Mikroskobu (Atomic Force Microscopy)
SERS	: Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Saçılması (Surface-Enhanced Raman Scattering)
ATP	: 4-Aminotiyofenol (4 Aminothiophenol)
$\lambda$ LSPR	: Yüzey Plazmon Absorbsiyon Dalga Boyu
$\lambda_{exc}$	: Uyarma Dalga Boyu
$\lambda$ RS	: Raman Sinyali
NPs	: Nanoparçacıklar
SPs	: Yüzey Plazmonları (Surface Plasmons)
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans Spektroskopisi (Surface Plasmon Resonance)
LSPR	: Lokalize Olmuş Yüzey Plazmon Rezonans (Localized Surface Plasmon Resonance)
S	: Standart Sapma
RFLP	: Sınırlandırılmış Parça Uzunluğu Polimorfizm (Restriction Fragment Length Polymorphism)
AFLP	: Çoğatılmış Parça uzunluk polimorfizm
PCR	: Polimer Zincir Reaksiyonu
AgNPs	: Gümüş Nanoparçacık
AuNPs	: Altın Nanoparçacık

## BÖLÜM 1

### GİRİŞ VE AMAÇ

Patojenlerin hızlı, doğru ve hassas tanısı sadece klinik uygulamalarda değil, endüstriyel uygulamalarda da çok önemlidir. Klinik uygulamalarda, bakteri, mantar ve virüs gibi patojenlerin hızlı tanısı, hastanın hayatta kalması ile doğrudan ilgili olup hastaların ölüm oranını düşürebilmektedir. Patojen ve patojen olmayan kontaminasyonların ayırt edilmesi, endüstriyel uygulamalarda kritik bir yere sahiptir. Örneğin, gıda ve ilaç endüstrisinde önemli bir yer teşkil etmektedir.

Mikroorganizmaların tanısı, en az bir gün ve genellikle de daha fazla sürmektedir (Al-Khaldi ve Mossoba, 2004). Tedaviye bir an önce başlanabilmesi için mikroorganizmaların tanısı olabildiğince hızlı ve doğru yapılmalıdır. Mikroorganizma tanısı için fenotipik ve genotipik metodlar kullanılmaktadır. Fenotipik metodlar grubunda birçok klasik testlerin (biyokimyasal, fizyolojik, patolojik, morfolojik) yanısıra (Lelliot ve Stead 1987; Swing ve Civerolo, 1993), bazı moleküler tekniklerde (yağ asit analizi, protein profillemeye, serolojik testler) (Bouzar vd., 1994) kullanılmaktadır. Klasik teknikler çok zaman alıcı, maliyetli ve kişiye göre değişebilen sonuçlarından dolayı çok tercih edilmemektedir. Fenotipik tekniklerden yağ asit analizi (FAME) kültüre alınabilen bütün mikroorganizmaların tanısında kullanım olanağı olan, ekonomik ve güvenilir bir tanı yöntemi olarak bilinir (Sasser, 1990). Bu sistem gaz kromatografisi yöntemi olup mikroorganizmaların yağ asit profillerine göre tanı yapmaktadır. Mikroorganizmaların hücre duvarları her birine özgü olduğundan bu sistemle tanı yapılabilmektedir. Ancak bu yöntem için hücrelerin yağ asit izolasyonları yapılması gerekmektedir. Buna ek olarak bunları uçucu türevlerine dönüştürmek gerekmektedir. Çünkü gaz kromatografisinde uçucu bileşikler analiz edilebilmektedir. Bunun için yağ asitlerinin metil esterleri oluşturularak uçucu hale dönüştürülürler. Ancak bu yöntemdeki dezavantaj, prosesin uzun oluşudur. Nükleik asit (genetik) tabanlı teknikler yaygın olarak mikrobiyal tanıda kullanılmaktadır. Bu tekniklerden RFLP, AFLP ve PCR genomik tanıda en yaygın olarak tercih edilirler (Louws vd.,

1995). Bu yöntemler için yetişmiş insanlara ihtiyaç vardır. Fakat yüksek maliyetli olması ve zaman alıcı olması yöntemin dezavantajıdır.

Mikroorganizma tanı ve karakterizasyonu için yukarıda belirtilen yöntemlere alternatif olarak spektroskopik yöntemler de kullanılmaktadır. Bu yöntemleri kütle ve titreşimsel spektroskopiler olarak ikiye ayırabiliriz. Kütle spektroskopisi mikroorganizma tanısında kullanılmıştır (Claydon vd., 1996; Goodacre vd., 1996; Haag vd., 1998). Kütle spektroskopisi yöntemi çok pahalı olduğundan fazla tercih edilmemektedir. Son yıllarda titreşimsel spektroskopisi teknikleri mikroorganizma tanı ve karakterizasyonu için ümit vaat etmektedir (Maquelin vd., 2002b, 2003). Bunlar infrared (IR) ve Raman spektroskopik yöntemleridir. Bu yöntemlerde her moleküle özgü parmak izi özelliklerinden dolayı kimyasal ve biyolojik yapılardan çok kısa sürede bilgi alınabilmektedir. Bu iki yöntem de titreşimsel spektroskopidir. Ancak temel olarak birbirinden farklıdır. IR dipol moment değişikliğine bağlı absorpsiyon spektrumu verirken, Raman polarite değişimine bağlı saçılma spektrumu vermektedir. IR spektroskopisi mikroorganizma tanısı için kullanılmıştır (Naumann vd.,1991; Naumann, 2000). Ancak IR spektroskopisi yöntemi kullanılması bir takım dezavantajları birlikte getirmektedir. Bunlar, suyun spektruma girişim yapması, örnek hazırlamanın zahmetli ve uzun olması ve spektrumların karmaşık olmasıdır. Son yıllarda Raman spektroskopisi mikroorganizma tanısı için güçlü bir teknik olarak görülmektedir. IR spektroskopisine göre iki büyük avantajı vardır. Suyun spektruma az girişim yapması ve örnek hazırlamanın çok daha kolay ve hızlı olmasıdır. Bu özelliklerinden dolayı mikroorganizma tanısı için ideal bir araç olarak düşünülmektedir. Çünkü mikroorganizmalar genellikle biyolojik ortamlarda bulunduğu için sulu örneklerdir ve Raman spektroskopisi ile kolayca analiz edilebilmektedir. Raman spektroskopisinde alınan spektrumlar her moleküle özgü parmak izi taşımaktadır. Bu özelliğinden faydalanarak kimyasal ve biyolojik moleküllerden bilgi alınabilmektedir. Ancak Raman spektroskopisinin kullanımının bir kaç dezavantajı vardır. Raman saçılmasının zayıf ve floresansın spektruma girişim yapmasıdır. Floresans girişimi daha az enerjili daha uzun dalga boylu lazerler kullanılarak elimine edilmeye çalışılmıştır (Chase, 1987). Saçılmayı zenginleştirmek için de soy nanometaller kullanılmaktadır ve bu yöntemde Yüzeyde Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi (YZRS) denilmektedir. Bu yöntemi ilk olarak Jeanmaire ve

Van Duyne (1977) , Albrecht ve Creighton (1977) keşfetmişlerdir. Kullanılan soy nanometallere Raman substratı denilmektedir, bu substratlar: nano yüzeyler, metalik nanoparçacıklar ve düzenli bir yapıda olan iki ve üç boyutlu yapılar olabilmektedir (Lee ve Meisel, 1982; Tessier vd., 2000; Lu vd., 2005; Hossain vd., 2007). Birçok grup tarafından mikroorganizma tanısı için Raman spektroskopisinin kullanılabilirliği ortaya konulmuştur (Manoharan vd., 1990; Maquelin vd., 2000, 2002a, 2006; Jarvis ve Goodacre, 2004c; Lopez-Diez ve Goodacre, 2004). İlk olarak Raman spektroskopisi kullanılarak mikroorganizma tanısının yapılabileceği Maquelin tarafından 2000 yılında ortaya konulmuştur (Maquelin vd., 2000). Ancak normal Raman'da saçılma zayıf olduğundan uzun süre lazerin örnek üzerinde kalması gerekmektedir. İlk olarak mikroorganizma tanısında yüzeyde zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi 1998'de Efrima ve Bronk (1998) tarafından kullanılmıştır. Yapılan bu çalışmada gümüş nanoparçacıklar bakteri ile birlikte indirgenerek elde edilmiştir. Goodacre ve çalışma arkadaşları (2004,2006) nanoparçacıklarla bakterileri basit bir şekilde karıştırarak tanı yapmışlardır. Birçok grup bu alanda çalışmaktadır (Efrima vd., 1998, 1999; Jarvis vd., 2004a; 2004b; 2006, Sengupta vd., 2005, 2006; Zeiri vd., 2002, 2004; Premasiri vd., 2005).

Yapılan çalışmalarda bakıldığında kullanılan örnek hazırlama metodları birbirinden farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılıklar spektrumların kalitesini ve tekrarlanabilirliğini etkilemektedir. Jarvis (2004b) tekrarlanabilirlik sorununu çözmeye çalışmış ve bunun için, Raman cihazıyla elektron mikroskopunu eşleştirerek bakterinin nerede olduğunu tespit etmiş ve oradan spektrum almıştır. Ancak alınan spektrumların kalitesi ve zenginliği çok zayıftır. Daha basit yöntemlerle daha fazla tekrarlanabilir ve zengin spektrum almak için çeşitli örnek hazırlama yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin birinde kullanılan nanoparçacık derişimi sentezlendiği derişime bağlı olarak 4 kat artırıldığında hem tekrarlanabilirlik hem de spektrum zenginliği elde edilmiştir (Kahraman vd., 2007). Yapılan bir diğer çalışmada iletim derleme yöntemi (convective-assembly) ile nanoparçacıklar ile bakteriler düzenli bir şekilde cam yüzeye biriktirilerek YZRS spektrumları alınmıştır (Kahraman vd., 2008). Elde edilen YZRS spektrumları basit karıştırma yöntemi ile elde edilen spektrumlar ile karşılaştırıldığında hem spektral zenginlik hem de tekrarlanabilirlik bazında çok iyi sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmalarda yeterli miktarda bakteri derişimine

ihtiyaç vardır. Ancak düşük derişimlere sahip örneklerde bu örnek hazırlama yöntemleri çok iyi sonuç vermemektedir. Çünkü bakteri derişimi az olduğu durumlarda mikroorganizmaların nanoparçacıklar ile etkileşimi azalmakta ve buna bağlı olarak hem tekrarlanabilirlik sorunu hem de spektrum elde edememe sorunu ortaya çıkmaktadır. Bu dezavantajları ortadan kaldırmak için katman katman bir araya gelme tekniği ile (layer-by-layer) nanoparçacıklar bakterilerin üzerine tutturularak YZRS spektrumu alınmıştır (Kahraman vd., 2009). Bakteriler nanoparçacıklarla modifiye edildikten sonra seyreltikleri halde nanoparçacıklar yüzeyde olduğu için tek bir bakteriden bile YZRS spektrumu alınmıştır. Böylelikle bu yöntemle tek molekül ile mikroorganizma tanısı yapılabilmektedir. Raman spektrumlarının pik genişliğinin çok dar olmasından dolayı çoklu analize imkan veren (multiplexing) bir tekniktir. Literatürde bu özelliğini kullanılarak mikroorganizmaların çoklu analizinin yapılabileceği gösterilmiştir (Cam vd., 2010).

Aynı strainleri bile çok kolay ayırt edilebilmektedir. Ayrıca mayalarında YZRS tekniği ile tanısının yapılabileceği gösterilmiştir (Sayin vd.,2009). Yapılan tüm bu çalışmalara bakıldığında işaretleyici molekül kullanmadan (label-free) bakterilerin veya mayaların moleküler yapı farklılığından kaynaklanan ve her mikroorganizmaya özgü parmak izi özelliği kullanılarak tanı ve tayin yapılabilirliği gösterilmiştir. Son yıllarda en çok tartışılan konu elde edilen YZRS spektrumun bakterilerin besiyerinden mi, metabolitlerinden mi yoksa bakteriden mi kaynaklandığı idi. Ancak yapılan son çalışmalar YZRS spektrumunun bakterinin hücre duvarından geldiğini ve hücre duvarındaki küçük farklılıklardan dolayı YZRS spektrumunda farklılıklar elde edildiğini göstermektedir (Kahraman vd., 2011). Şu ana kadar yapılan çalışmalara bakıldığında hep saf kültürlerdeki mikroorganizmalar kullanılarak bu yöntemin mikroorganizma tanısındaki kullanılabilirliği test edilmiştir. Çalışmalar genel olarak hem tekrarlanabilir hem de spektral olarak zengin spektrum elde etmek için örnek hazırlama üzerine yapılmaktadır. Tekrarlanabilir olması doğru tanı için önem arz etmektedir. Spektral zenginlik (spektrumdaki pik sayısının fazlalığı) ise mikroorganizmaların birbirinden kolaylıkla ayırt edilmesi (tanısı) için son derece önemlidir. Bu iki parametre istenilen düzeyde ise hem doğru hem de hassas tayin yapılabilecektir. Ayrıca YZRS deneylerinde substrat olarak kullanılan nano malzemelerin YZRS zenginleştirme faktörü de (Raman saçılmasının kaç kat

zenginleştigi/arttığı) deneylerde son derece önemlidir. Zenginleştirme faktörü ile gözlenebilme sınırı (limit of detection) ters orantılıdır. Eğer kullanılan YZRS substratının zenginleştirme faktörü büyük ise analit için gözlenebilme sınırı düşük demektir. Bu da analitik uygulamalarda çok büyük önem arz etmektedir. Ancak klinik ya da endüstriyel uygulamalarda mikroorganizmalar saf halde bulunmamaktadır. Bu mikroorganizmaların tanısı için öncelikle saf kültür elde edilmesi daha sonra tanısının yapılması gerekmektedir. Bu hem klasik tanıda hem de YZRS dayalı tanıda gereklidir. Bir karışımındaki mikroorganizmalardan herhangi birinin kültüre alınmadan, saflaştırılmadan ve spesifik olarak hızlı, hassas ve doğru tanısı klinik uygulamalarda aranılan ve istenen yöntemdir.

Bu tezde işaretleyici molekül kullanmadan YZRS'ye dayalı klinik öneme sahip *L. pneumophila* mikroorganizması için immunoassay'a dayalı yeni yöntemler geliştirilmiştir. Bu çalışmada seçilen model bakteri antikorunu YZRS aktif yüzeye kimyasal olarak bağlanmıştır. Daha sonra hedef mikroorganizma ile inkübe edilerek antikor yüzeyine bağlanması sağlandı. YZRS spektrumları alındığında antikor molekülünün altında ve YZRS yüzeyine bağlı olan küçük molekülün Raman spektrumundaki bazı piklerin dalga sayılarında stresden dolayı bir kayma oldu. Bu kaymaları kullanarak tanı ve tayinin yapılabilirliği araştırıldı.

## BÖLÜM 2

### GENEL BİLGİLER

#### 2.1 Raman Spektroskopisi

Işın demeti şeffaf bir ortamdan geçtiği zaman radyant gücün bir kısmı, demetin geliş yönüne göre çeşitli açılarla her yönde saçılır. Ortamdaki tanecikler moleküler boyutlardaysa saçılan ışın gözle saptanamaz; buna "Rayleigh saçılması" denir. Ortamdaki tanecikler ışının dalga boyu ile kıyaslanabilir boyutlarda olursa saçılma, Tindal etkisi veya bulanıklık şeklinde gözlenebilir.

Hintli fizikçi C.V. Raman, bazı moleküller tarafından saçılan az miktardaki ışının dalga boyunun gelen demetin dalga boyundan farklı olduğunu ve dalga boyundaki kaymaların saçılmaya neden olan moleküllerin kimyasal yapısına göre değiştiğini keşfetti (1928); buluşu ve sistematik açıklamalarıyla 1931'de fizik Nobel ödülünü kazandı. Raman saçılmasının teorisine göre olay, IR absorpsiyonla aynı tip kuvantize titreşim değişikliklerinin sonucudur. Gelen ve saçılan ışın arasındaki dalga boyu "farkı" orta-IR bölgeye düşer. Bir taneciğin Raman saçılması ve IR absorpsiyon spektrumları birbirine çok benzer. Bu iki teknik birbirinin tamamlayıcısı niteliğindedir, IR aktif bir grup Raman inaktif, veya Raman aktif bir grup IR inaktif olabilir. Bazı sorunların çözümünde IR yöntem, bazıları içinse Raman yöntemi avantajlıdır (Ferraro ve Nakamoto, 1994).

Raman ve Infrared (IR) spektrumları arasında benzerlikler vardır. Bu iki yöntem aynı temele dayanan birbirinin tamamlayıcısı gibi görülmelidir çünkü Raman aktif gruplar ile IR aktif gruplar birbirinden oldukça farklıdır. Raman spektroskopisinde suyun genel bir çözücü olarak kullanılması, IR' ye göre önemli bir üstünlüktür. Ayrıca, Raman spektroskopisinde sodyum klorür ve atmosferden etkilenebilen diğer pencere malzemeleri kullanılmama zorunluluğu yoktur çünkü Raman sinyalleri görünür ve yakın-IR bölgede olduğundan kuvars ve cam hücreler kullanılabilir.



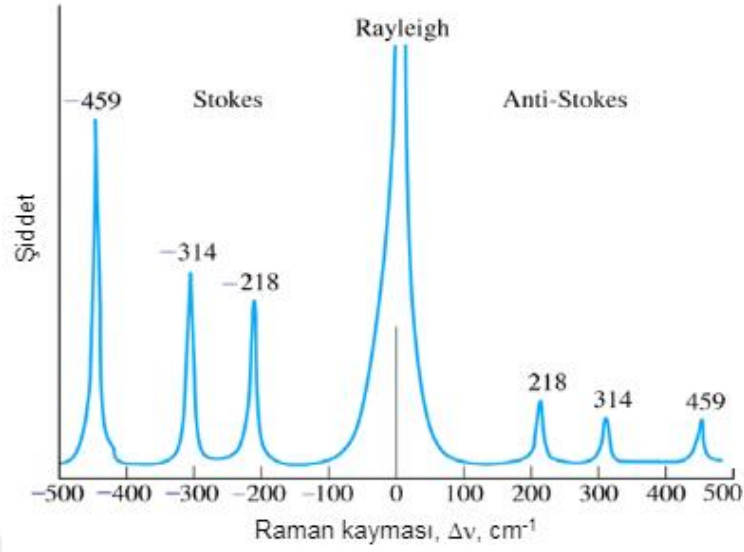
### 2.1.1 Raman Spektroskopinin Teorisi

Raman spektra bir örneğin, kuvvetli bir görünür monokromatik ışın kaynağı ile ışınlandırılmasıyla elde edilir. İlk çalışmalarda bir civa arkı kullanılmıştır; şimdi yüksek şiddetli gaz veya katı lazer kaynakları kullanılmaktadır. Işınlandırma sürecince saçılan ışının spektrumu uygun bir görünür-bölge spektrofotometre ile, çoğunlukla 900 açıda ölçülür. Raman hatlarının şiddetleri çoğu zaman kaynağın %0.01'i kadardır; bu durum algılama ve ölçmelerde bazı deneysel sorunlarla karşılaşılmasına neden olur.

### 2.1.2 Raman Spektrumlarının Uyarılması

Saçılan ışın; stokes saçılımı, anti-stokes saçılımı ve Rayleigh saçılımı olmak üzere üç çeşittir. Stokes saçılmasında yayılan ışının frekansı uyaran ışınınkinden daha küçüktür. Anti-Stokes saçılması, frekansı kaynak ışınınkinden daha yüksek olarak saçılan ışınlardır. Rayleigh saçılması ise enerjisi, uyaran fotonun enerjisi  $h\nu_{ex}$  olan esnek çarpışmalardır. Şekil 2.1'de 488 nm ( $20492\text{ cm}^{-1}$ ) dalga boylu argon iyonu lazerinin yoğun bir demetiyle ışınlanmasıyla, karbon tetraklorür numunesinden elde edilen Raman spektrumunun bir bölümü verilmektedir.

Şekil 2.1'de görüldüğü gibi genellikle Raman spektrumlarında yatay eksen; dalga kayması  $\Delta\nu$  olup, gözlenen ışının ve kaynağın dalga sayıları ( $\text{cm}^{-1}$ ) arasındaki fark olarak tanımlanır. Rayleigh pikinin her iki yanında, iki taraftaki kayma düzenleri özdeş olan üç adet Raman piki bulunması dikkat çekicidir. Bununla birlikte stokes çizgileri Rayleigh pikinden  $218, 314$  ve  $459\text{ cm}^{-1}$  daha küçük dalga boyunda çıkarken, anti-stokes pikleri kaynağın dalga sayısından  $218, 314, 459\text{ cm}^{-1}$  daha büyük dalga sayılarında görülür. Anti-stokes çizgileri bunlara karşılık gelen stokes çizgilerinden çok daha az şiddetli olması sebebiyle genel olarak sadece stokes kısmı kullanılır. Floresansın, anti-Stokes bölgesine değil, Stokes bölgesine ciddi girişim yapması nedeniyle floresans gösteren numunelerde anti-Stokes sinyalleri daha düşük şiddetlerine rağmen daha yararlıdır.



**Şekil 2.1** Dalga boyu 488 nm lazer ile uyarılan CCl<sub>4</sub>'ün Raman spektrumu (Strommen ve Nakamoto, 1981).

### 2.1.3 Raman ve Rayleigh Saçılımının Mekanizması

Şekil 2.2'teki enerji-düzey diyagramı Raman ve Rayleigh saçılımlarının kökenine ilişkin nicel bir açıklama getirir. Kaynaktan gelen bir fotonla etkileştiğinde moleküldeki enerji değişimi en soldaki koyu renkli okla gösterilmektedir ve enerjideki artış, foton enerjisine ( $h\nu$ ) eşittir. Molekülün enerjisi, kaynaktan gelen ışının frekansına bağlı olarak temel hal ile birinci elektronik uyarılmış hal arasında sanal haller diye bilinen sonsuz sayıdaki değerlerden herhangi birini alabilir. Fotonla karşılaşan molekülün, elektronik temel halin birinci titreşim seviyesinde bulunması durumunda ortaya çıkabilecek değişimini gösteren ok soldan ikinci ve daha ince olanıdır. Bu haldeki moleküllerin oda sıcaklığında bulunma ihtimali düşüktür.

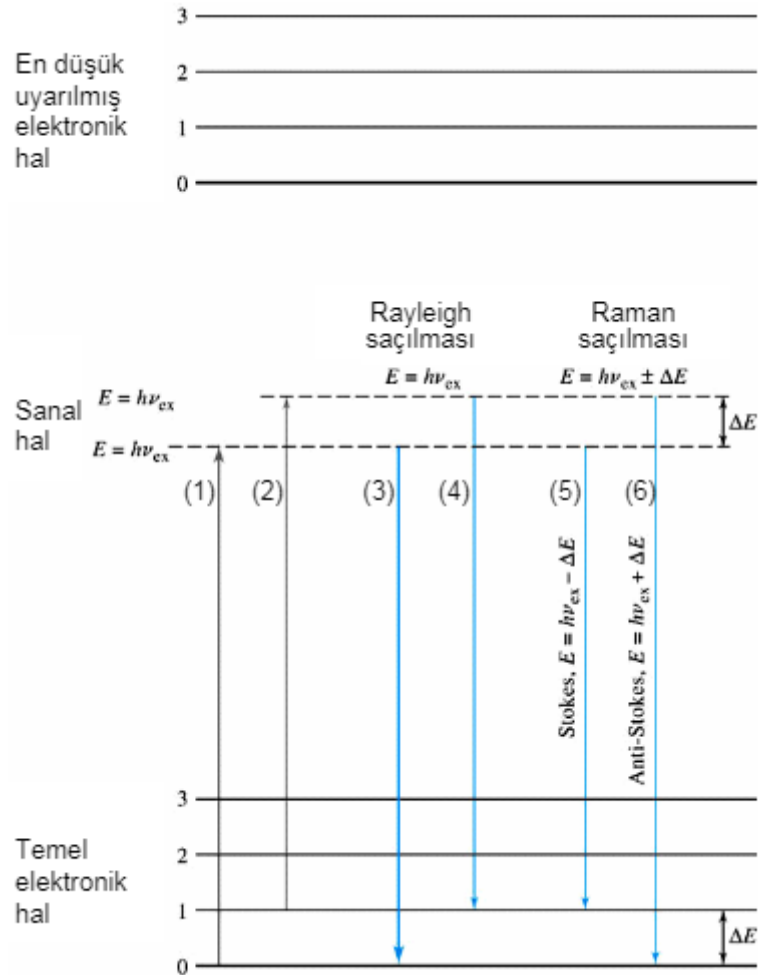
Rayleigh saçılımlarını oluşturan değişimleri ortadaki iki ok açıklar. Kalın okla gösterilen daha olası olan durumdur. Enerji diyagramında görüldüğü gibi Rayleigh saçılımında enerji kaybı olmamakla birlikte foton ve molekül arasındaki çarpışmaların esnek olduğu söylenir.

Sağ tarafta ise Stokes ve anti-Stokes emisyonunu oluşturan enerji değişimleri verilmektedir. Stokes ve anti-Stokes saçılımı Rayleigh ışınından temel halin birinci

titreşim düzeyinin enerjisi olan  $\pm\Delta E$ 'ye karşılık gelen frekanslar kadar farklıdır.

Infrared aktif bağlarda bağın absorpsiyon enerjisinin de  $\Delta E$  kadar olacağına dikkat ediniz. Böylece Raman frekans kayması ve infrared absorpsiyon pik frekansı özdeşdir.

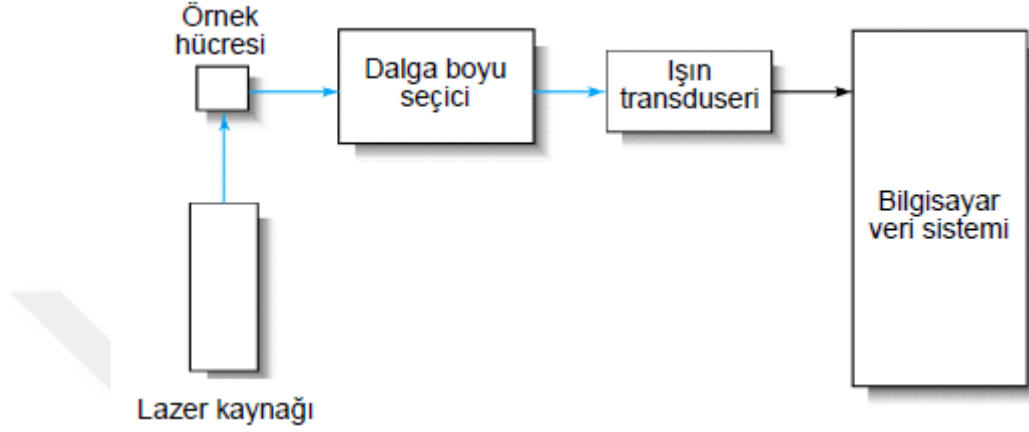
Bu iki üst enerji halinin bağlı bolluklarının, Stokes emisyonunun anti-Stokes emisyonuna göre daha çok tercih edilecek biçimde bulunması dikkat çekicidir. Rayleigh saçılımı Raman saçılımına göre oldukça yüksek bir ihtimalde gerçekleşir. Çünkü temel haldeki moleküllere enerji aktarımı ve sonra uyarılan moleküllerin temel hale geri dönerken yeniden ışın yaymaları ihtimali en yüksek olaydır. Son olarak sıcaklık arttıkça birinci titreşimsel uyarılmış haldeki moleküllerin sayısı artacağından, Stokes ve anti-Stokes şiddet oranı sıcaklıkla artar.



Şekil 2.2 Rayleigh ve Raman saçılmalarının Jablonski enerji-düzey diyagramı.

## 2.1.4 Raman Cihazı

Modern Raman cihazı; lazer kaynağı, numune aydınlatma sistemi ve uygun bir spektrometre olmak üzere üç ana bileşenden oluşur. (Şekil 2.3) Raman saçılım sinyali Rayleigh saçılımından daha zayıf olduğundan cihazı oluşturan bileşenlerin performansları moleküler spektrometrelerinden çok daha iyi olmalıdır.



Şekil 2.3 Bir Raman cihazının kısımları

### 2.1.4.1 Işın Kaynakları

Raman saçılımı sinyali çok az olduğundan Raman spektrometride ışın kaynağı olarak genellikle lazerler kullanılır. Yaygın olarak kullanılan beş lazer Tablo 2.1’de verilmektedir.

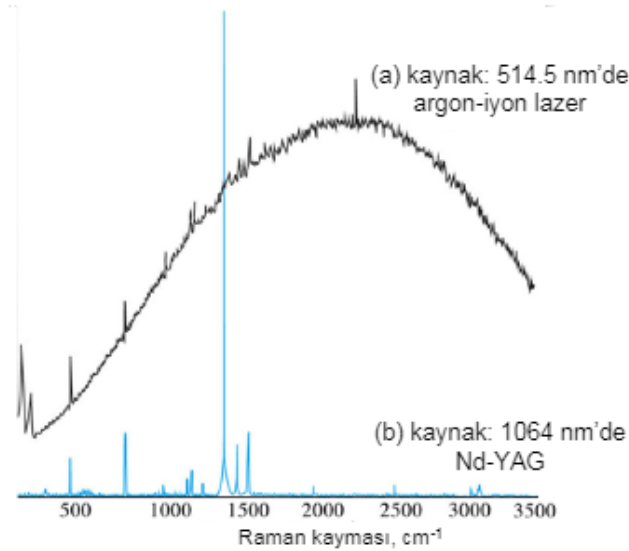
Tablo 2.1 Raman Spektroskopi için yaygın kullanılan lazer kaynakları.

KAYNAK TİPİ	DALGA BOYU (nm)
Argon iyonu	488.0 veya 514.5
Kripton iyonu	530.9 veya 647.3
Helyum/Neon	632.8
Diyod lazeri	782 veya 830
Nd/YAG	1064

Spektrumun mavi yeşil bölgesinde yayılım yapan argon ve kripton iyon kaynakları diğer kaynaklara göre daha avantajlıdır çünkü Raman saçılım şiddeti frekansın

dördüncü kuvveti ile orantılıdır. Örneğin 488 nm dalga boyundaki lazer kaynağı olan argon çizgisi, aynı giriş gücündeki helyum/neon kaynakları ile uyarılan Raman çizgilerinden neredeyse üç kat daha şiddetli çizgiler verirler. Fakat kısa dalga boylu bu ışın kaynakları büyük ölçüde floresans oluşturur ve bağların kopmasına yol açar. Uyarıcı olarak giderek daha fazla kullanılan tablodaki yakın-IR ışını yayınlayan son iki kaynaktır. Yakın-IR kaynakları kısa boylu lazerlere göre numunenin foto parçalanmasına yol açmaksızın çok daha yüksek güçlerde (50W) çalıştırılabilir ve çoğu molekülde yeterli sayıda floresans oluşturucu uyarılmış elektronik enerji hallerini doldurmaya yetecek kadar enerjiye sahip değillerdir. Böylece yakın-IR kaynaklı lazerlerde floresans çok düşük şiddetlidir veya hiç gözlenmez. Floresansın giderilmesi için Raman spektrometrelerinde Nd-YAG lazeri etkilidir. Bunun yanında diyot dizilimli lazerin 785 ve 830 nm'lerdeki iki çizgisi de floresansı önemli ölçüde düşürür.

Nd-YAG lazerinin, zemin floresansını tamamen giderdiği Şekil 2.4'de görülmektedir. 514.5 nm çizgisindeki argon iyon lazeri kullanılarak uyarılan klasik Raman cihazıyla üstteki spektrum elde edilmiştir. Aynı numunenin 1064 nm dalga boyundaki Nd-YAG lazeriyle bir Fourier dönüşümlü spektrometreyle alınmış spektrumu alttaki eğridir. Böylece floresans zemin sinyali tamamen yok olmuştur (Chase, 1987).

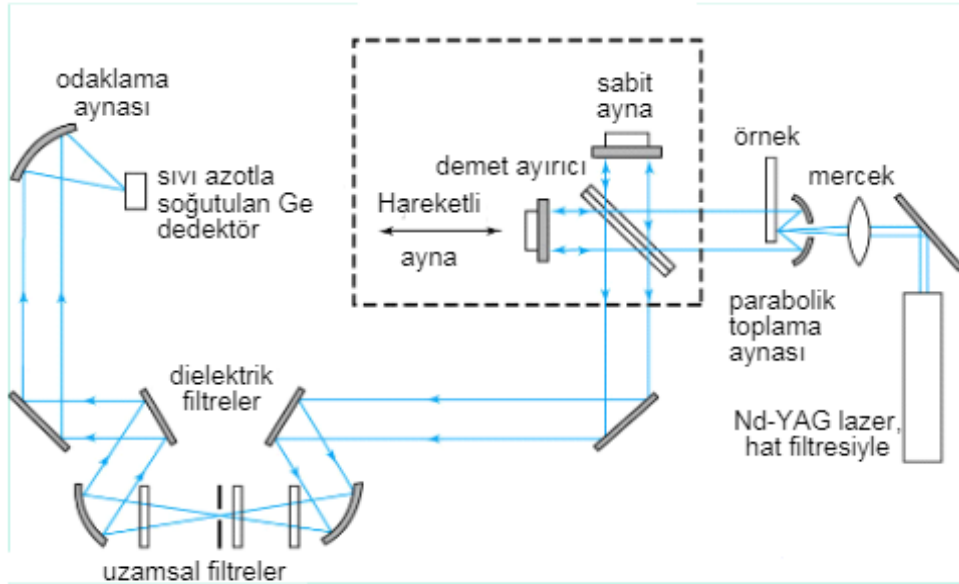


**Şekil 2.4** Antaresenin A) 514,5 nm'de argon-iyon kaynaklı normal Raman ve B) 1064. nm'de Nd-YAG kaynaklı bir FT-Raman cihazı ile alınmış spektrumları (Chase, 1987)

#### 2.1.4.2 Raman Spektrometreleri

Raman spektrometreleri 1980'li yılların başlarına kadar klasik UV-görünür bölge dispersif cihazlarla aynı tür bileşenleri kullanarak tasarım yönünden benzemektedirler. Bahsedilen cihazların çoğunda transdusere ulaşan Rayleigh saçılmalarını ve yabancı ışınları en düşük seviyeye indirmek için optik ağı sistemler kullanılmıştır. Fakat çoğu Raman spektrometre cihazı günümüzde, soğutulmuş germanyum transduserleriyle donanmış Fourier dönüşüm cihazları ya da yük-çleşmiş düzeneklere dayalı çok-kanallı sistemlerdir.

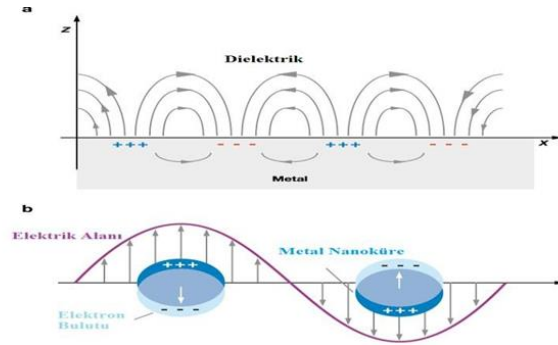
Şekil 2.5'te, Fourier-dönüşümlü Raman ölçümleri cihazı gösterilmektedir. İnterferometre, infrared cihazlarda kullanılanlarla aynı tiptendir. Transduser ise sıvı azotla soğutmalı germanyum foto iletkenidir. Rayleigh çizgisinin şiddeti, Raman çizgisine ait olandan bir kaç merteye daha yüksek olduğundan, cihazda transdusere kaynağınkinden daha uzun dalga boylu ışınının erişmesini sınırlandırmak için genellikle notch filtreleri denen holografik girişim filtreleri veya bir monokromatör kullanılır. Bazı Fourier dönüşümlü cihazlarda sadece lazer kaynağının dalga boyunu gidermek üzere tasarlanmış filtreler kullanılır (Chase, 1987).



Şekil 2.5 Bir FT-Raman spektrometrenin optik diyagramı (Chase, 1987)

## 2.2 Plazmonik

Yayılan yüzey plazmonları ve yayılmayan yüzey plazmonları olmak üzere iki çeşit plazmon rezonansı vardır. (Stewart vd., 2008, Willets ve Vun Duyne, 2007). Şekil 2.6'da iki çeşit yüzey plazmonları şematik olarak verilmektedir. (Jensen vd., 2000). En basit biçiminde, bir yüzey plazmon polaritleri (Surface Plasmon Polariton; SPP), bir metal ve bir dielektrik ortam arasındaki düzlemsel arayüz boyunca genellikle dalga şeklinde yayılım gösteren ve genişliği, her bir ortama artan mesafeyle katlanarak azaldığı elektromanyetik uyarıdır. 10- 200 nm arası çapında olan yumuşak, altın ve gümüş ince filmlerden oluşmaktadır. Metallerin yüzeyindeki elektromanyetik dalga alanı, metalin cinsine, film kalınlığına ve yüzey pürüzlülüğüne bağlı olarak x ve y eksenini boyunca 10-100  $\mu\text{m}$  yayılabilir. Z ekseninde ise 200-300 nm aralığında bir elektromanyetik alan oluşturur (Vun Duyne., 2004; Haes vd., 2005; Henzie vd., 2009). Yayılmayan yüzey plazmonları, lokalize olmuş yüzey plazmon polaritleri (Localized Surface Plasmon Resonance; LSPR) olarak adlandırılırlar, 10-200 nm aralığında gümüş ve altın nanoparçacıklarında olur. (Haes vd., 2005). Nanoparçacıkların etrafında oluşan elektromanyetik alanın büyüklüğü yayılan yüzey plazmonlarının aksine bir kaç nm düzeyindedir (Lu, 2009). Nanoparçacık etrafında oluşan yüzey plazmonlarının özelliği (Plazmonik özellikler), nanoparçacığın boyutuna, şekline ve dielektrik çevresine büyük ölçüde bağlıdır (Jain vd., 2006; Kelly vd., 2003; Hutter ve Fendler, 2004; Ly vd., 2007)



**Şekil 2.6** a) yayılan yüzey plazmonları, b) lokalize (yayılmayan) yüzey plazmonları (Jensen vd., 2000)

Plazmonik nanoyapılar ışık ile etkileştiğinde ışığı absorplama (ve dolayısıyla plazmon oluşumu) ve saçma özelliğine sahiptir (Bohren ve Huffman 1983). Bu iki özellik

ayarlanabilir olmasından dolayı biyomedikal uygulamalarda yaygın olarak kullanılması öngörülmektedir. Özellikle biyofiziksel çalışmalar (Reinhard vd., 2007; Sönnichsen vd., 2005), biyomedikal algılamalar (Elghanian vd., 1997; Haes ve Van Duyne, 2002) ve görüntülemeler (Sokolov vd., 2003; El-Sayed vd., 2005; Alivisatos, 2004), medikal tanı (Rosi ve Mirkin, 2005) ve kanser tedavisi (Hirsch vd., 2003; Huang vd., 2006; El-Sayed vd., 2006; O'Neal vd., 2004) üzerine pek çok çalışma yapılmıştır

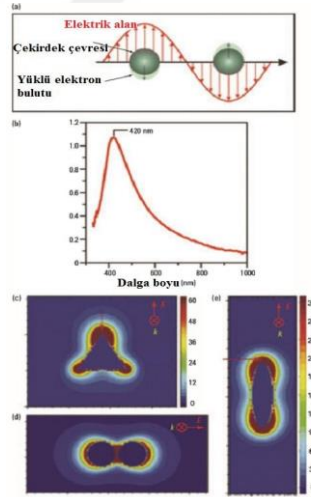
### **2.3 Yüzeyle Zenginleştirilmiş Raman Spektroskopisi**

Gümüş, altın ve bakır gibi kolloidal metal tanecikleri yüzeyinde veya bu metallerin pürüzlendirilmiş yüzeylerinde absorplanmış numunelerin, Raman spektrumlarının elde edilmesi yüzeyle zenginleştirilmiş Raman spektroskopisi (YZRS) tekniği olarak adlandırılır (Kneipp vd., 2006; Stiles vd., 2008).

YZRS zenginleştirmesinin mekanizması hala aktif bir araştırma başlığıdır. YZRS'nin keşfinden beri iki büyük grup mekanizmaların, (kimyasal zenginleştirme ve elektromanyetik zenginleştirme) önemi konusunda anlaşmazlığa düşmüşlerdir. Jeanmaire ve Van Duyne saçılmadaki zenginleşmenin elektrik alan zenginleşmesiyle olduğunu, ancak Albercht ve Creighton metal yüzey ile molekülün elektronik seviyeleri arasındaki etkileşimden yani kimyasal zenginleştirmeden kaynaklandığını öne sürmüşlerdir (Campion ve Kambhampati, 1998). Şu an kabul gören mekanizmalardan birincisi elektromanyetik zenginleştirme (Moskovits, 1978; Moskovits, 1985), ikincisi ise kimyasal zenginleştirmedir (Otto, 1984; Persson, 1981). Kimyasal mekanizmada, şimdilerde ortalama 100 kadar zenginleşme kattığı düşünülmektedir ve metal ve adsorbant moleküller arasında yük- aktarım ile oluşur. (Campion ve Kambhampati, 1998; Haynes vd., 2005a). Raman spektroskopisinde gözlemlenen duruma paralellik gösterecek şekilde, bu durumun varlığı, rezonans uyarım için bir geçiş sağlayarak Raman geçişi olasılığını artırmaktadır. Bu mekanizma belli bir bölgeye özgüdür ve analite bağlıdır. Molekül pürüzlendirilmiş yüzeye direkt olarak adsorbe edilmiş olmalıdır. NPs kendi etrafında oluşturdukları yüzey plazmonları elektrokimyasal zenginleştirmeye sebep olmaktadır. Raman saçıcılar bu yoğun elektromanyetik alan ile etkileştikleri zaman, indüklenmiş dipol moment büyüklüğü artar ve buna bağlı olarakta elastik olmayan Raman saçılmasının



şiddeti artar (Haynes vd., 2005b). Elektromanyetik zenginleşirmeyi anlamak için nanoyapıların boyut, şekil özellikleri göz önünde bulundurulmalıdır. Bu özellikler metalik nanoyapıdaki iletim elektronlarının rezonans frekansını belirler. Aynı frekansa sahip elektromanyetik ışın nano boyuttaki ince filmlere uygulandığında, ışınanın elektrik alanı iletim elektronlarını toplu bir salınımına iter. (Şekil 2.7 a-b) LSPR'nin uyarımının iki sonucu vardır: seçici absorpsiyon ve rezonans elektromanyetik ışınanın saçılması, nano boyuttaki ince filmlerin yüzeyinde geniş elektromanyetik alanların oluşması. (Şekil 2.7 c-e) Elektromanyetik zenginleşirmeler (Schatz ve Vun Duyne, 2002) ortalama  $\geq 10000$  zenginleşirme faktörü kadar katkı sağlar. Raman spektroskopisinde saçılma şiddeti, nanoparçacıklar etrafında oluşan elektrik alanın şiddetinin E dördüncü kuvveti  $E^4$  ile doğru orantılıdır (Haes vd., 2005). Nanoyapıların optik özellikleri teorik modellemelerle belirlenerek zenginleşirme faktörü saptanabilir (McCreery, 2000). Bu nedenle NP'lerin etrafında oluşturdukları elektrik alanın şiddetinin hesaplanması, YZRS deneylerini etkileyen tüm parametrelerin optimize edilmesini sağlamaktadır. Yukarıda bahsedilen teorik modellemelerle optik özellikleri belirlenerek maksimum zenginleşirme faktörü elde edilebilecek deneysel koşullar sağlanabilmektedir (Haes vd., 2005).



**Şekil 2.7** Küresel bir nanoparçacıktaki LSPR'ların elektromanyetik uyarımının gösterimi. b) sızatla indirgenmiş gümüş kolloitlerin uyarımı. Gümüş NPs etrafında elektromanyetik alan zenginleşirmenin teorik simülasyonu. c) üçgen nanoparçacık (700 nm), d) küresel nanoparçacık ikilisi (520 nm), e) eliptik nanoparçacık (695 nm) (Hao ve Schatz, 2004)

Üçgenler (Haynes ve Vun Duyne, 2003b), nanohalkalar (Aizpurua vd., 2003) ve nanokabuklar (Oldenburg vd., 1998) gibi bazı geometrik şekillerin frekansları, nanoparçacığın geometrisinin tasarlanması ile bu geometrik şekillerin plazmon rezonanslarını desteklemektedirler. Bu yapılandırılmış nano geometrik şekillerin her birinin kendine özgü alan özellikleri vardır: plazmon rezonans frekansı, nanoyapının yüzeyindeki yakın alan genişliğinin uzaysal dağılımı, ışık dalgasının polarizasyonunda oryantasyon bağıllığı, yakın alanın uzaysal genişliği. Metalik nanoparçacıkların optik özellikleri, yüksek simetri geometrilerin Mie dağılımı teorisi ve ayrık dipole yaklaşımı (discrete dipole approximation (DDA)) (Yang vd., 1995) ve indirgenmiş simetrik nano ölçekli nesnelere için ölçülebilir zaman alanı gibi sayısal yöntemler dahil (Taflove ve Hagness, 2000), değişik yöntemlerle hesaplanabilirler.

Yani, teorik olarak belirlenen elektrik alanları ile nano ölçekli metalik geometriler için deneysel olarak elektromanyetik alanları arasındaki benzerliklere yaklaşabilir ve nano optik YZRS substratlarının ve diğer uygulamaların geliştirilmesine katkı sağlayabiliriz.

YZRS hassas ve seçici moleküler kimlik saptama için kullanılabilir. Son zamanlarda YZRS, biyolojik ve kimyasal algılamada sinyal dönüştürme mekanizması olarak kullanılmıştır. Zira ilaçların (Weienbacher vd., 1997), şarbonun (Zhang vd., 2005), prostat spesifik antijenlerin (Grubisha vd., 2003), glikozun (Shafer-Peltier vd., 2003; Yonzon vd., 2004) ve nükleer atığın analizlerinde (Bao vd., 2003) kullanılmaktadır. YZRS ayrıca bakteri tanımlanması (Jarvis vd., 2004), genetik teşhis (Culha vd., 2003), bağışıklık deneyi etiketlemesi (Mulvaney vd., 2003; Doering ve Nie, 2003; Cao vd., 2002) alanlarında da kullanılmıştır. Küçültülmüş, pahalı olmayan ve taşınabilir bir YZRS aleti tekniği kliniklerde, sahada ve kırsal alanlarda kullanım için pratik hale getirmektedir (Young vd., 2004).

## 2.4 *Legionella pneumophila*

*Legionella pneumophila* ilk kez 1976 yılının Temmuz ayında Philadelphia'da Amerikan ordu toplantısına katılan delegelerde tanımlanmıştır. Bu toplantıya katılan Amerikan lejyonerlerinden 189'u pnömoni salgınına yakalanmış ve bunlardan 29 tanesi bu salgından dolayı hayatını kaybetmiştir. Ortaya çıkan salgının nedenini araştırmak için yapılan çalışmalar sonucunda 1977 yılının Ocak ayında Atlanta Hastalık kontrol merkezinde *L. pneumophila* bakterisi izole edilmiştir (Alary ve Joly, 1992). *L. pneumophila* cinsi bakterilerin ekolojisinin bilinmesi, potansiyel pnömoni salgınlarının önlenmesi açısından önemlidir. *L. pneumophila*, çeşitli su habitatları ve toprakta yaşar (Hsu vd., 1984; Stout vd., 1992). Zorunlu hücre içi paraziti olan *L. pneumophila*'nın su içinde ve sistemde oluşan biyofilm içinde bulunabilen protozoonlar ve alglerin vakuollerinde yaşamlarını sürdürerek çoğaldıkları ve hücrelerin ölmesi ile suya geçtikleri yapılan çalışmalar sonucunda anlaşılmıştır (Breiman vd., 1990; Wintermayer vd., 1991). *L. pneumophila* cinsi bakterilerin insanlara bulaşması; soğutma kulesi, duş başlığı, buz makinaları, nebülizörler, nemlendiriciler, jakuzi gibi bakteri ile kontamine olmuş çevresel kaynaklardan yayılan aeresollerin insanlar tarafından solunum sistemine alınmasıyla gerçekleşir (Çotuk, 1998).

Kesin tanı ancak kültürde bakteri üretimi ile yapılmalıdır. Kültür, %100 özgülüğü ile en güvenilir yöntemdir. Kültür de üretmek amacıyla başta balgam olmak üzere BAL, biyopsi materyali, boğaz sürüntüsü ve kan gibi çeşitli klinik örneklerin yanı sıra, epidemiyolojik amaçlar için kaynak araştırmasında çevresel örneklerde kullanılır. Örnekler 30 dk içerisinde hemen laboratuvara getirilerek ekim yapılacaksa, taşıma besiyeri, tampon, fizyolojik tuzlu su kullanımı gerekmez. Eğer laboratuvara gönderilme işlemi 48 saati bulacaksa 4°C'de saklanmalıdır (Stout, 2003). *L. pneumophila*, standart besiyerinde üremediği için izolasyonda özel besiyerleri gerekir. Bu nedenle çeşitli antibiyotiklerin eklenmesiyle seçici özellik kazandırabilecek "Buffered Charcoal Yeast Extract- $\alpha$ -ketoglutarate" (BCYE- $\alpha$ ) besiyeri kullanılır (Edelstein, 1982). *L. neumophila* cinsi bakteriler, BCYE agara yapılan kültürlerde 35°C-37°C'de nemli ve %5 CO<sub>2</sub>'li atmosferde 7-10 günde üretilmektedir. *L. pneumophila* türlerinin biyokimyasal testlerle tiplendirilmesi zordur.

*L. pneumophila* türünü ayırmak için hippurat hidrolizi testi uygulanabilir. Tür tiplendirilmesinde en pratik yol serolojik yöntemlerdir. Kanlı agarda üremeyen, BCYE'de üreyen izolatlardan, özgül serumlar kullanılarak yapılan aglutinasyon testi ile tanıya gidilir (Winn vd., 2006). Yukarıda bahsedildiği gibi *L. pneumophila* izolasyonu oldukça zaman alıcı ve zahmetli olup yeni hızlı, basit ve duyarlı tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır.

## **2.5 YZRS İle *Legionella pneumophila*'nın Tanı Tayini**

Literatür incelendiğinde, Raman spektroskopisi yönteminin, bu tezde model olarak seçilen *L. pneumophila*'nın tanı ve tayini için kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar oldukça yeni ve sınırlı sayıdadır (Knauer vd., 2010; Vossenbergh vd., 2013; Kusic vd., 2013; Lu vd., 2013). Çalışmalar detaylı bir şekilde incelendiğinde çalışmalarda her zaman saf bakteri kültürleri kullanılmıştır. Bu çalışmalardan ikisi normal Raman spektroskopisi ile saf kültür bakterisi kullanılarak *L. pneumophila* tanısı üzerinedir (Vossenbergh vd., 2013; Kusic vd., 2013). Bu çalışmalar sonucunda Raman saçılması ile su patojenlerinin hızlı, basit ve doğru şekilde tanısının yapılabileceği gösterilmiştir. Ancak normal Raman spektroskopisi ile düşük derişimlerde tayin yapmak pek mümkün değildir. Ayrıca bir bakteri karışımında normal Raman spektrumlarını birbirinden ayırt etmek zordur. Literatürde *L. pneumophila* YZRS ile tanısının immunoassay'a dayalı olarak yapılabileceği gösterilmiştir. Bu çalışmada bakteriyeye spesifik antikorlar kullanarak bakteriler yakalanmış ve üzerine sentezlenen gümüş nanoparçacıklar eklenerek YZRS spektrumu alınmıştır.

Literatürde yapılan bir çalışmada YZRS'ye dayalı bir immunoassay uygulamada antikora antijen bağlandığı zaman antijenin ağırlığına/baskısına bağlı olarak antikorun altında bulunan molekülün kutuplaşabilirliğinde bir değişim dolayısıyla da bazı piklerin dalga sayılarında bir kayma meydana gelmektedir (Kho vd., 2012). Bu kayma antijen varlığında meydana gelmektedir. Ayrıca bu kaymanın büyüklüğü ise bağlanan antijenin derişimine bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir. Bu yöntem ağırlığa/baskıya-duyarlı (stress-sensitive) YZRS nanomekanik sensör olarak nitelendirilmiştir. Bu yöntemde hiçbir işaretleyici molekül kullanmadan sadece pikteki kaymaları kullanarak immunoassay'a dayalı protein tayini yapılabileceği gösterilmiştir.

## BÖLÜM 3

### MATERYAL VE METODLAR

#### 3.1 Kullanılan Cihazlar

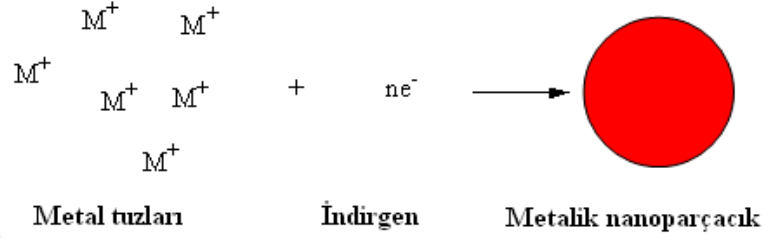
- İletim Derleme Düzenegi (PI)
- Millex filtre (0,45 ve 0,22 µm)
- Mikro pipet (Eppendorf) Etüv
- Hassas Terazi Sonikatör
- SEM (JEOL 6510)
- TEM (Jeol 2100 Jem Hrtem)
- AFM (XE-100E)
- Raman Spektrometre (Renishaw İnvia)
- UV-vis Spektrofotometre (Thermo Scientific Evolution)
- Zetasizer (Malvern Nano ZS)

#### 3.2 Kullanılan Kimyasallar

- $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$
- Sodyum Sitrat
- $\text{AgNO}_3$
- 4-Aminotiyofenol
- Etanol
- 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodi amid hidroklorür (EDC)
- N-Hydroxysuccinimide (NHS)
- 2-(N-morfolino) etansülfonik asit (MES)
- BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract)
- SR1 *L. pneumophila* ATCC 33152
- Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS)
- SR2-14 *L. pneumophila*

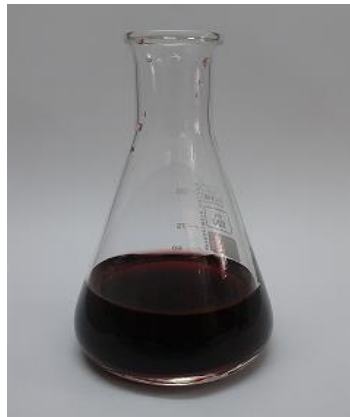
### 3.3 Altın (AuNPs) ve Gümüş (AgNPs) Nanoparçacıkların Sentezi

YZRS deneylerinde kullanılacak YZRS aktif yüzeyleri hazırlamak için öncelikle AuNPs ve AgNPs sentezlendi. Bu amaç için metal tuzlarının bir indirgen yardımı ile metalik nanoparçacıklara indirgenmesi sağlandı. Metal tuzlarından indirgen bir kimyasal kullanılarak metalik nanoparçacık oluşumu şematik olarak Şekil 3.1’de verilmektedir.



**Şekil 3.1.** Metal tuzlarından kimyasal indirgeme yöntemi ile metalik nanoparçacıkların hazırlanmasının şematik gösterimi.

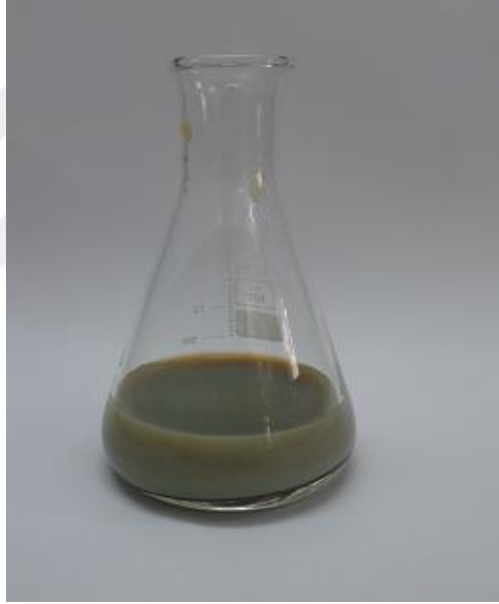
AuNPs kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlandı. Bunun için 250 mL 1 mM HAuCl<sub>4</sub>.3H<sub>2</sub>O çözeltisi saf su ile hazırlandı ve manyetik karıştırıcı ile 1000 rpm’de kaynayıncaya kadar ısıtıldı. Çözelti kaynadıktan sonra üzerine 25 mL 38,8 mM sodyum sitrat (indirgen) çözeltisi ilave edildi. Kaynama 15 dakika daha devam edildi. Kaynama esnasında renk değişimi gözlemlendi. Sarı olan renk sırasıyla şeffaf, gri, siyah en son kırmızı renk oldu. Hazırlanan süspansiyon oda sıcaklığına kadar soğutulduktan sonra millex filtre (0,45 µm) ile süzüldü. Şekil 3.2’de sentez sonucu elde edilen AuNPs süspansiyon fotoğrafı verilmektedir.



**Şekil 3.2** 13 nm AuNPs süspansiyonunun fotoğrafı.

Şekil 3.2’de görüldüğü gibi 13 nm büyüklüğünde sentezlediğiniz AuNPs süspansiyonu rengi kırmızı olarak elde edildi. Sentez öncesi sarı olan rengi kaynama noktasında sitratın eklenmesinden belli bir süre sonra kırmızıya dönüştü ve buda bizim nanoparçacıklarımızın oluştuğunu göstermektedir.

AgNPs hazırlamak için ise 90 mg  $\text{AgNO}_3$  500 mL saf su içerisinde çözüldü. Kaynatılmak için ısıtıcı üzerine konuldu ve manyetik balık eklenerek 1000 rpm’de kaynatılmaya kadar ısıtıldı. Kaynama başladığı anda üzerine %0,1’lik 10 mL sodyum sitrat eklendi. Sodyum sitrat eklendikten sonra erlen içerisinde bulunan çözelti yarıya inene kadar kaynamaya devam edildi. Kaynama tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan süspansiyon millex fitre (0,22  $\mu\text{m}$ ) ile süzüldü. Şekil 3.3’te sentez sonucu elde edilen AgNPs süspansiyon fotoğrafı verilmektedir.



**Şekil 3.3** 50-60 nm AgNPs süspansiyonunun fotoğrafı

Şekil 3.3’te görüldüğü gibi 50-60 nm boyutlarında sentezlediğimiz AgNPs süspansiyonunun rengi yeşilimtırak olarak elde edildi. Sentez öncesi su ortamındaki şeffaf rengi kaynama noktasında eklenen sodyum sitrat ile rengin belli bir süre sonra yeşilimtırığa dönüştü ve buda bize AgNPs oluştuğunu gösterir. Bu yöntemde sitrat hem indirgen hem de stabilizatör olarak kullanılmaktadır.

### 3.4 YZRS Aktif Yüzeylerin Hazırlanması

Sentezlenen AuNPs ve AgNPs tez kapsamında kullanılacak olan YZRS aktif yüzeylerin hazırlanmasında kullanıldı. Kimyasal indirgeme yöntemiyle hazırlanan AgNPs süspansiyon halinde stoklandı. 50 mL falkon tüplerde muhafaza edilen süspansiyonlar alınarak 5000 rpm 30 dakika santrifüjlendi. Santrifüj sonrası çöken AgNPs sulu kısımdan ayrıldı. Farklı derişimlerde AgNPs elde etmek için yapılan santrifüj işlemi sonrası kalan süspansiyon kısmına göre 25X, 50X ve 100X AgNPs süspansiyonları hazırlandı. Buradaki “X” kat deriştirilmiş anlamındadır. Sitrat yöntemi ile sentezlenen AgNPs derişimi yaklaşık  $1.0 \times 10^{11}$  NPs/mL dir. Deriştirme işlemi yapılırken aşağıdaki yol izlendi.

25X AgNPs =50 mL süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 2 mL’e AgNPs elde edildi.

50X AgNPs =50 mL süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 1 mL’e AgNPs elde edildi.

100X=50ml süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 0,5 ml’e AgNPs elde edildi.

Elde edilen deriştirilmiş AgNPs daha sonraki çalışmalarda YZRS aktif yüzey hazırlamak için kullanılacaktır. AuNPs aynı şartlarda fakat daha fazla santrifüj işlemine tabi tutuldu ve derişimleri artırıldı. Çünkü AuNPs büyüklükleri küçük olduğundan yüzey oluşturmak için daha fazla nanoparçacığa ihtiyaç vardır. Bunun için 100X, 250X ve 500X AuNPs süspansiyonları hazırlandı. Bu amaç için

100X =500 mL süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 5 mL AuNPs elde edildi.

250X=500 mL süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 2 mL AuNPs elde edildi.

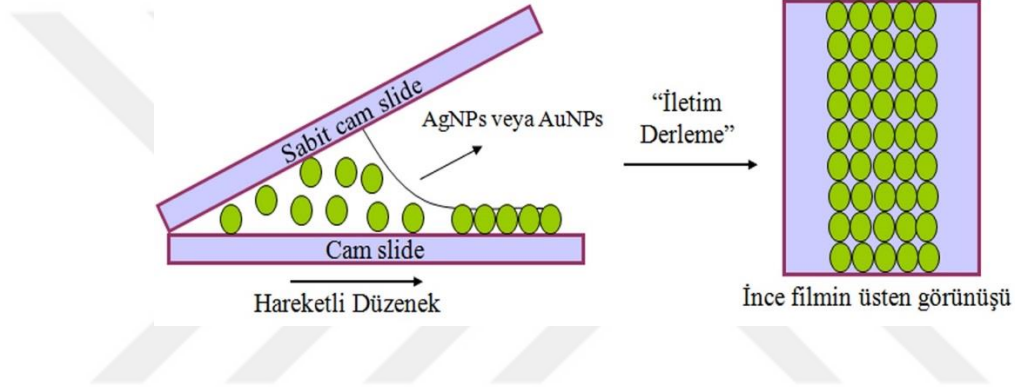
500X=500 mL süspansiyondan santrifüj işlemi yapılarak 1 mL AuNPs elde edildi.

Derişimi artırılan AgNPs ve AuNPs süspansiyonları iletim derleme (convective-assembly) yöntemi ile cam lam üzerine hızı 1 ve 2  $\mu\text{m/s}$  ile 27 °C’de yürütüldü. YZRS aktif yüzeylerin oluşturulmasında kullanılan iletim derleme cihazının fotoğrafı Şekil 3.4’de görülmektedir.





Şekil 3.4 İletim derleme yönteminin düzenek görüntüsü



Şekil 3.5 Sentezlenen nanoparçacıkların iletim-derleme yöntemi kullanılarak cam slide yüzeyine düzenli olarak biriktirilmesinin şematik gösterimi.

İki cam lam arasına madde miktarı 40  $\mu$ L konularak ve iki lam arasındaki açı  $23^\circ$ 'ye ayarlanıp yürütme işlemi yapıldı. Yürütme işleminde üst lam stanta kıskaç ile bağlanarak sabit tutuldu alt lam ile cihaz üzerine yapıştırılıp hareket etmesi sağlandı. İki lam tam olarak birbirine dokunmaksızın yaklaştırılıp süspansiyonların arada kalmasını sağladı. Alt lam üzerine 1 ve 2  $\mu$ m/s hızlar ile nanoparçacıklar cam lam üzerine biriktirildi. Ortam şartları ise sıcaklık  $27,5^\circ\text{C}$  nem oranı % 32 olarak kaydedildi.

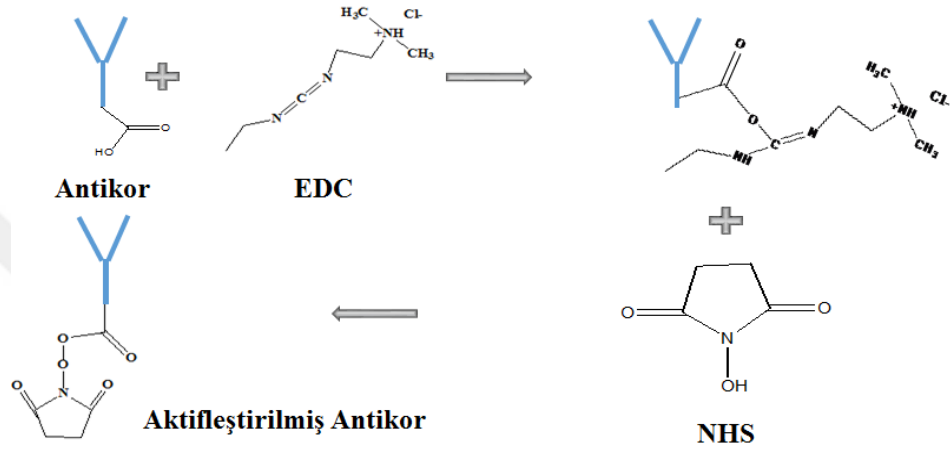
### 3.5 YZRS Aktif Yüzeylerin Spesifik Antikorlarla Modifiye Edilmesi

Farklı derişimlerde oluşturulan ince film farklı petri camların içlerine konulan ATP çözeltilerine konularak 1.30-2 saat inkübe edildi. Model mikroorganizma (*L. pneumophila*) için kullanılacak olan antikorları yüzeye bağlamak için antikorların

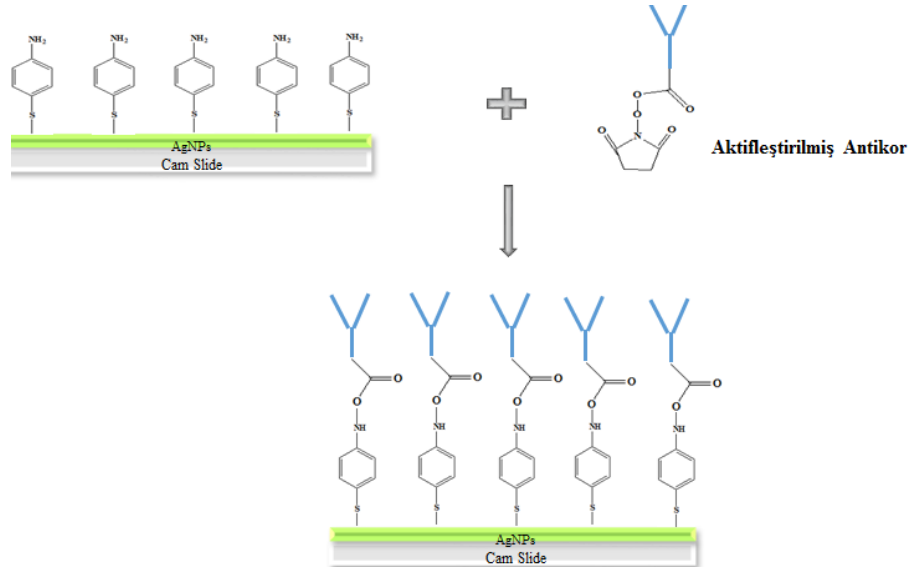
karboksilik asit gruplarının yüzeydeki amin grubuna bağlanabilmesi için öncelikle 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC)/ N-Hydroxysuccinimide (NHS) ile aktifleştirildi (Şekil 3.6). Aktifleştirilen antikor molekülleri amin modifiyeli YZRS aktif yüzey ile muamele edilerek antikorun yüzeye kovalent olarak bağlanması sağlandı (Şekil 3.7). Antikor olarak aşağıdakiler kullanıldı.

Ab69239= Anti-*L. pneumophila* antikor

Ab65287= Anti- *L. pneumophila* antikor



Şekil 3.6. Antikorun karboksil ucunun EDC/NHS ile aktifleştirilmesi.



Şekil 3.7 Model mikroorganizma için spesifik antikorların yüzeye kovalent olarak bağlanmasının şematik gösterimi.

Spesifik antikorların yüzeye bağlayabilmek için öncelikle 150 mM EDC ve 400 mM NHS 0,1 M 2-(N-morfolino) etansülfonik asit (MES) tamponu içerisinde çözülerek hazırlandı. Hazırlanan her bir çözültiden 100 µL alınarak aynı eppendorf tüpüne eklendi. Hazırlanan bu karışımın üzerine 50 µL stokdan antikor (62,5 µg/mL ve 250 µg/mL ) çözültisi eklendi. Daha sonra bu karışım 30 dakika boyunca thermomixer’de (Şekil 3.8) aktifleştirme işleminin gerçekleşmesi sağlandı. Aktifleşen antikorların ATP modifiyeli AgNPs aktif yüzeylere bağlama işlemi yapıldı. Bağlama işlemi için aktif antikorların bulunduğu eppendorf tüplerine 1’er mL 0,1 M Fosfat tamponlu tuz çözültisi (PBS) çözültisi eklendi. Son olarak ise ATP modifiyeli AgNPs aktif yüzeyler eppendorf tüplere konularak 2 saat thermomixer’de oda sıcaklığında 1000 rpm karıştırılarak inkübe edildi. İşlem tamamlandıktan sonra yüzeylere bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak amacıyla önce PBS ve daha sonra ultrasaf su ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutulmaya bırakıldı.



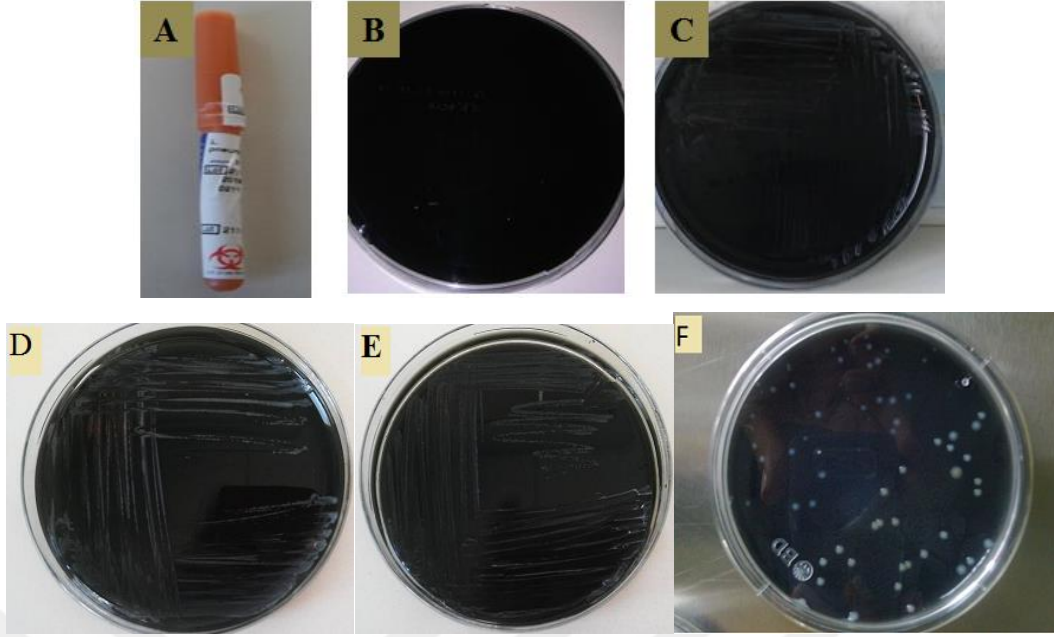
**Şekil 3.8** Deneylerde kullanılan eppendorf thermomixer cihazının fotoğrafı.

### **3.6 Legionella pneumophila Stoklardan Canlandırılması**

*L. pneumophila*, gram negatif çomak şeklinde çevre kökenli bir bakteridir. Bu güne kadar tanımlanmış 59 türü ve 70 serogrubu vardır. Enfeksiyon etkeni olan tür *L. pneumophila*’dır. *L. pneumophila* enfeksiyonlarından ise en fazla *L. pneumophila* Serogrup 1 sorumludur. *L. pneumophila* ilk kez 1976 yılında Philadelphia’da yapılan Amerikan Lejyon kongresinde ortaya çıkmıştır. *L. pneumophila* olarak adlandırılan bakteri Lejyoner hastalığına neden olan bir akciğer enfeksiyonudur.

*L. pneumophila*, etkisi insanların su kaynaklarından gelen legionella bakterisini de içinde barındıran havadaki tozları soluması sonrasında gelişir (örneğin; klima, soğutma kulesi jakuzi, duş). İnsanlar bu tür tozlarla ev, işyeri, hastane veya sosyal mekanlarda karşılaşabilirler. Legionella bakterisi insandan insana bulaşmaz fakat otomatik klima veya ev pencere tipi klima birimlerinden hastalık bulaşabilir. *L. pneumophila*, bakterisinin bulunduğu yerlere ait her tip sulama sisteminde *L. pneumophila*, organizması bulunabilir.

Gaziantep il merkezinde bulunan bazı okulların su depolarından ve lavabo musluklarından su örnekleri, musluk başlıklarından ise sürüntü örneklerinden daha önce yapılan araştırmada izole edilip stoklarda bulunan *L. pneumophila* bakterileri canlandırma işlemleri gerçekleştirildi. Bu işlem için BCYE (Buffered Charcoal Yeast Extract) agar besiyeri kullanıldı. Canlanan 6 *L. pneumophila* örneklerinin doğrulama testleri serolojik olarak yapıldı. Kontrol olarak standart SR1 *L. pneumophila* ATCC 33152 ve Gaziantep Halk sağlığı laboratuvarından alınan SR2-14 *L. pneumophila* kullanıldı (Şekil 3.9).



**Şekil 3.9** A) Kwikstik 0211 P referans stok kültüründen *L. pneumophila* ATCC 33152 B) BCYE C) SR 1 *L. pneumophila* ATCC 33152 36 saat inkübasyondan sonra BCYE besiyerinde D) Halk sağlığı laboratuvarından alınan SR 2-14 *L. pneumophila* 36 saat inkübasyondan sonra BCYE besiyerinde E) Stok kültürlerden canlandırılan *L. pneumophila* SR1 bakteri kolonileri F) Stok kültürlerden canlandırılan *L. pneumophila* SR2-14 bakteri kolonileri G) *L. pneumophila* ışık mikroskobu görüntüsü.

İnsandaki *Legionella* enfeksiyonlarının çoğu *L. pneumophila* kaynaklı olarak meydana gelmektedir *L. pneumophila* tanımlanmış 15 serogrubuyla en yaygın *Legionella* türüdür. *L. pneumophila* serogrup 1'in kültürü yapılmış birçok Lejyoner hastalığı vakalarında ilk sırada yer aldığı, *L. pneumophila* serogrup 2-14'ün ise %7'sinden sorumlu olduğu belirlenmiştir. Canlandırılan bakterilerin İnsandaki *Legionella* enfeksiyonlarının büyük bir bölümünden sorumlu olan *L. pneumophila* serogrup 1'in ve *L. pneumophila* serogrup 2-14 doğrulama testinin yapılması uygun görülmüştür.

### 3.7 *Legionella pneumophila* için Doğrulama Testlerinin Yapılması

Stoklardan alınan örneklerden ekim yapılan tüm petri kutularında üreyen şüpheli kolonilerden *L. pneumophila* türünü doğrulamak için serolojik test uygulandı. Üreyen koloniler *Legionella* Latex Test kiti (OXOID DR0800M) kullanılarak serolojik olarak değerlendirmeye alındı. Oda sıcaklığındaki aglütinasyon kitinin sulandırma

tamponundan kağıt lam üzerine bir damla damlatıldı ve şüpheli koloniden öze ile biraz alınarak bu tampon içinde homojen hale getirilerek aglütinasyon oluşturup oluşturmadığı gözlemlendi. Otoaglütinasyon oluşmadığından emin olunduktan sonra karışımın üzerine bir damla *L. pneumophila* SR 1 antikoru damlatılarak 30 saniye çalkalandı. Aglütinasyon gösteren örnekler *L. pneumophila* SR 1 olarak değerlendirildi. Aynı işlemler *L. pneumophila* SR 2-14 içinde tekrarlandı. Elimizde bulunan standartlar içinde doğrulama testi yapıldı. Standart örneğimiz *L. pneumophila* Serogrup 1 olduğundan 1. Solüsyonda aglütinasyon gözlemlendi (Şekil 3.10).



**Şekil 3.10** OXOID DR0800M *L. pneumophila* Latex Test ve *L. pneumophila* Serogrup 1 ve Serogrup 2-14 aglütinasyonu.

Canlandırılan toplam 6 izolatın 3'ü *L. pneumophila* SR 2-14, 3'ü *L. pneumophila* SR 1 olduğu saptandı. 2'si standart olmak üzere toplam 8 *L. pneumophila* çalışmaya dahil edildi.

### 3.8 Mikroorganizmaların Derişimlerinin Ayarlanması

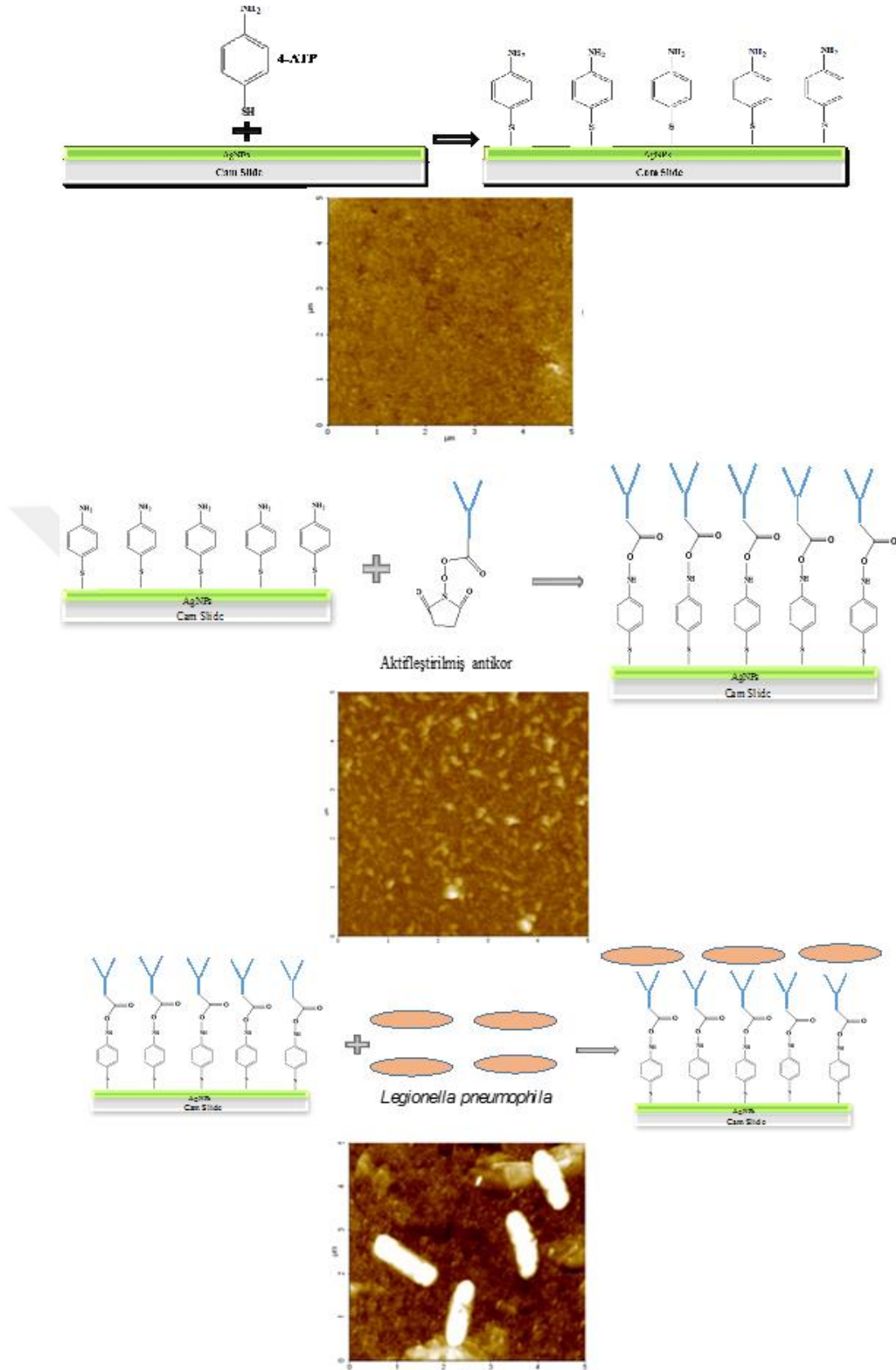
Projede kullanılacak tüm bakterilerin (*L. pneumophila* SR 2.14 ve *L. pneumophila* ATCC 33152) spesifik antikorumları ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeylere bağlamak için öncelikle uygun bakteri derişimini ayarlamak için fotometrik bir cihaz olan McFarland cihazı kullanıldı. En ideal mikroorganizma yoğunluğunu yakalamak için bakterilerin derişimi McFarland 1 ( $10^8$  CFU/mL), McFarland 2 ( $10^{16}$  CFU/mL) ve McFarland 3 ( $10^{24}$  CFU/mL) olarak PBS (pH: 7,2) içerisinde hazırlandı. Yapılan mikroskop analizlerinde en uygun derişimin bakteri konsantrasyonunun Mc3 ( $10^{24}$  CFU/mL) olduğuna karar verildi. Bundan sonraki yapılacak olan bütün çalışmalarda bu derişim kullanıldı.

### 3.9 *L. pneumophila* Bakterilerin Antikorlarla Modifiye Edilen YZRS Aktif Yüzelere Bağlanması

**Tablo 3.1** Patojen mikroorganizmalar için kullanılan antikorlar

Antikorlar	Patojen Mikroorganizmalar
Ab69239: Anti- <i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i> (SR 2.14 ve izolatlar)
Ab65287: Anti- <i>L. pneumophila</i>	<i>L. pneumophila</i> (ATCC 33152)

Tez kapsamında kullanılacak olan 2 adet standart (*L. pneumophila* SR 2.14 ve *L. pneumophila* SR 1 (ATCC 3352)) ve 6 adet izolat stoklardan canlandırıldı. Canlandırılan bakteriler tek tek 0,1 M PBS içerisinde Mc3 bulanıklığında ayarlandı. Ayarlanan tüm bakterilerin 1 mL'lik kısmı eppendorf tüplere konuldu. Önceden hazırlanan antikorlarla modifiye edilen YZRS aktif yüzeyler bu tüplere konularak inkübatörde 2 saat 37 °C'de bekletildi. Bu sürede bakterilerin antikor-antijen ilişkisi ile YZRS aktif yüzeye bağlanması sağlandı. YZRS aktif yüzeye tutunmayan bakterileri uzaklaştırmak için yüzeyler önce PBS ile sonrasında da saf su ile yıkandı. Bu sürede *L. pneumophila* SR 2.14 bakterisinin Anti- *L. pneumophila* Ab69239 antikorlarına, *L. pneumophila* ATCC 3352 bakterisinin ise Anti- *L. pneumophila* Ab65287 antikorlarına bağlanması sağlandı. Şekil 3.11'de yapılan tüm aşamalar verilmiştir



Şekil 3.11 Yapılan tüm deneysel basamakların şematik gösterimi ve AFM görüntüleri

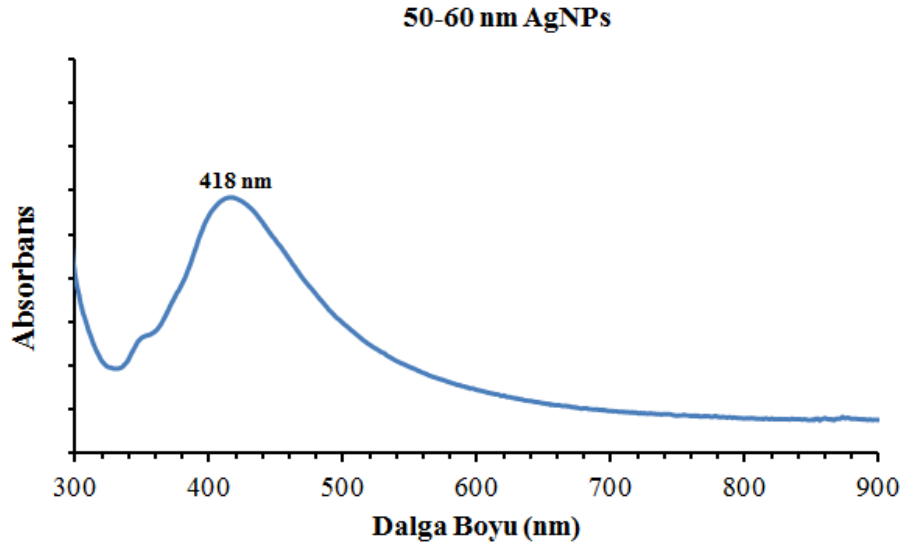


## BÖLÜM 4

### BULGULAR VE TARTIŞMA

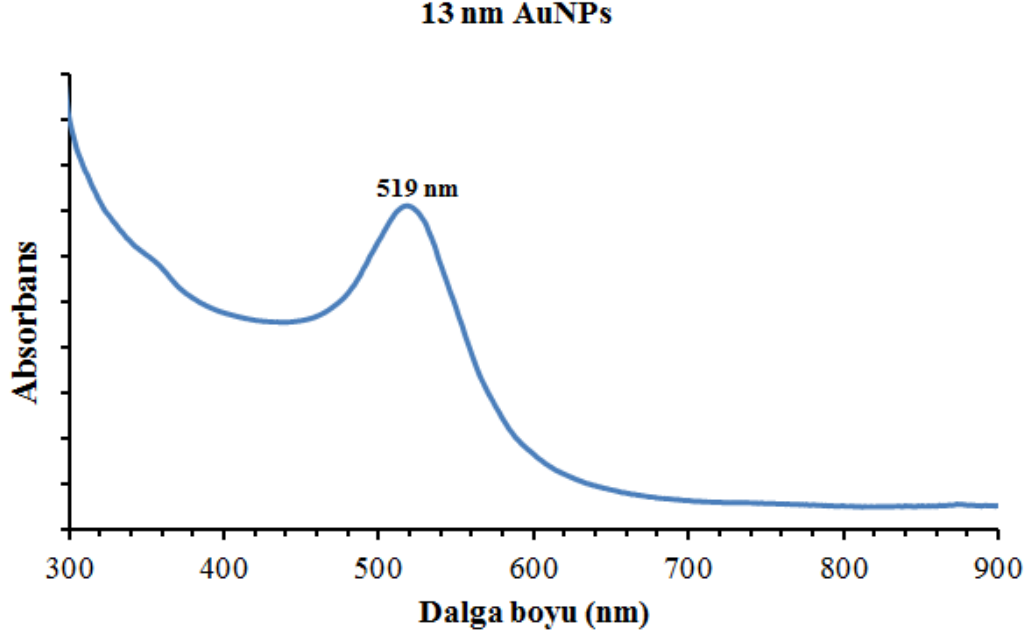
#### 4.1 Sentezlenen Nanoparçacıkların UV-Görünür Bölge Spektrofotometre ile Karakterizasyonu

Bu çalışmada sitrat ile termal indirgeme yöntemi ile sentezlenen nanoparçacıkların karakterizasyonları UV-Görünür bölge spektrofotometre, Zetasizer, Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) ve Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) kullanılarak yapıldı. Elde edilen sonuçlar ve yorumları aşağıda ayrıntılı bir şekilde verilmektedir. AuNPs ve AgNPs karakterizasyonları için Thermo Scientific Evolution 201 markalı UV-görünür bölge spektrofotometresi kullanıldı. Yaptığımız analizler için 190 ile 1100 nm dalga boyu aralığında tarama yapıldı. Nanoparçacıkların oluşturduğu yüzey plazmonlarından dolayı UV-görünür bölge spektrofotometresi absorbans vermektedirler. Bu özelliklerinden dolayı nanoparçacıkların büyüklükleri ve şekilleri hakkında veri alınabilmektedir. Şekil 4.1'de AgNPs absorbans spektrumu verilmektedir.



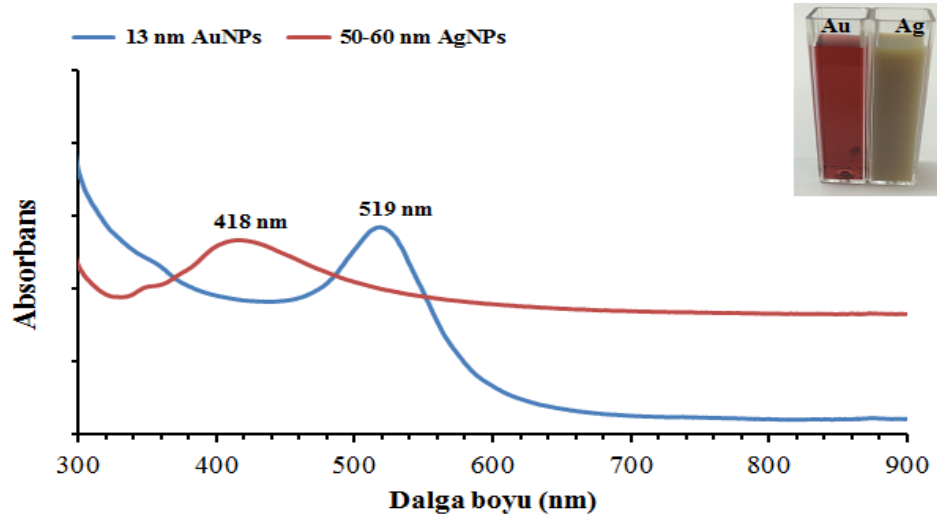
Şekil 4.1 AgNPs UV-görünür bölge absorbans spektrumu.

Yapılan ölçüm sonrasında 50-60 nm AgNPs için 418 nm’de absorpsiyon bandı gözlemlendi. Şekil 4.2’de sentezlenen 13 nm AuNPs absorbans spektrumu verilmektedir.



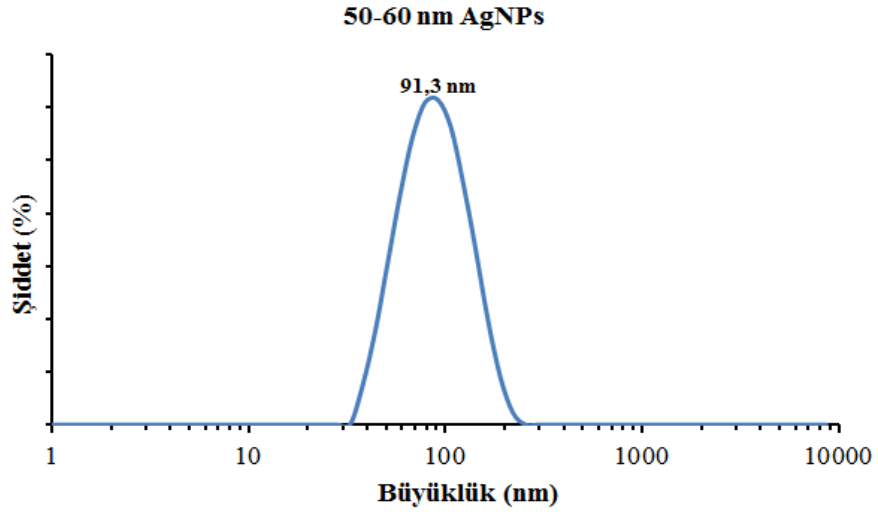
Şekil 4.2 AuNPs UV-görünür bölge absorbans spektrumu.

Şekil 4.2’de görüldüğü gibi 13 nm AuNPs için 519 nm dalga boyunda absorpsiyon bandı gözlemlendi. Şekil 4.3’de sentezlenen AuNPs ve AgNPs alınan absorbans spektrumları karşılaştırmalı olarak verilmektedir.



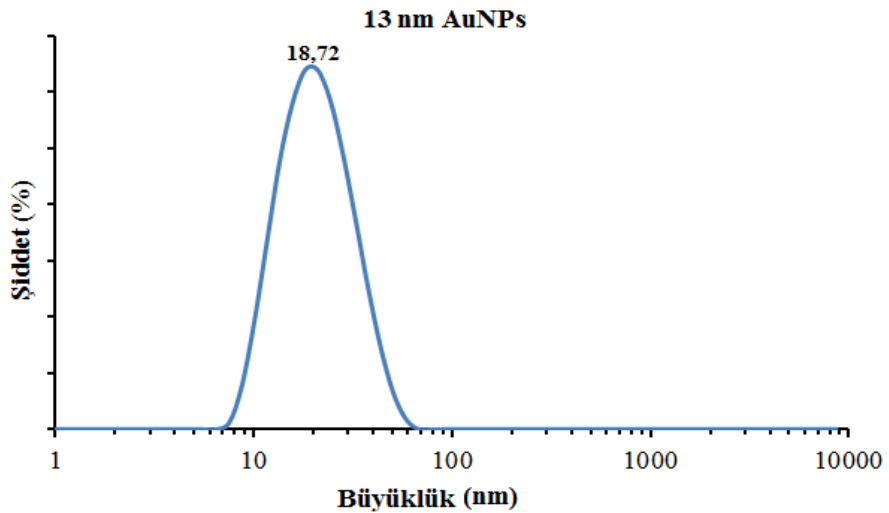
Şekil 4.3 AuNPs ve AgNPs absorbans spektrumları.

## 4.2 Sentezlenen Nanoparçacıkların Zetasizer ile Karakterizasyonu



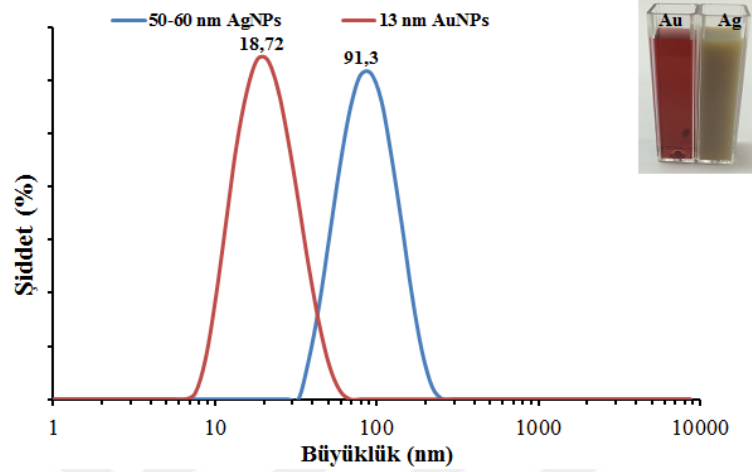
**Şekil 4.4** AgNPs büyüklük dağılım grafiği

Şekil 4.4'te Zetasizer ile yapılan büyüklük dağılım grafiğinden de anlaşıldığı gibi 50-60 nm AgNPs boyutlarından daha büyük olduğu gözlemlendi. Bunun nedeni ise oluşan her bir nanoparçacığın etrafında oluşturmuş olduğu hidrodinamik çapı ile birlikte boyut analizi yapılmasıdır. Nanoparçacık ortalama çapı 50-60 nm civarındadır hidrodinamik çap ise 91,3 nm olarak ölçüldü. Şekil 4.5'te 13 nm boyutlarındaki AuNPs büyüklük dağılım grafiğinde de görüldüğü gibi sentezlenen nanoparçacıkların büyüklük analizleri verilmektedir.



**Şekil 4.5** AuNPs büyüklük dağılım grafiği

Şekil 4.5'te 13 nm boyutundaki AuNPs hidrodinamik çapı 18,72 olarak gözlemlendi. Şekil 4.6'da farklı büyüklüklerdeki yuvarlak AuNPs ve AgNPs büyüklük dağılımların karşılaştırılması verilmektedir.



Şekil 4.6 AuNPs ve AgNPs büyüklük dağılım grafiği.

AuNPs ve AgNPs lerin çapı Şekil 4.6'da olduğu gibi birbirinden farklı büyüklüklere sahiptir. AuNPs hidrodinamik çapı 18,72 nm olarak ölçüldü AuNPs parçacık çapları ise yaklaşık 13 nm civarlarındadır. AgNPs'lerin ise hidrodinamik çapları 91,3 nm olarak ölçüldü parçacık büyüklükleri ise yaklaşık 50-60 nm civarlarındadır. Şekil 4,6'da görüldüğü gibi sentezlenen nanoparçacıkların gerçek büyüklüklerinden daha büyük boyut dağılımları gözlemlendi. Bunun nedeni hidrodinamik çap, parçacığın etrafında oluşan elektriksel çift tabaka ile birlikte oluşturduğu büyüklüktür. O yüzden her zaman hidrodinamik çap, parçacık boyutundan daha büyüktür. Ayrıca nanoparçacıkların zeta potansiyel (yüzey yükü) ölçümleri de yapıldı. Tablo 4.1'de nanoparçacıkların Zetasizer cihazından elde edilen veriler görülmektedir.

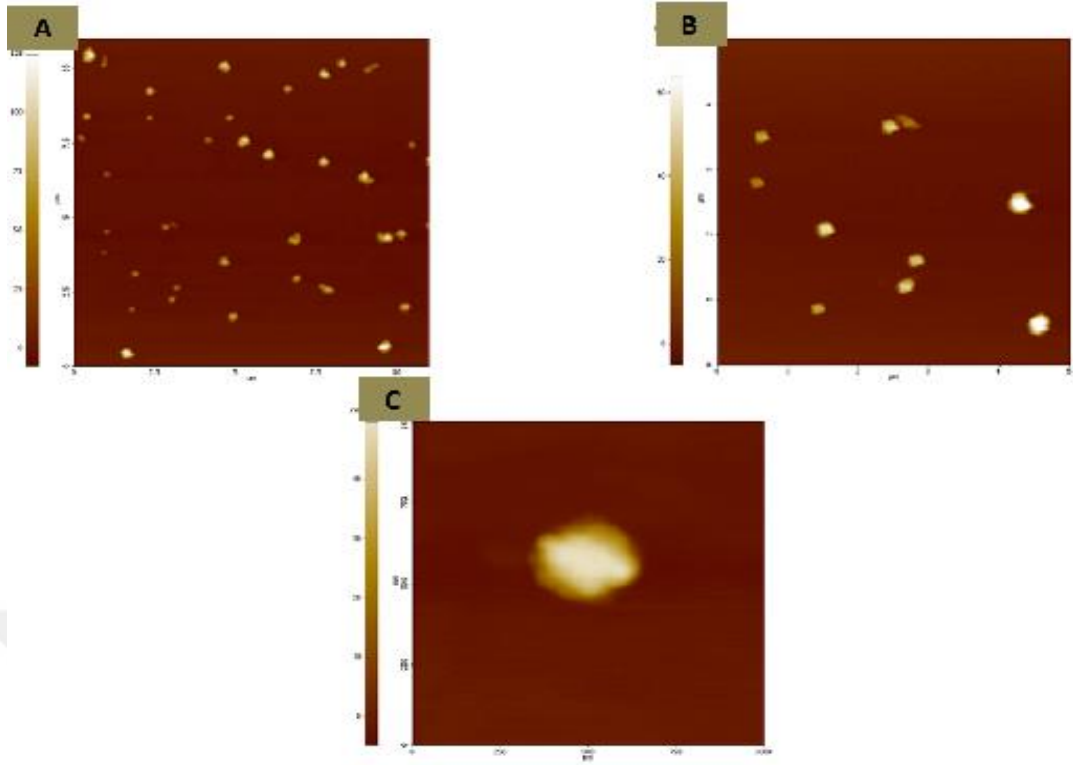
**Tablo 4.1** AuNPs ve AgNPs Zetasizer analiz sonuçları.

NANOPARÇACIK	PdI	Büyükük (nm)	Zeta Potansiyeli (mV)
13 nm AuNPs	0,196	18,72	-40,6±2,26
50-60nmAgNPs	0,297	91,3	-46,3±1,42

**PdI:** Süspansiyon ortamındaki nanoparçacıkların boyutlarının birbirine yakınlığını ifade etmektedir. Bulunan değer ne kadar minimum seviyede ise nanoparçacıkların boyutlarının birbirine yakınlığı fazladır. Tablo 4.1’de görüldüğü gibi nanoparçacıkların yüzey yükleri negatif (-) olarak bulundu. Bunun nedeni de nanoparçacık sentez aşamasında indirgen olarak kullandığımız trisodyum sitrat dihidrat ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2$ ) bileşiğindeki negatif yüklü olan sitratların nanoparçacık yüzeylerine bağlanmasıyla oluşmaktadır. Sitrat stabilizör görevi yaparak, süspansiyon içindeki nanoparçacıkların biraraya gelmesine engel olmaktadır.

#### 4.3 Sentezlenen Nanoparçacıkların AFM ile Karakterizasyonu

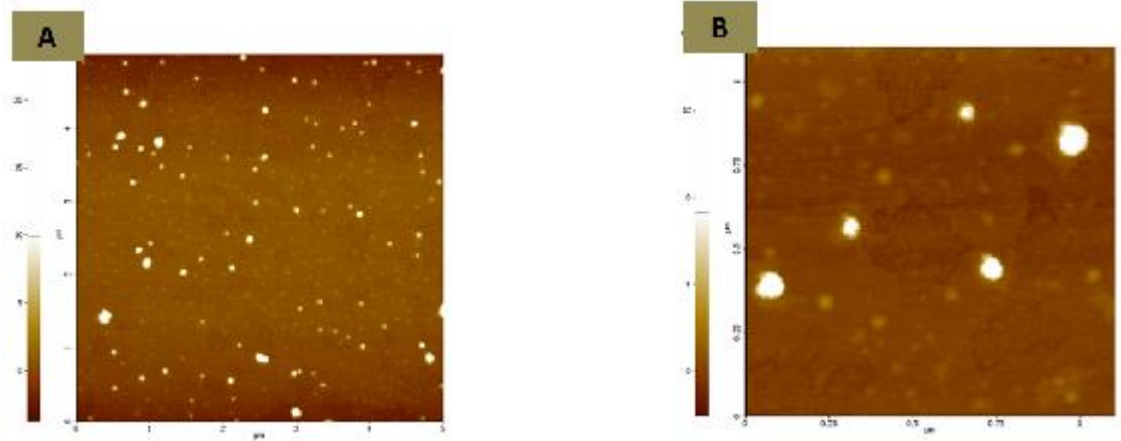
Kimyasal indirgeme yöntemi ile sentezlenen süspansiyon ortamındaki AuNPs ve AgNPs Atomik AFM ile karakterize edildi. Karakterizasyon işlemi için proje kapsamında temin edilen Park-Systems XE-100E serisi AFM ile ve Non-contact modunda PPP-NCHR cantilever kullanılarak yapıldı. Süspansiyon ortamında bulunan nanoparçacıklar bir mika üzerine 5  $\mu$ L damlatıldı ve kurumaya bırakıldı daha sonra oda ortamında kuruyan süspansiyon AFM yardımı ile AuNPs ve AgNPs karakterizasyonu yapıldı. Şekil 4.7’de farklı büyütme ile süspansiyon ortamındaki AgNPs AFM görüntüleri verilmektedir.



**Şekil 4.7** Süspansiyon ortamındaki AgNPs AFM görüntüleri

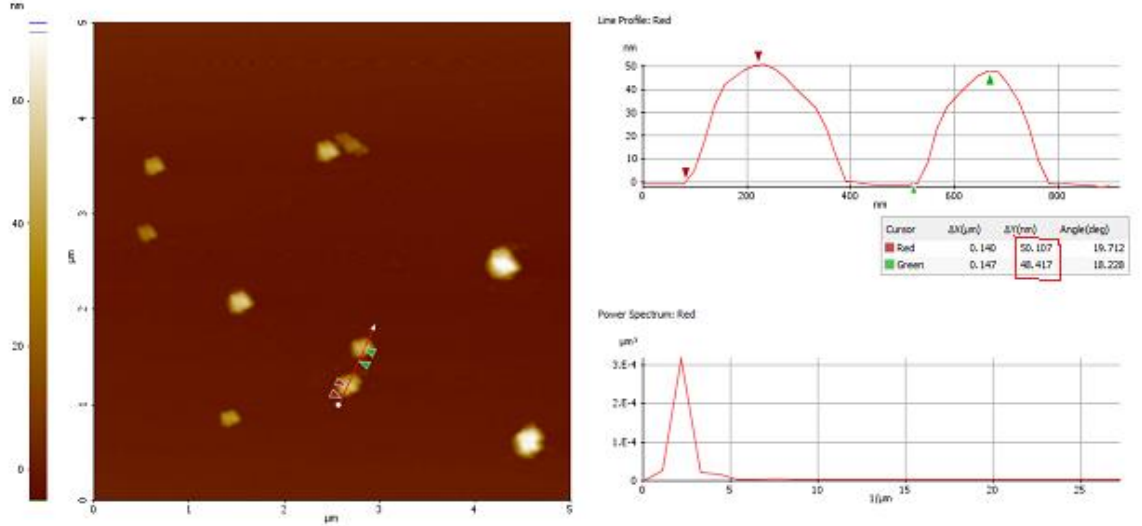
A) 10x10 μm B) 5x5 μm C) 1x1 μm.

Şekil 4.8'te aynı yöntemle alınan AuNPs AFM görüntüleri görülmektedir.



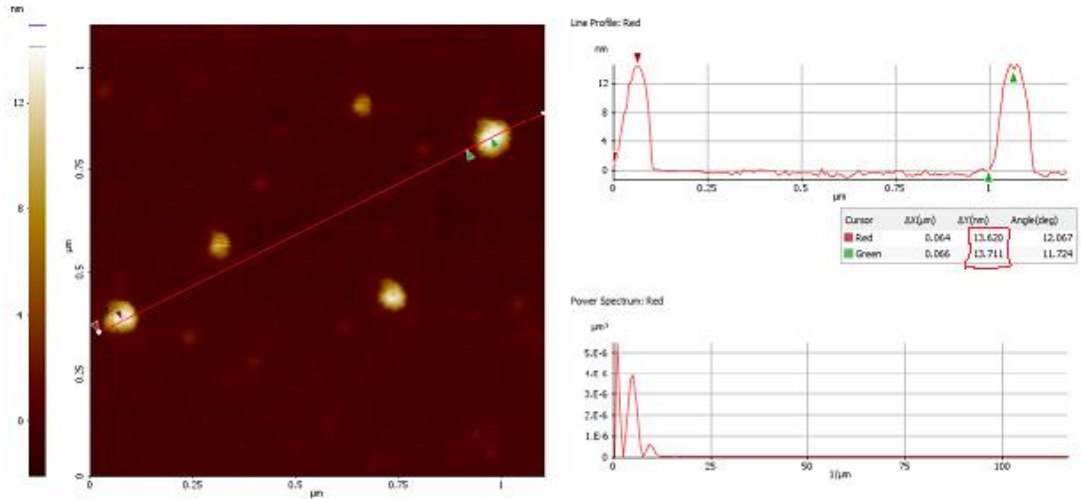
**Şekil 4.8** Süspansiyon ortamındaki AuNPs AFM görüntüleri A) 5x5 μm) B) 1x1 μm

Her iki sentezlenen parçacıklarında yuvarlak olduğu elde edilen AFM görüntülerinden anlaşılmaktadır. Ayrıca parçacıkların büyüklüğü hakkında bilgi sahibi olmak için alınan görüntülerin çizgi analizi yapıldı (Şekil 4.9)



Şekil 4.9 50 nm AgNPs AFM görüntüsünün çizgi analizi

Aynı zamanda süspansiyon ortamında bulunan nanoparçacıklarda bir yığılma olmadığını nanoparçacıkların birbirinden bağımsız bir şekilde ortamda bulduklarını belirlenmiş oldu. Şekil 4.10'da AuNPs çizgi analiz sonuçları verilmektedir.

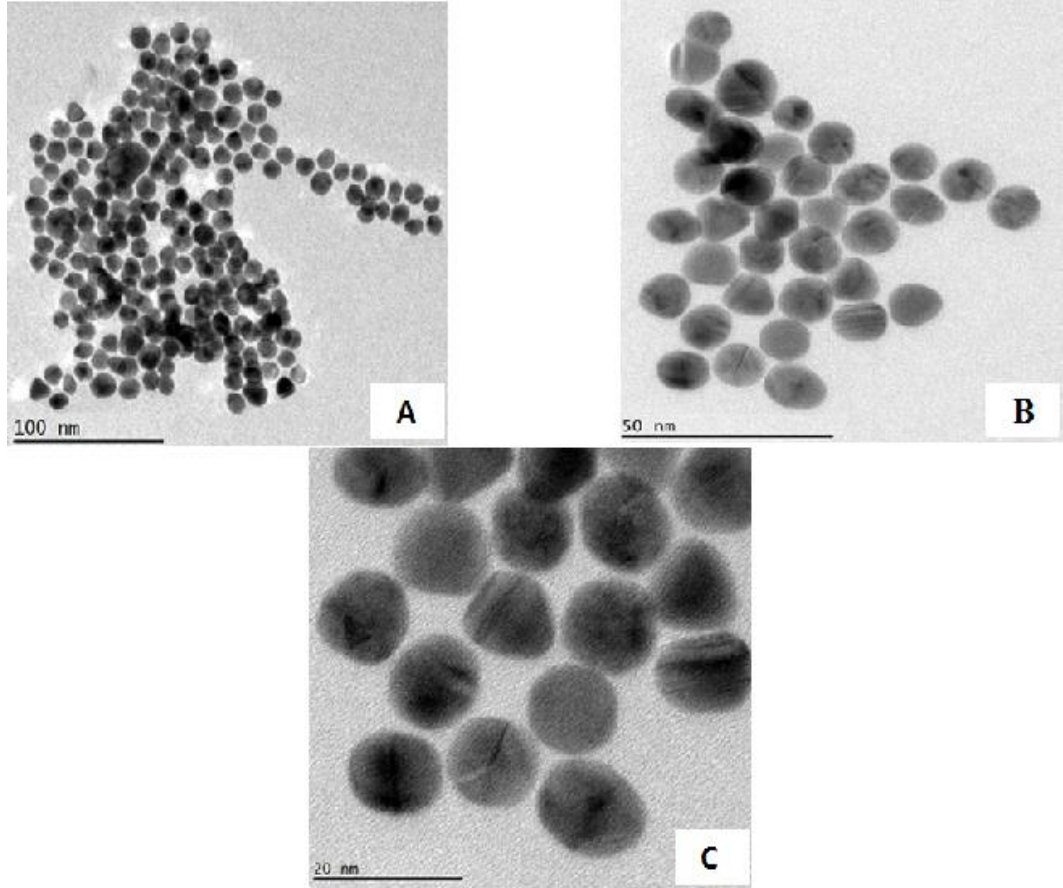


Şekil 4.10 13 nm AuNPs AFM görüntüsünün çizgi analizi

Şekil 4.10’da görüldüğü gibi y eksenini üzerinden iki noktadan alınan fark oluşan AuNPs büyüklüğünü vermektedir. Ortalama boyutlar 13 nm civarında olduğu görülmektedir. Aynı şekilde Şekil 4.9’da AgNPs büyüklüğünün de 50 nm civarında olduğu görülmektedir. Sonuç olarak elde ettiğimiz AFM çizgi analizleri sonuçları NPs’lerin büyüklüklerini doğrulamaktadır.

#### 4.4 Sentezlenen Nanoparçacıkların Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ile Karakterizasyonu

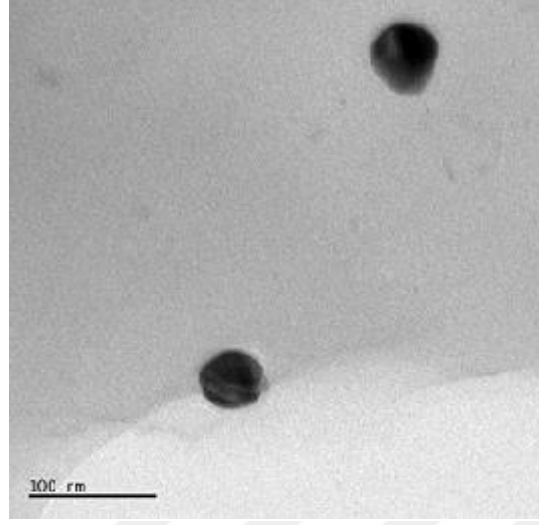
Sentezlenen nanoparçacıkların büyüklüklerini ve şekillerini doğrulamak amacıyla TEM analizleri yapıldı. TEM analizini TUBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Elektron Mikroskop Laboratuvarında JEOL 2100 JEM HRTEM cihazı ile yapıldı. Şekil 4.11’de AuNPs TEM ile morfolojik görüntüleri verilmektedir.



Şekil 4.11 13 nm AuNPs farklı büyütmelerdeki TEM görüntüleri.



Görüntülerde görüldüğü gibi sentezlenen AuNPs yuvarlak ve büyüklükleri yaklaşık 13 nm'dir. Şekil 4.12'de ise sentezlenen AgNPs TEM görüntüsü verilmektedir.

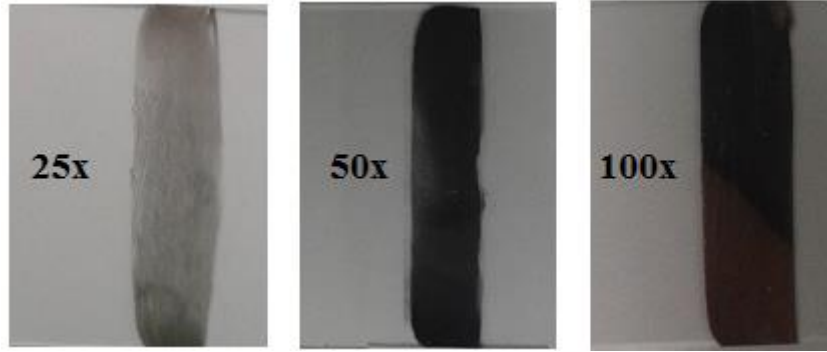


**Şekil 4.12** 50-60 nm AgNPs TEM görüntüsü

Sentezlenen AgNPs büyüklüğünün yaklaşık 50 nm ve şeklinin yuvarlak olduğu TEM görüntüsünde görülmektedir.

#### **4.5 YZRS Aktif Yüzeylerin Karakterizasyonu**

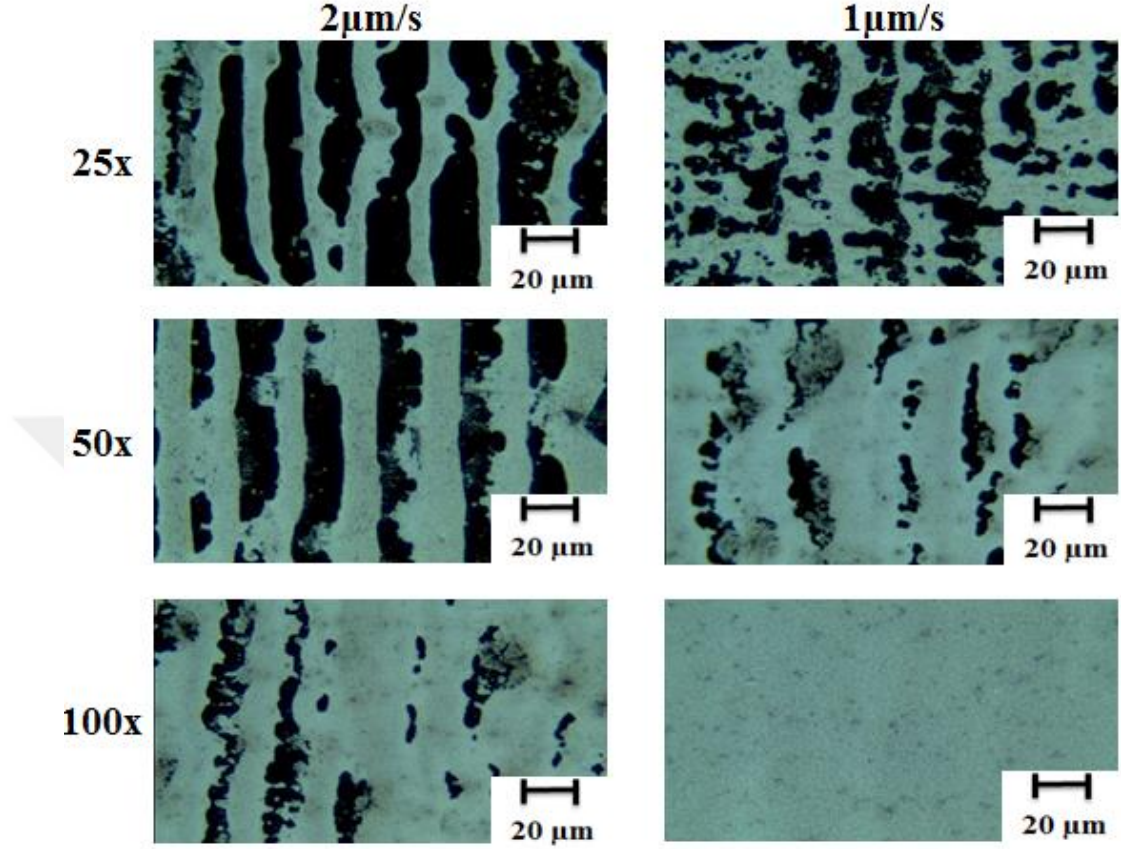
Şekil 4.13'te farklı derişimlere sahip AgNPs cam lam üzerine biriktirilerek (Cihaz hızı: 1  $\mu\text{m/s}$ ) elde edilen ince filmlerin fotoğrafları verilmektedir



**Şekil 4.13** Cam lam üzerine farklı derişimlerde AgNPs biriktirilmesiyle oluşturulan ince filmlerin fotoğrafları.

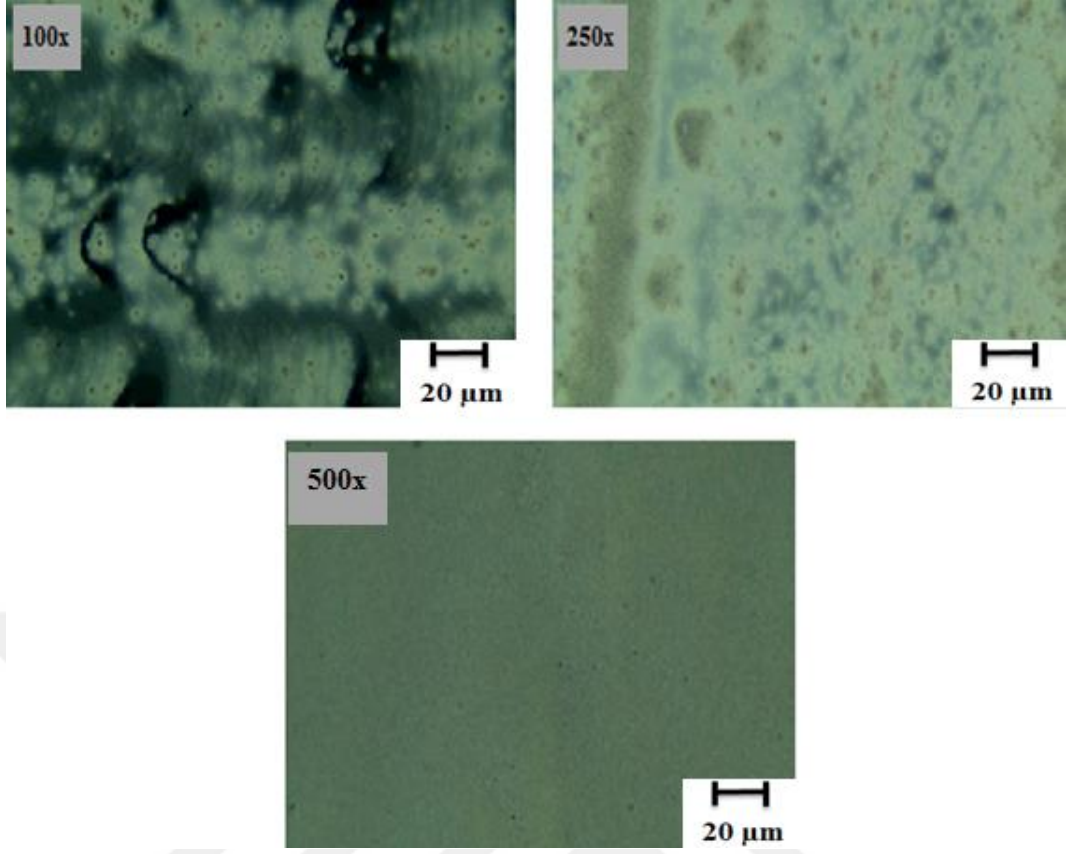
Faklı derişimlerde hazırlanan yüzeyler farklılık göstermektedir. Süspansiyon içerisindeki nanoparçacık miktarı artıkça oluşan yüzey daha homojen ve sıklıkla dizilişleri görülmektedir. 100X derişimde hazırlanan yüzeylerin yüzey alanı diğer

derişimlere göre daha fazladır. Şekil 4.14'te farklı düzenek hızları kullanılarak hazırlanan AgNPs yüzeylerinin 50X objektifle alınan ışık mikroskop görüntüleri verilmektedir.



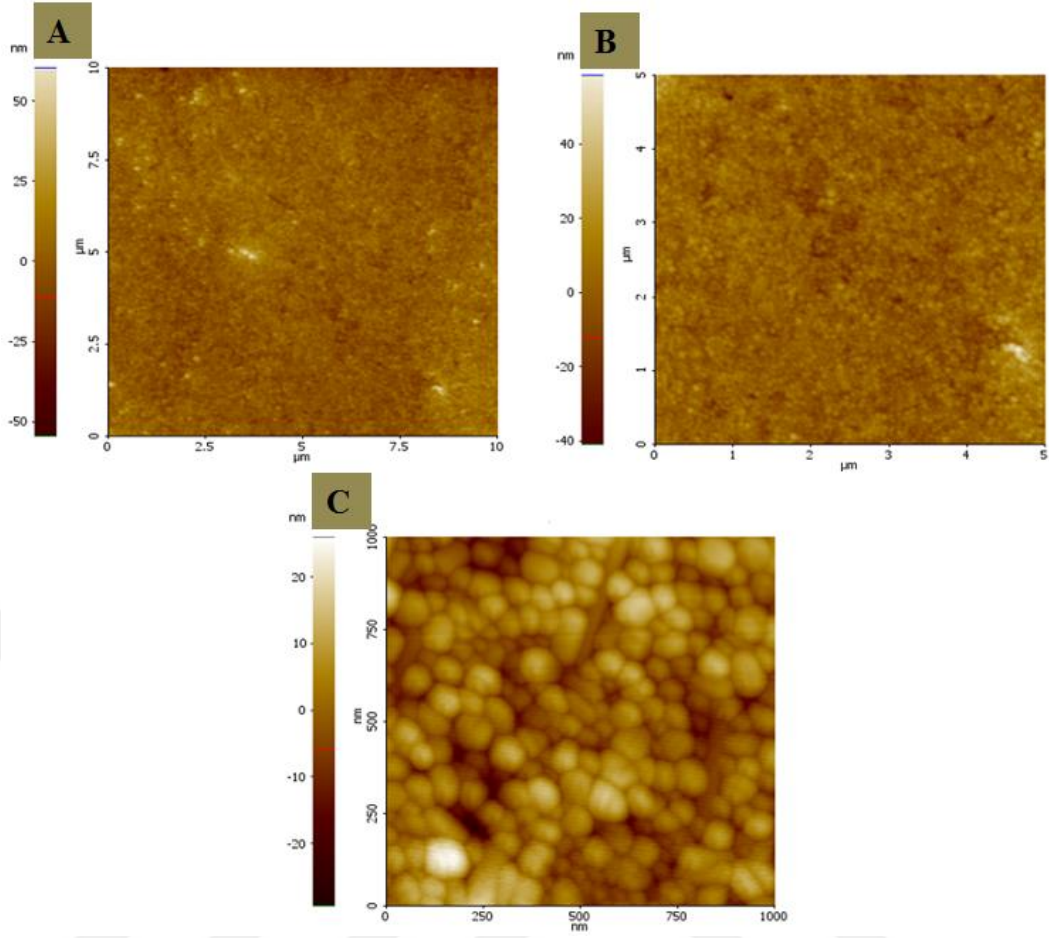
**Şekil 4.14** Farklı derişimlerde AgNPs kullanılarak hazırlanan ince filmlerin ışık mikroskop görüntüleri

Yürütme hızı farkından nanoparçacıkların yüzeyde dağılımları, alınan görüntülerde görüldüğü gibi farklılık oluşmuştur. 1 µm/s hızla yürütülen yüzeylerde AgNPs daha fazla alana düzenli olarak biriktirilebilmektedir. Aynı zamanda homojen görünüm daha düzgündür. En düzenli ve homojen olarak elde edilen yüzey 100X AgNPs kullanılarak ve 1 µm/s düzenek hızı kullanılarak hazırlanan yüzeydir. AuNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerin ışık mikroskop görüntüleri Şekil 4.15'de görülmektedir. Nanoparçacığın derişim miktarı artıkça oluşan yüzeylerin ortamdaki nanoparçacığın miktar artışından dolayı lam üzerine birikimi ve oluşturulan yüzey alanları artmaktadır. Süspansiyon içerişindeki nanoparçacıklar ne kadar fazla ise oluşturulan yüzeylerin arasındaki boşluklar azalmaktadır.



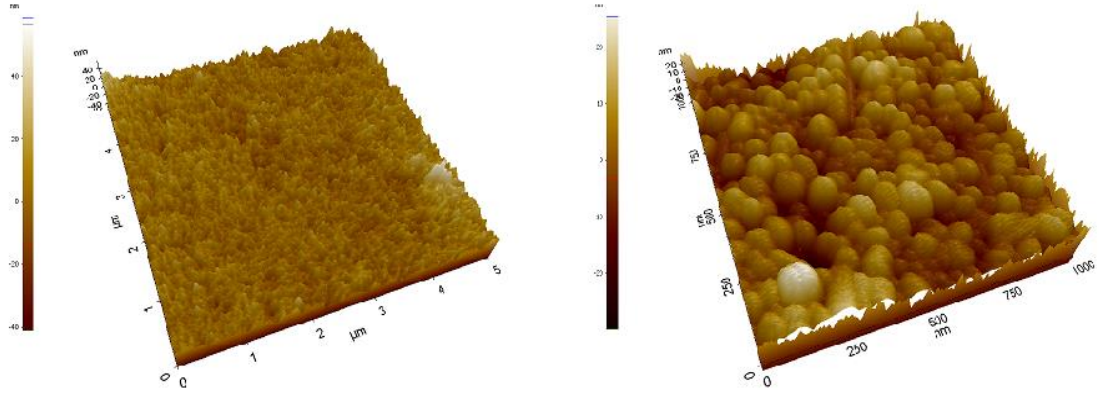
**Şekil 4.15** Farklı derişimlerde AuNPs kullanılarak hazırlanan ince filmlerin ışık mikroskop görüntüleri.

Hazırlanan yüzeylerin karakterizasyonunu detaylı bir şekilde yapmak için AFM ve SEM analizleri yapıldı. Şekil 4.16'da 100X AgNPs kullanılarak hazırlanan AgNPs ince filmlerin AFM görüntüleri verilmektedir.



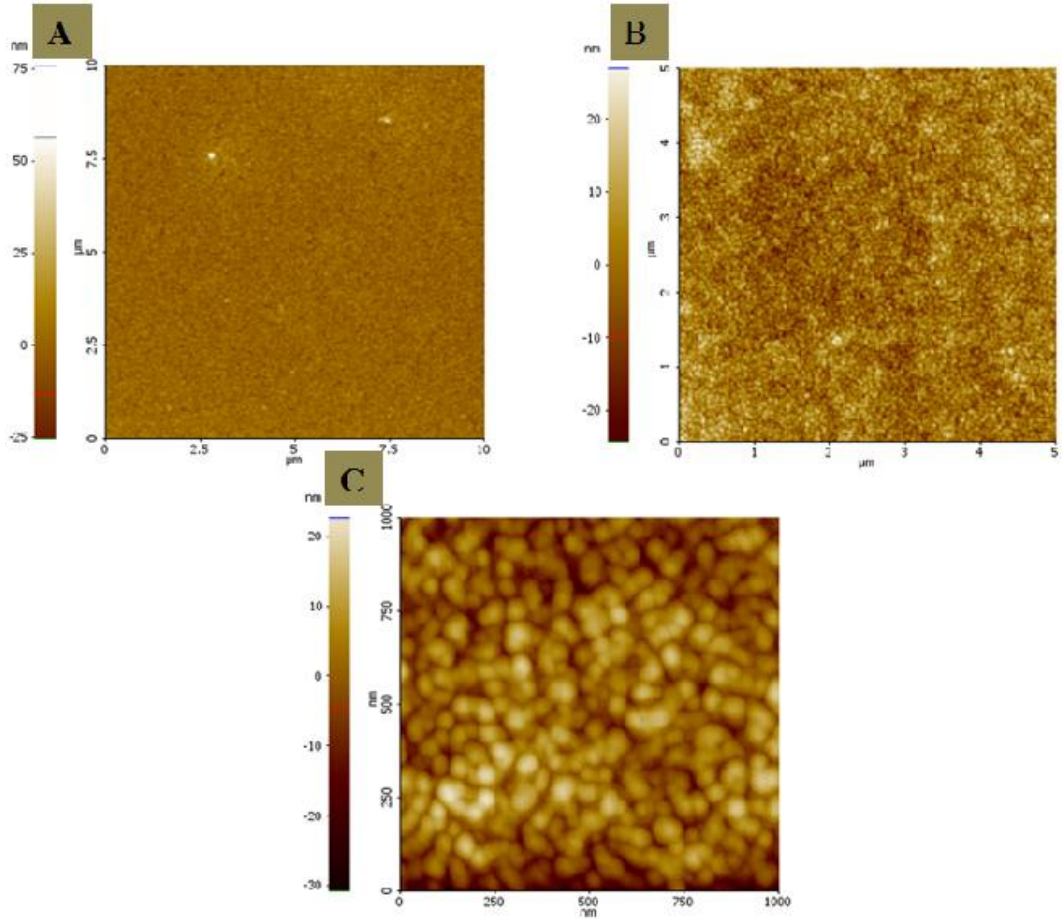
Şekil 4.16 AgNPs ince film AFM görüntüleri A) 10X10 μm B) 5X5 μm C) 1X1 μm

AFM yardımıyla, oluşturulan YZRS aktif yüzeylerin karakterizasyonu yapıldı. Alınan görüntüler ile nano parçacıkların varlıkları ve aynı zamanda lam üzerine birikim şekilleri gözlemlendi. 10x10 μm'lik görüntü ile nanoparçacıkların homojen dağılımı ve AgNPs'lerin düzenli alan büyüklüğü gözlemlenirken 1x1 μm'lik görüntü ile nanoparçacıkların şekilleri, boyutları ve lam üzerine birikim şekilleri gözlemlendi. Şekil 4.17'de AFM ile alınan 3D görüntüleri verilmektedir.

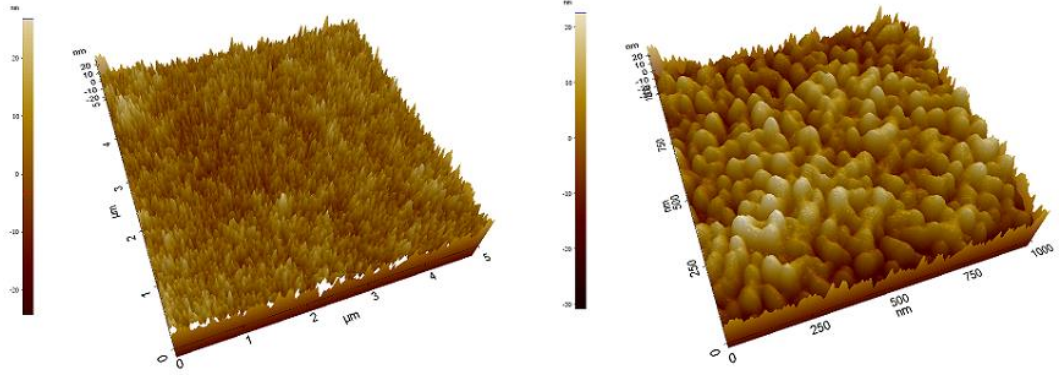


**Şekil 4.17** AgNPs ince film AFM 3D görüntüleri.

AFM ile alınan 3D görüntülerin aynı zamanda yapılan yüzeyin lam üzerine birikimlerini daha detaylı bir şekilde görmemizi sağlayarak oluşan yüzeylerin yüksekliği ve nanoparçacıkların şekillerini daha detaylı göstermektedir. Şekil 4.18 ve 4.19’da 13 nm AuNPs ile oluşturulan nano yüzeylerin AFM görüntüleri verilmektedir.

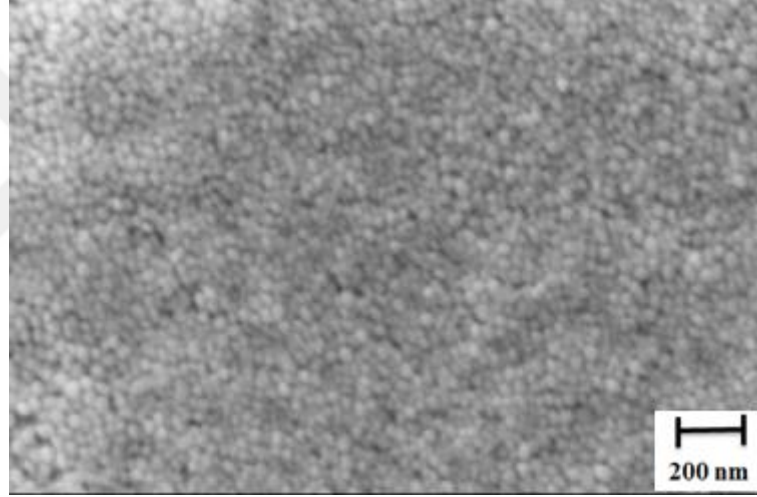


**Şekil 4.18** AuNPs ince film AFM görüntüleri A) 10X10  $\mu\text{m}$  B) 5X5  $\mu\text{m}$  C) 1X1  $\mu\text{m}$



**Şekil 4.19** AuNPs ince film AFM 3D görüntüleri

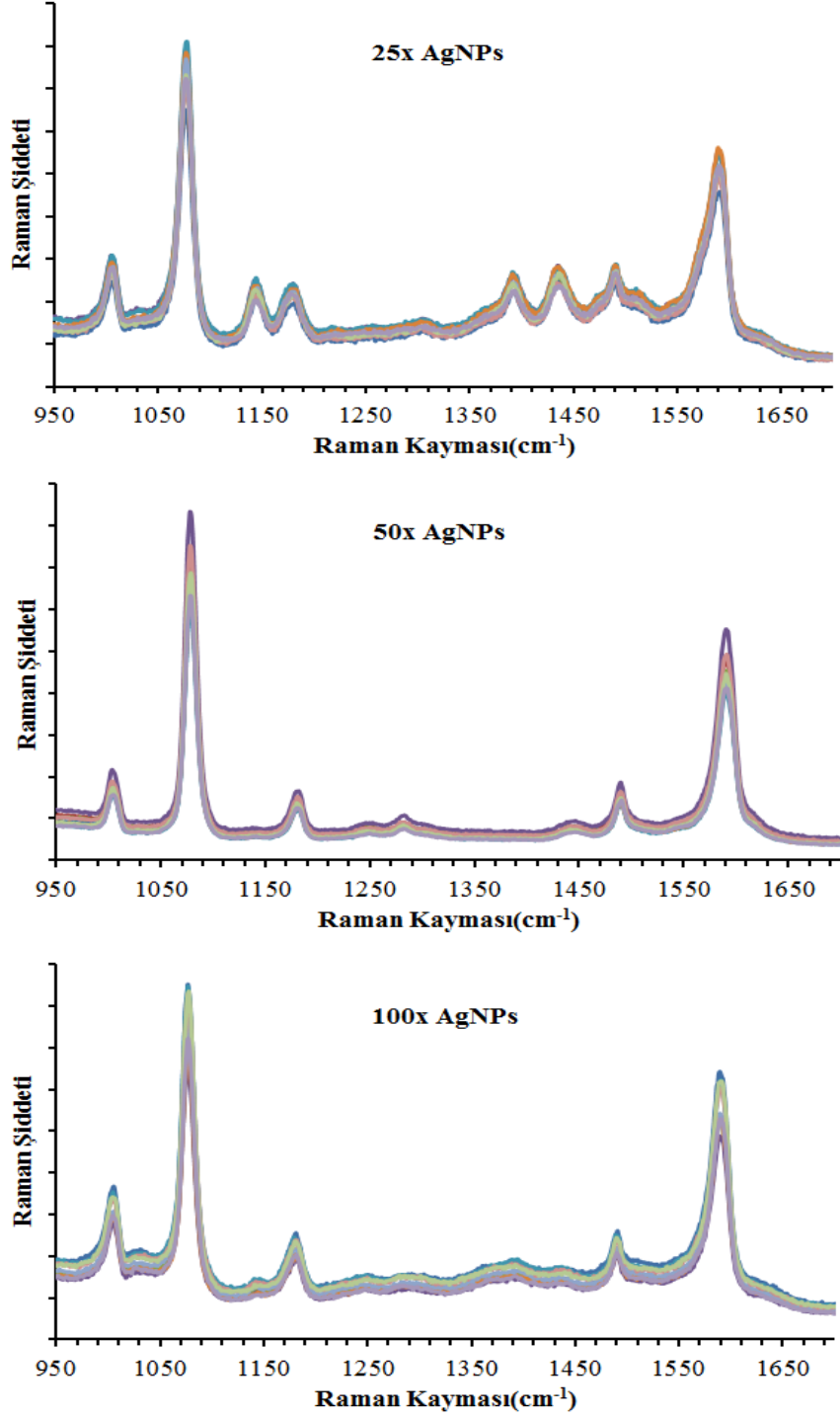
Ayrıca SEM analizleri ile yüzeyin özellikleri incelendi. Şekil 4.20’de AgNPs filmin SEM görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 4.20** AgNPs filmin SEM görüntüsü.

Hem AFM hem SEM analizleri sonucu elde edilen yüzeylerin geniş bir alanda homojen olarak elde edildiğini göstermektedir.

Yaptığımız çalışmalar sonucu hazırlanan AgNPs yüzeyler aktif moleküller ile inkübe edildikten sonra YZRS spektrumları alındı. Şekil 4.21’de farklı derişimdeki AgNPs yüzeyler üzerindeki ATP moleküllerinden alınan YZRS spektrumları verilmektedir. YZRS spektrumları Renishaw inVia Raman mikroskopyu ile alındı. Deneysel koşullar AgNPs yüzeyler için % 0,005 lazer gücünde ve 1500 static modunda alındı. Lazerin örnek üzerinde kalma süresi 1 s’dir.



**Şekil 4.21** Farklı derişimdeki AgNPs yüzeyleri üzerindeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları.

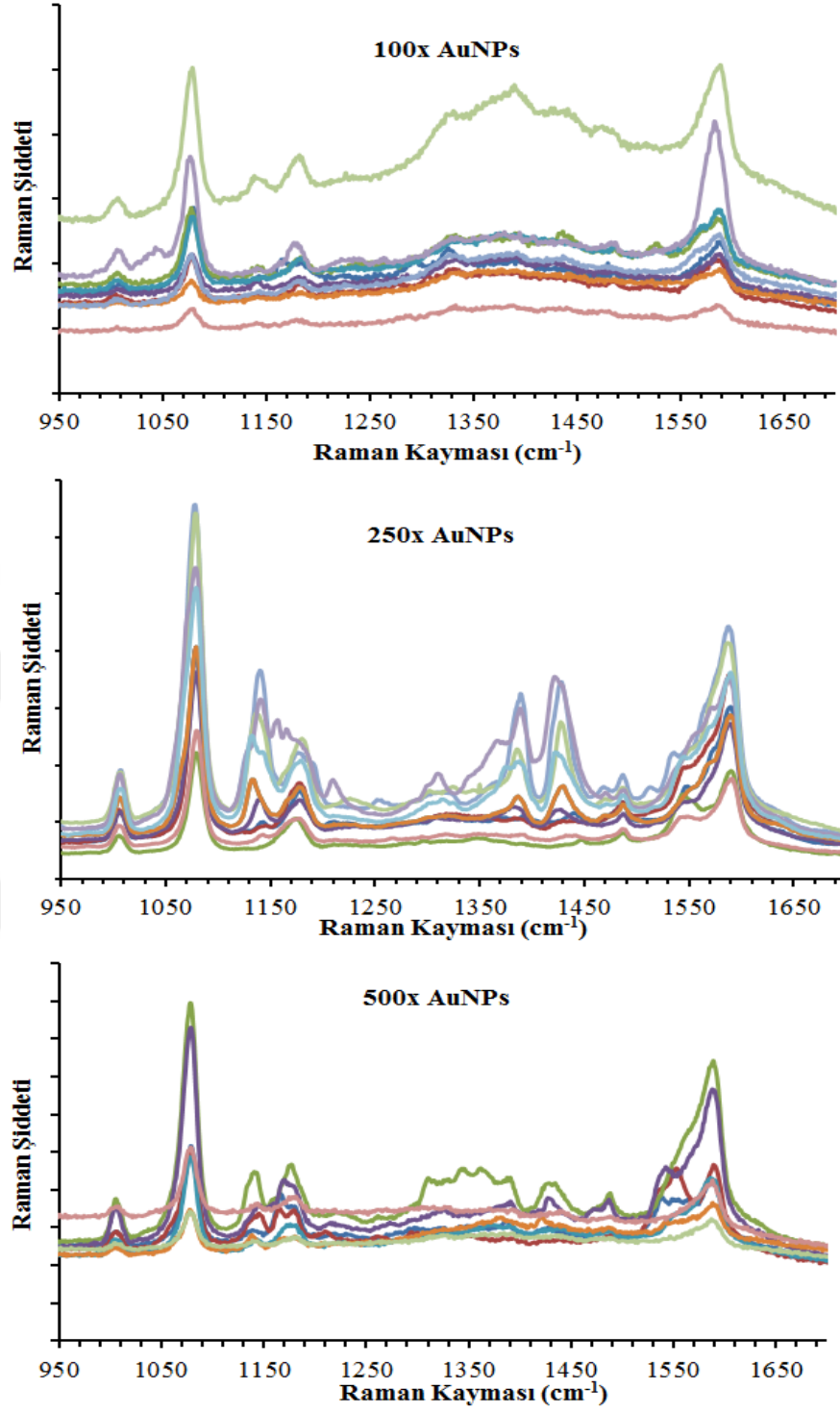
Şekil 4.21’de görüldüğü gibi 25X, 50X ve 100X 3 farklı derişimlerdeki AgNPs ile oluşturulan yüzeylerin farklı konumlarından alınan 10 farklı YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirlikleri test edildi. ATP elde edilen YZRS pikleri C-C bağlarından kaynaklanan  $1590\text{ cm}^{-1}$ , C-S bağlarından kaynaklanan  $1078\text{ cm}^{-1}$  şiddetli olarak gözlemlendi. Tekrarlanabilirlik göstergesi olarak elde edilen spektrumlardan varyasyon katsayı hesaplandı (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2** Farklı derişimlerdeki AgNPs yüzeylere inkübe edilen ATP molekülün C-S bağlarından elde edilen YZRS sinyallerinin pik değerleri

AgNPs Derişimleri	Pik Ortalama		Standart sapma (s)		Varyasyon katsayısı(%)	
	Merkez	Pik Şiddeti	Merkez	Pik Şiddeti	Merkez	Pik Şiddeti
25X	1076,842	12188,01	0,12381	813,726	0,011497	6,676446
50X	1078,323	30766,98	0,03093	3320,109	0,002868	10,79114
100X	1077,029	15967,77	0,140036	2254	0,013002	14,11599

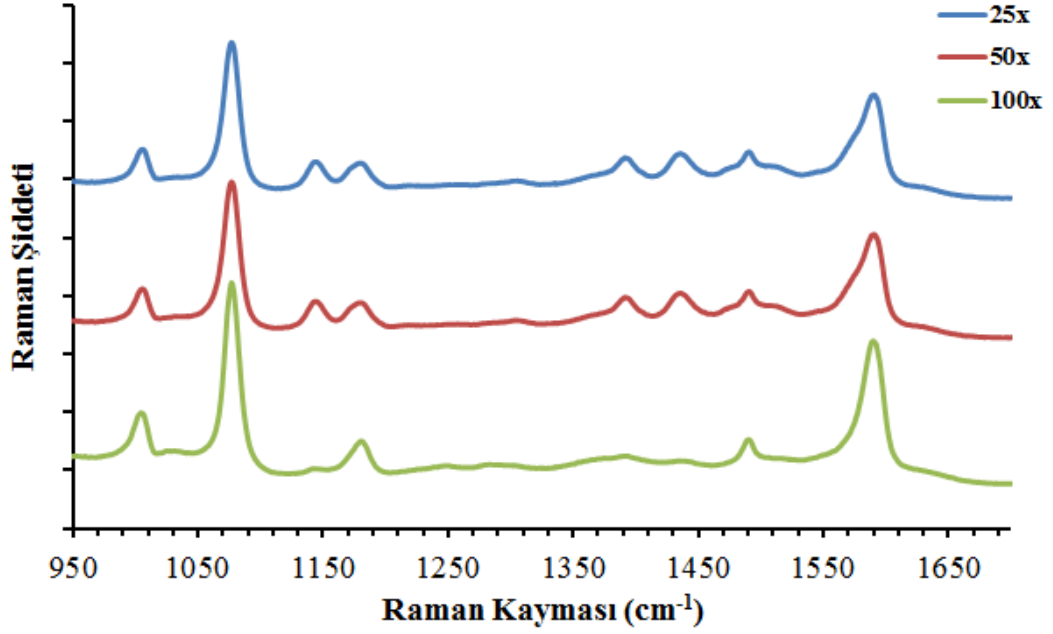
Farklı derişimlerde hazırlanan AuNPs yüzeyler inkübe edilen ATP moleküllerin YZRS spektrumları alınarak tekrarlanabilirlik testleri de yapıldı. 100X, 250X ve 500X süspansiyonlar hazırlanarak nano yüzeyler hazırlandı. YZRS spektrumları alınarak aynı derişim sahip yüzeylerin farklı konumlarından spektrumlar alındı ve test edildi. Şekil 4.22’te farklı derişimlerdeki AuNPs yüzeylere inkübe edilen ATP moleküllerinin YZRS spektrumları verilmektedir. Spektrumlar incelendiğinde elde edilen yüzeylerin tekrarlanabilirliğinin iyi olmadığı görülmektedir.





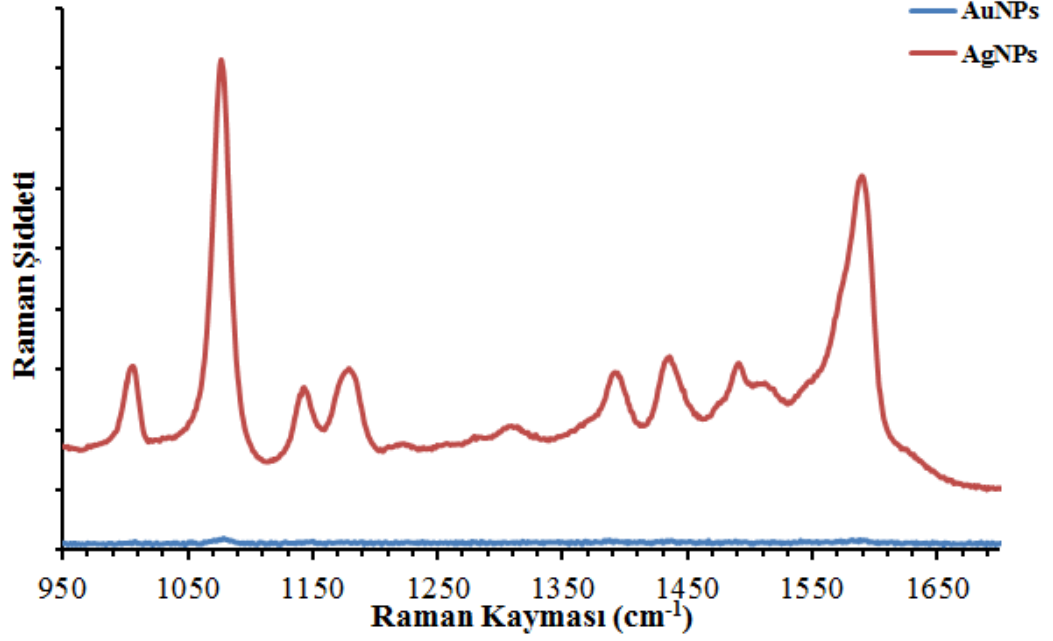
Şekil 4.22 Farklı derişimdeki AuNPs yüzeylerine inkübe edilen ATP moleküllerinin YZRS spektrumları.

Hazırlanan farklı derişimlerdeki AgNPs yüzeylere ATP molekülü inkübe edilerek YZRS spektrumları alınarak YZRS aktivite karşılaştırması yapıldı. Şekil 4.23'de görüldüğü gibi 25X, 50X ve 100X AgNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerin YZRS aktivitesi test edildi. En şiddetli YZRS spektrumu 100X AgNPs kullanılarak hazırlanan yüzeyden elde edildi.



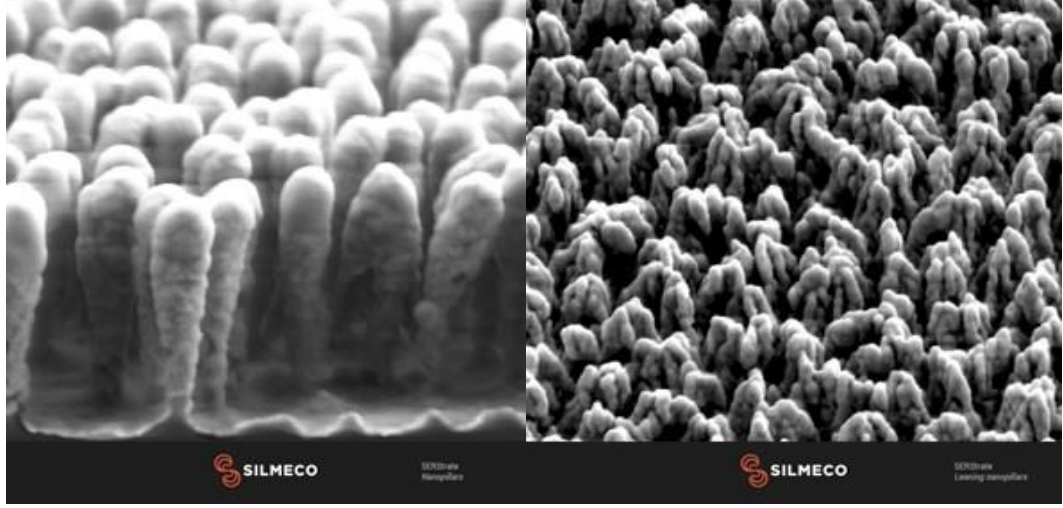
**Şekil 4.23** Farklı derişimlerdeki AgNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerdeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları.

AuNPs ve AgNPs kullanılarak elde edilen yüzeyler YZRS aktiviteleri karşılaştırılması da yapıldı (Şekil 4.24). Aynı koşullarda AuNPs kullanılarak elde edilen yüzeyden spektrum alınamazken AgNPs elde edilen yüzeylerden şiddetli YZRS spektrumları alındı. Bundan sonraki çalışmalarda AuNPs kullanılarak hazırlanan yüzeyler kullanılmayacaktır. Bunun nedeni YZRS aktivitesinin düşük olması, tekrarlanabilirliğinin kötü olması ve pahalı olmasıdır. Bundan sonraki tüm çalışmalarda 100X AgNPs kullanılarak hazırlanan ince filmler kullanıldı.



**Şekil 4.24** AgNPs ve AuNPs kullanılarak hazırlanan yüzeylerdeki ATP moleküllerinin YZRS spektrumları

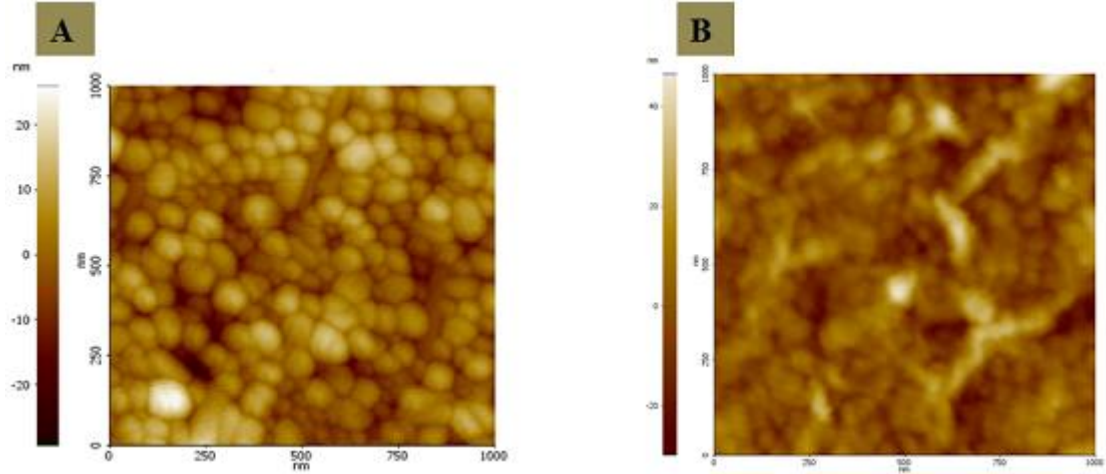
Ticari olarak temin edilen YZRS aktif yüzeyleri (Şekil 4.25) ve iletim-derleme tekniği ile yaptığımız AgNPs yüzeylere 4-ATP molekülü inkübe edilerek YZRS spektrumları alındı. Yüzeyler, etanol ortamında hazırlanmış 4-ATP molekülleri içerisinde 1.30 – 2 saat oda sıcaklığında bekletilerek 4-ATP moleküllerinin inkübe edilmesi sağlandı. Daha sonra inkübe edilen moleküllerden YZRS spektrumları alınarak karşılaştırılma yapıldı. Yapılan çalışma sonucunda kendi yaptığımız AgNPs yüzeyler ile hazır alınan yüzeylerden daha şiddetli spektrumlar alındı. Kendi yaptığımız yüzeylerden elde ettiğimiz verimlerden dolayı bundan sonraki tez basamaklarında iletim derleme tekniği ile yapmış olduğumuz 100X AgNPs kullanılarak hazırlanan kendi yüzeylerimiz kullanıldı.



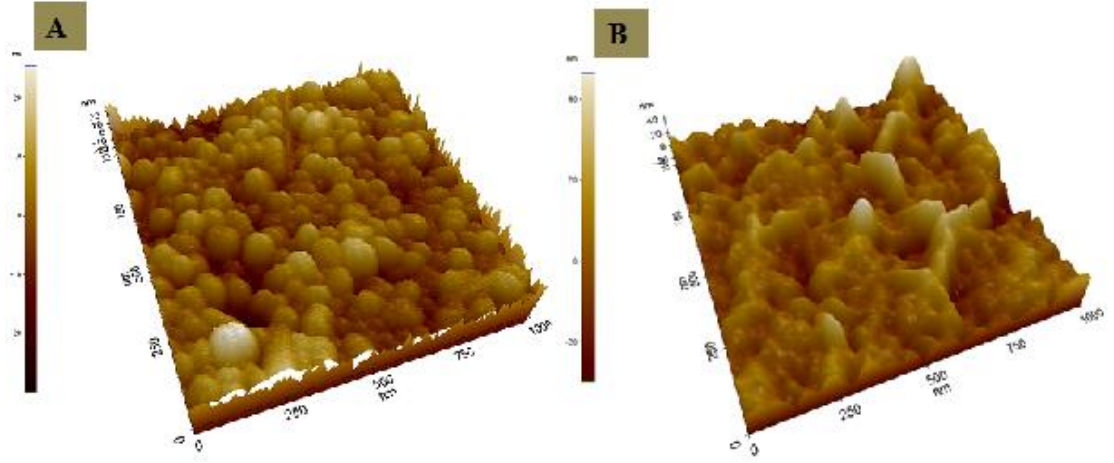
Şekil 4.25 Hazır alınan Ag yüzeylerin SEM görüntüleri.

#### 4.6 YZRS Aktif Yüzeylerine Modifiye Edilen Spesifik Antikor Karakterizasyonu

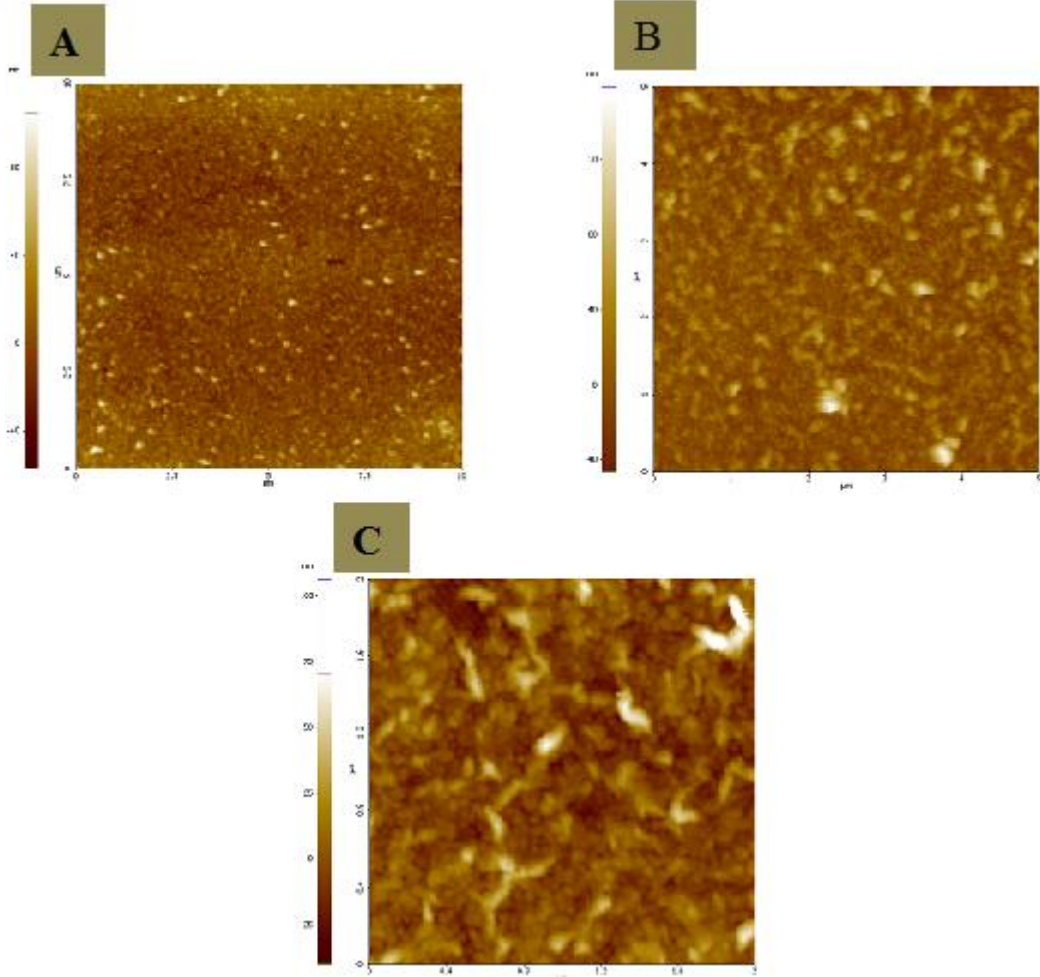
AgNPs yüzeylerine bağlanan model bakterilerin spesifik antikorların karakterizasyonu için AFM görüntüleri alındı. Alınan görüntüler antikorların, AgNPs ince film yüzeylerine bağlandığını normal ince film görüntülerinden farklı olduğunu Şekil 4.26-4.28’de verilmektedir. AFM görüntüleri anti-*L. pneumophila* antikorunu (Ab65287) ile modifiye edilen yüzeylerden alındı. Kullanılan antikor derişimi 250 µg/mL’dir.



Şekil 4.26 A) AgNPs ince film ve B) AgNPs ince film yüzeylerine bağlanan Antikorların AFM görüntüleri.



Şekil 4.27 A) AgNPs ince film ve B) AgNPs ince film yüzeylerine bağlanan antikorların AFM 3D görüntüleri.

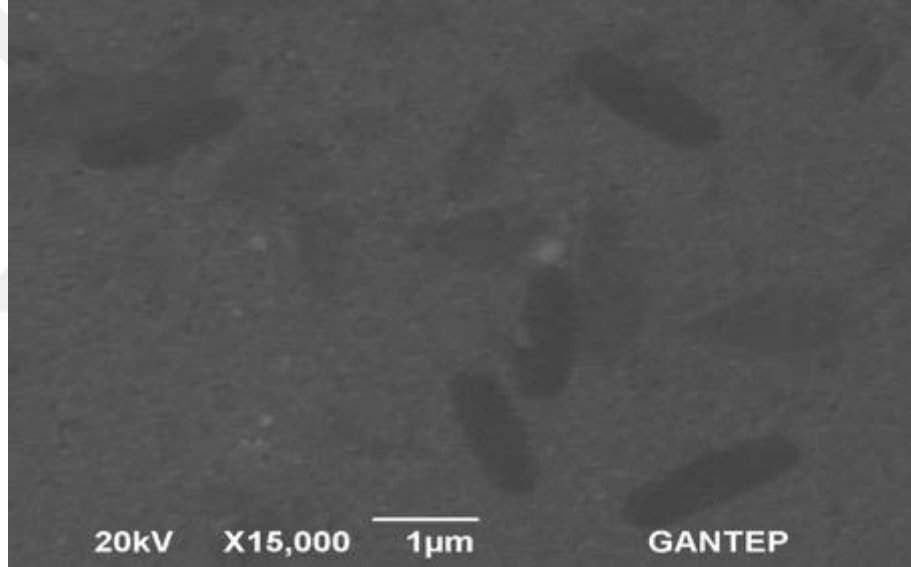


Şekil 4.28 Antikor ile modifiye edilen AgNPs ince filmin farklı tarama alanlarındaki AFM görüntüleri A) 10X10  $\mu\text{m}$  B) 5X5  $\mu\text{m}$  C) 2X2  $\mu\text{m}$ .

Sadece nanoparçacıklardan oluşan filmlerde nanoparçacıklar net bir şekilde görülmektedir. Ancak modifiye edildiğinde nanoparçacıklar net bir şekilde görünmemektedir. Ayrıca yüzeyler üzerinde nanoboyutta tepecikler görülmektedir. Buda bize protein yapısında olan nanoboyuttaki antikorların varlığını göstermektedir. Elde edilen AFM görüntüleri YZRS aktif yüzeylerin antikorlar ile başarılı bir şekilde modifiye edildiğini göstermektedir.

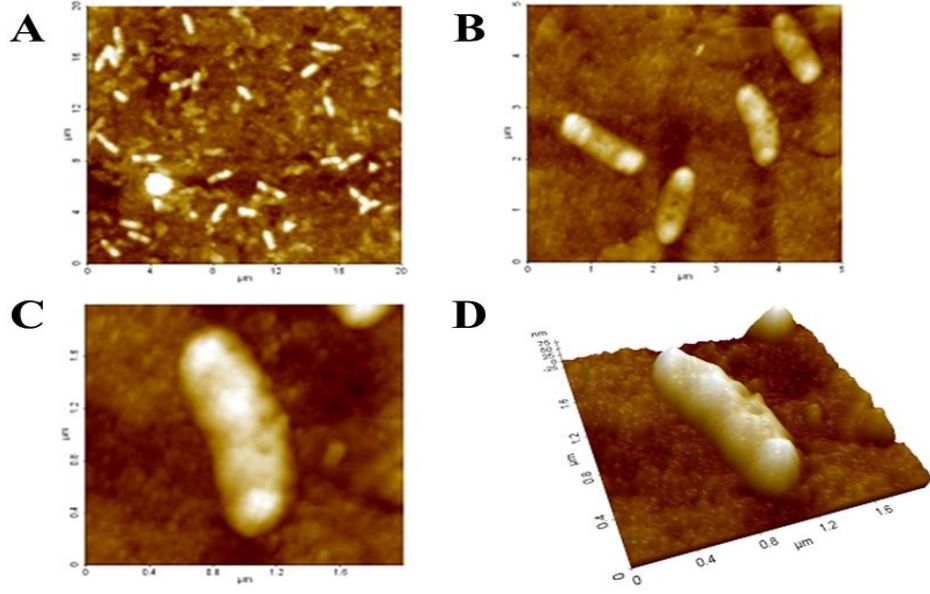
#### **4.7 YZRS Aktif Yüzeyle Bağlanan *L. pneumophila* Bakterilerin Karakterizasyonu**

Yüzeyle bakterilerin bağlanıp bağlanmadığını karakterize etmek için SEM ve AFM kullanıldı. Bakterilerin YZRS aktif yüzeye bağlandıktan sonra Jeol marka 6390LV serisi SEM ile 20 kV alınan SEM görüntüsü Şekil 4.29'de verilmektedir.



**Şekil 4.29** Anti- *L. pneumophila* Ab69239 antikorlara bağlanan *L. pneumophila* bakterilerinin SEM görüntüsü.

Şekilde görüldüğü gibi *L. pneumophila* bakterileri antikorlar yardımı ile YZRS aktif yüzeye başarı ile bağlanması sağlandı. Ayrıca Park-Systems marka XE-100 serisi AFM ile non-contact modunda PPP-NCHR cantilever kullanılarak *L. pneumophila* bakterilerinin AFM görüntüleri alındı (Şekil 4.30).



**Şekil 4.30** Anti- *L. pneumophila* Ab69239 antikorı ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeye bağlanan *L. pneumophila* SR 2.14 bakterilerinin AFM görüntüleri A) 20x20 μm B) 5x5 μm C) 2x2 μm D) 2x2 μm (3D)

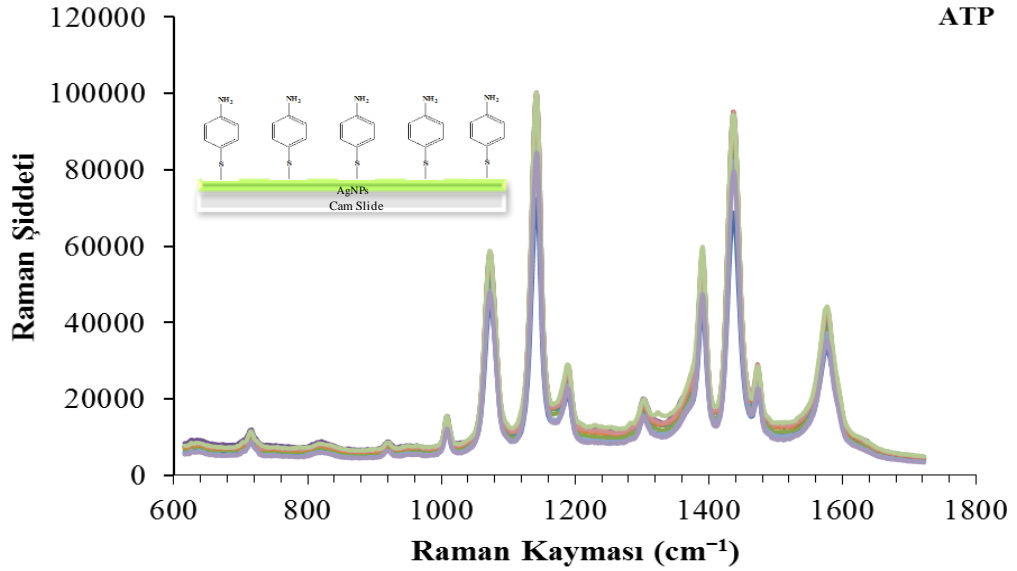
Şekil 4.30’da görüldüğü üzere alınan AFM görüntülerinde *L. pneumophila* bakterilerinin şekillerinin kısa kalın çubuklar halinde olduğu ve genellikle tek tek dağılık şekildedir. Alınan görüntülerden bakterilerin yüzeye antikor yardımı ile bağlandığı anlaşılmaktadır.

Kullanılan *L. pneumophila* bakterileri için öncelikle aşağıdaki çizelgedeki (Tablo 4.3) verildiği gibi deney setleri hazırlandı.

**Tablo 4.3** Çalışmalarda kullanılan deney setleri

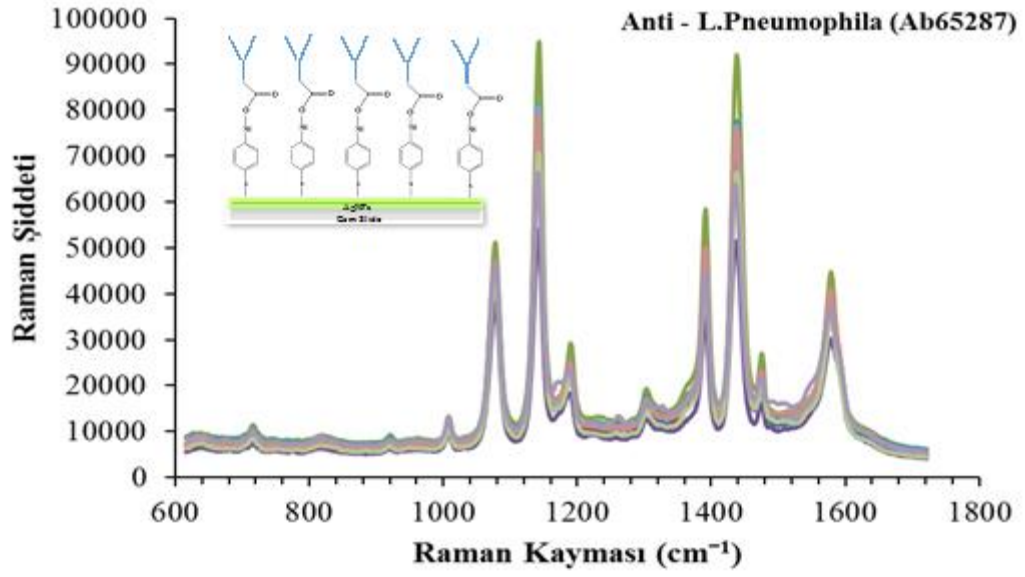
Hazırlanan Yüzeyler			
<b>ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzey</b>	Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab65287) antikorı ile modifiye edilen YZRS aktif yüzey	Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab69239) antikorı ile modifiye edilen YZRS aktif yüzey	<i>L. pneumophila</i> bakterilerinin bağlandığı YZRS aktif yüzeyler
<b>1 adet</b>	1 adet	1 adet	8 adet

Tablo 4.3'deki 8 adet olan bakteri bağlanan YZRS aktif yüzeylerden sadece 1 tanesi Anti-*L. pneumophila* (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen ve ticari olarak satın alınan *L. pneumophila* (ATCC 33152) yakalanan YZRS aktif yüzeydir. Diğer 7 yüzey ise Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) monoklonal antikoru ile modifiye edilen ve 1 adet standart *L. pneumophila* SR 2-14 ve 6 adet izolatları spesifik olarak yakalanan YZRS aktif yüzeylerdir. Hazırlanan her bir yüzeyden YZRS spektrumları alındı. YZRS spektrumları Renishaw in Via marka Raman spektrometre ile 1500 static modunda 0,005 % lazer gücünde 50X lens kullanılarak 10 adet spektrumlar alındı. Şekil 4.31-4.35'te sırasıyla ATP, Anti-*L. pneumophila* (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen ve *L. pneumophila* (ATCC 33152) bakterisi bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeylerin on farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları verilmektedir.

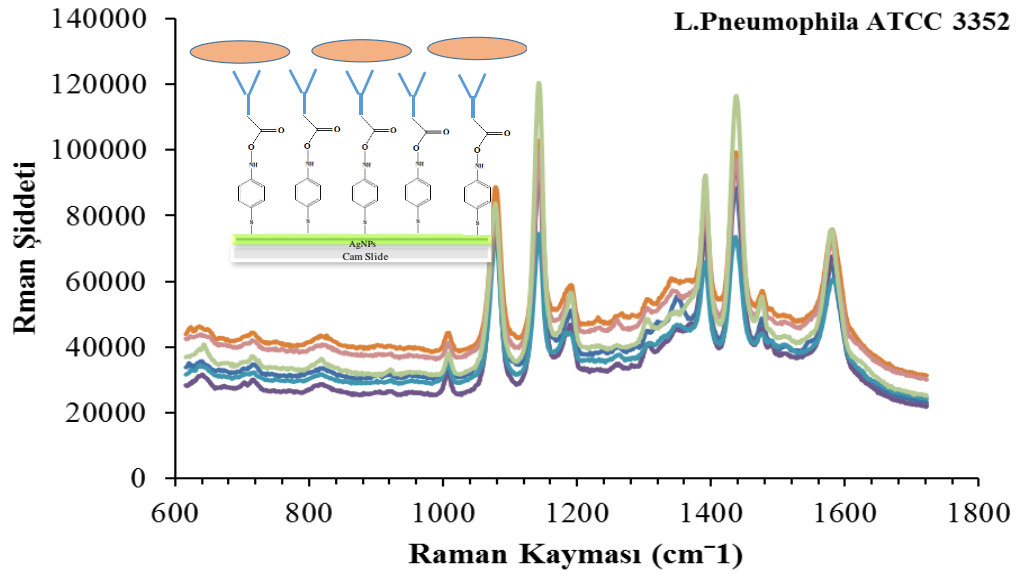


Şekil 4.31 ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YZRS spektrumları.



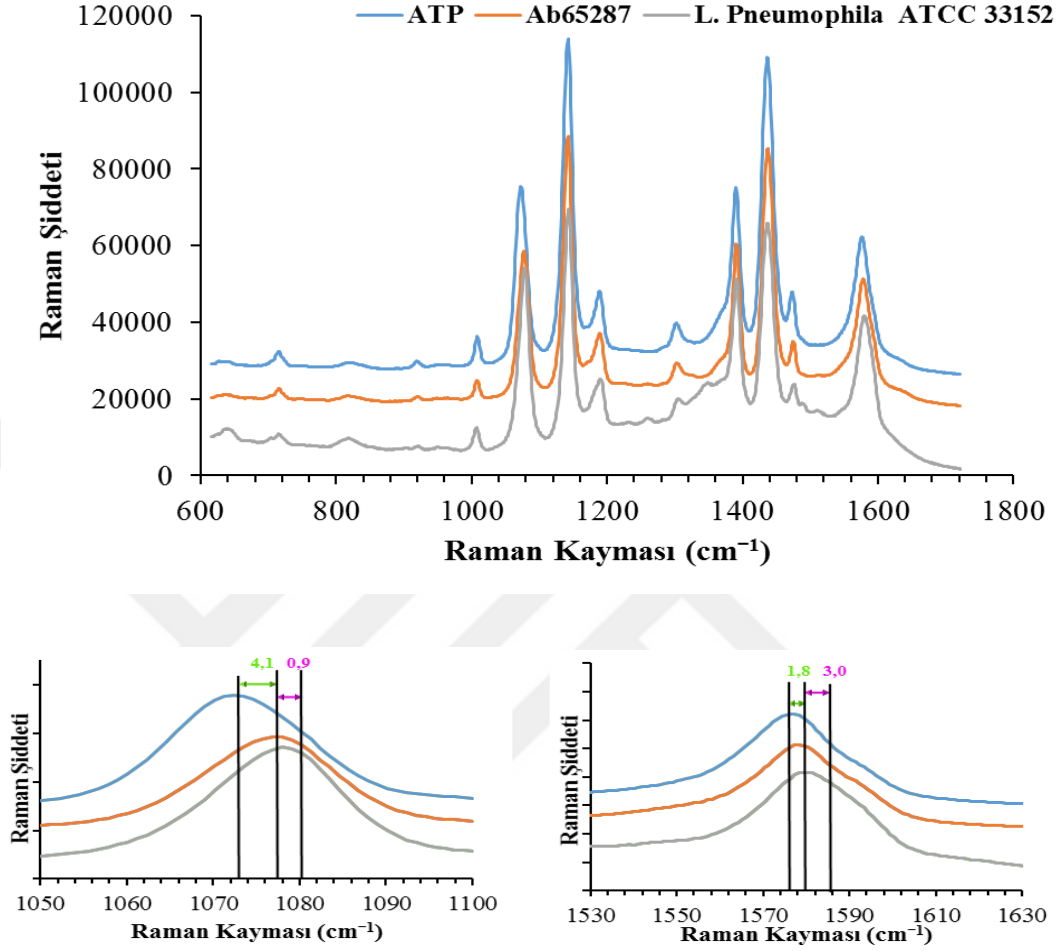


Şekil 4.32 Anti-*L. pneumophila* (Ab65287) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları.



Şekil 4.33 Anti- *L. pneumophila* (Ab65287) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* (ATCC 3352) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları.

Yukarıda verilen YZRS spektrumlarına bakıldığında on farklı bölgeden alınan YZRS spektrumları oldukça tekrarlanabilir olduğu görülmektedir. Alınan 10 YZRS spektrumlarının ortalaması alınarak spektrumların karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4.34).

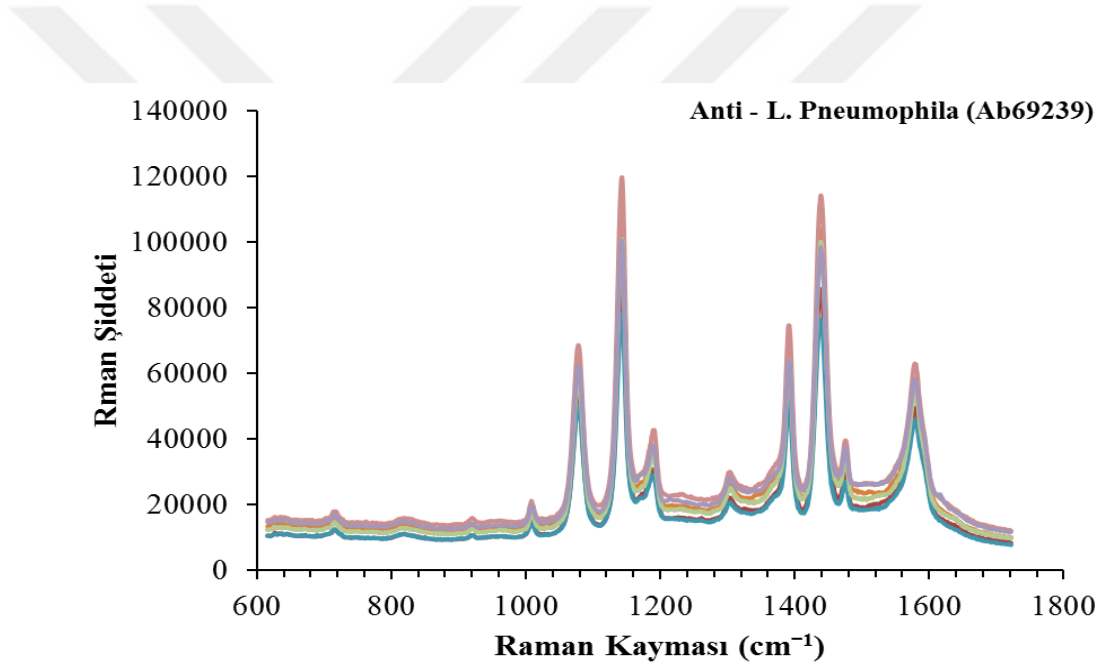


**Şekil 4.34** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab65287) antikoruna ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* (ATCC3352) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

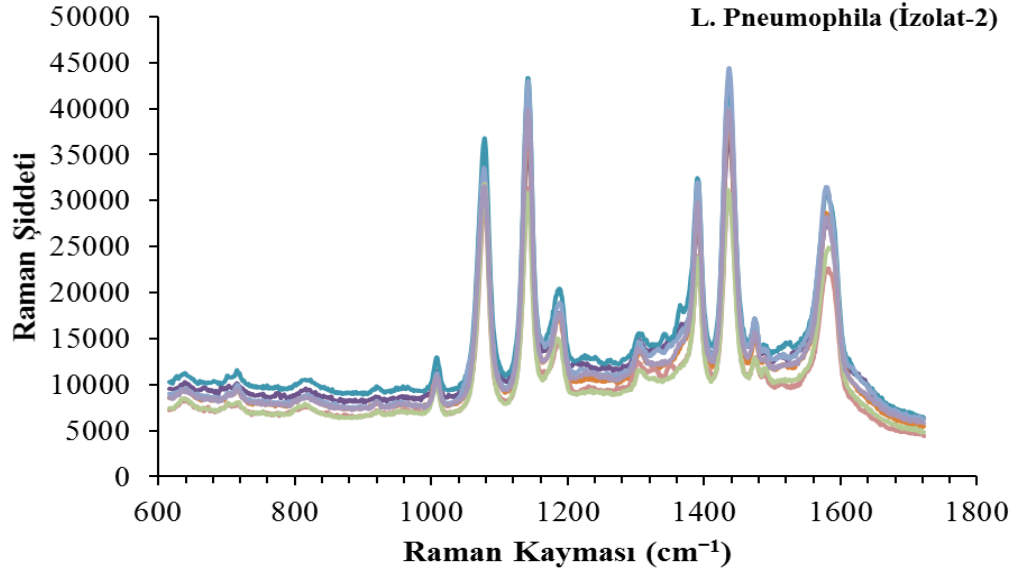
Baskıya bağlı olarak ATP moleküllerinden elde edilen spektrumlardaki kaymaları her bir basamakta belirlemek için yaklaşık  $1070 \text{ cm}^{-1}$  (C-S bağından kaynaklanan) ve  $1580 \text{ cm}^{-1}$  (benzen halkasındaki C-C bağlarından kaynaklanan) pikler kullanıldı. ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için  $1072,6$  ve  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde antikor bağlandığında  $1072,6 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1076,7 \text{ cm}^{-1}$  değerine (kayma  $4,1 \text{ cm}^{-1}$ ) kayarken,

1576,8  $\text{cm}^{-1}$  pik 1578,6  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 1,8  $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır. Çünkü antikor protein yapısında olduğu için ATP molekülü üzerine bir baskı oluşturarak stress oluşturmaktadır ve buna bağlı olarak Raman kayma değerlerinde kayma olmaktadır. Bunun yanı sıra antikora bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* (ATCC 3352) bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de 1076,7  $\text{cm}^{-1}$  1077,6  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 0,9  $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kayarken 1578,6  $\text{cm}^{-1}$  ise 1581,6  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 3,0  $\text{cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır.

Şekil 4.35 ve 4.38'te Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) antikoruna ile modifiye edilen ve *L. pneumophila* SR 1 (İzolot 2) bakterisi bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeylerin on farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları verilmektedir.

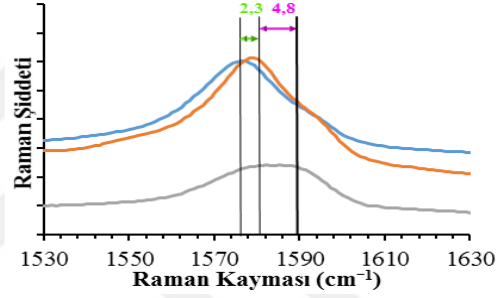
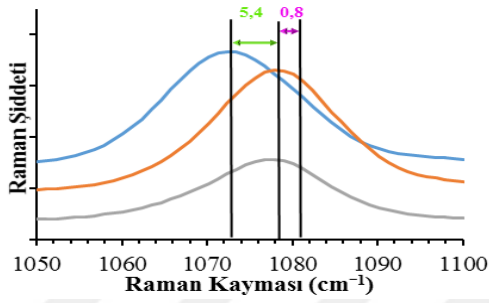
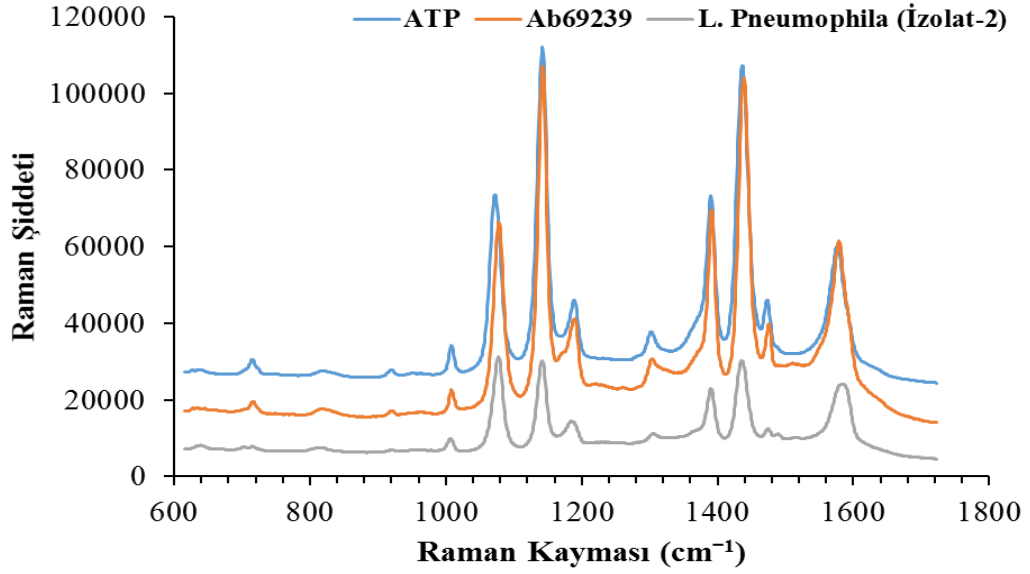


Şekil 4.35 Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları.



**Şekil 4.36** Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* SR1 (İzolot 2) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YRZS spektrumları.

Yukarı verilen YZRS spektrumlarına bakıldığında on farklı bölgeden alınan YZRS spektrumları oldukça tekrarlanabilir olduğu görülmektedir. Alınan 10 YZRS spektrumun ortalaması alınarak spektrumların karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4.37).

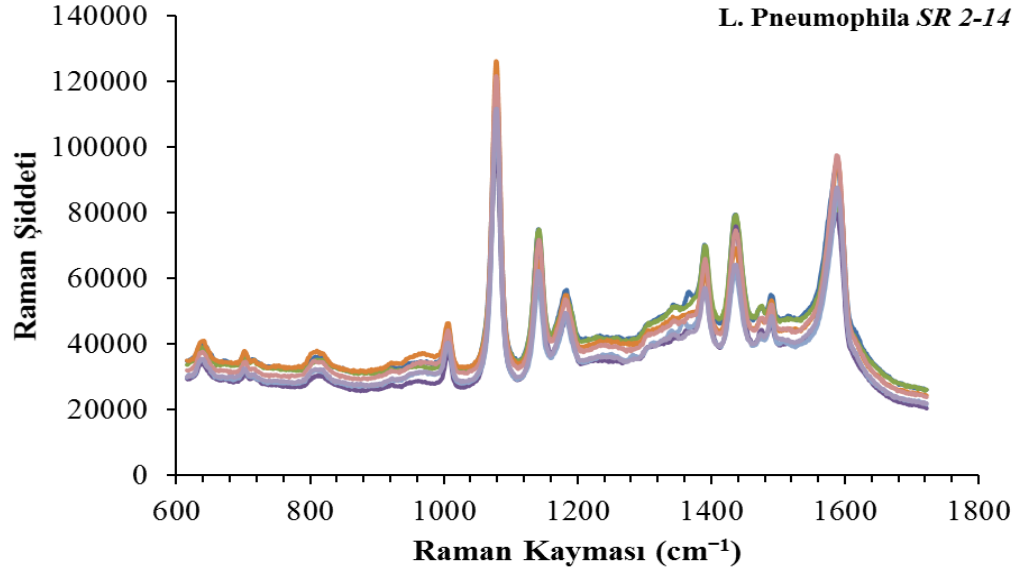


**Şekil 4.37** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikoru ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR1 (İzolot 2) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için 1072,6 ve 1576,8  $\text{cm}^{-1}$  Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde antikoru bağlandığında 1072,6  $\text{cm}^{-1}$  pik 1078,0  $\text{cm}^{-1}$  değerine (kayma 5,4  $\text{cm}^{-1}$ ) kayarken, 1576,8  $\text{cm}^{-1}$  pik 1579,1  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 2,3  $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır.

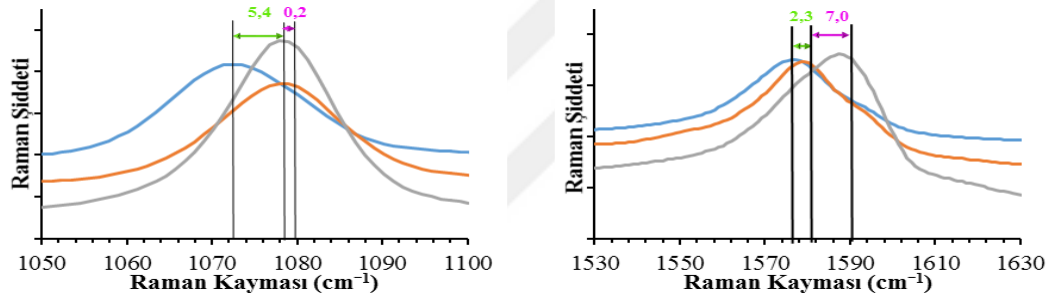
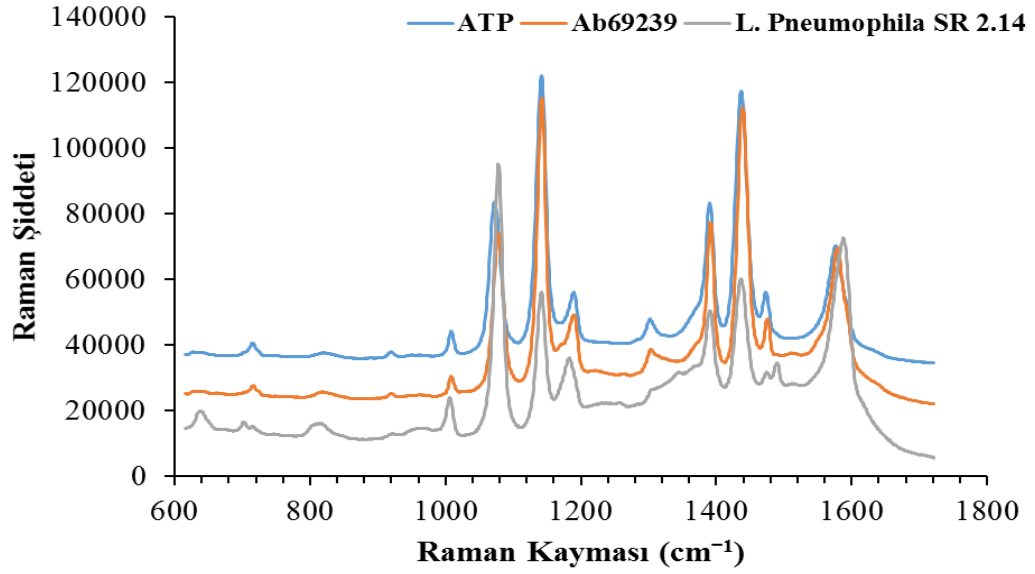
Bunun yanı sıra antikora bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* SR 1 (İzolot 2) bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de 1078,0  $\text{cm}^{-1}$  1078,8  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 0,8  $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kayarken 1579,1  $\text{cm}^{-1}$  ise 1583,9  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 4,8  $\text{cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır. Şekil 4.38'da Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 bakterisi bağlandıktan

sonra YZRS aktif yüzeylerin on farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları verilmektedir.



**Şekil 4.38** Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YZRS spektrumları.

Yukarı verilen YZRS spektrumlarına bakıldığında on farklı bölgeden alınan YZRS spektrumları oldukça tekrarlanabilir. Alınan 10 YZRS spektrumun ortalaması alınarak spektrumların karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4.39).

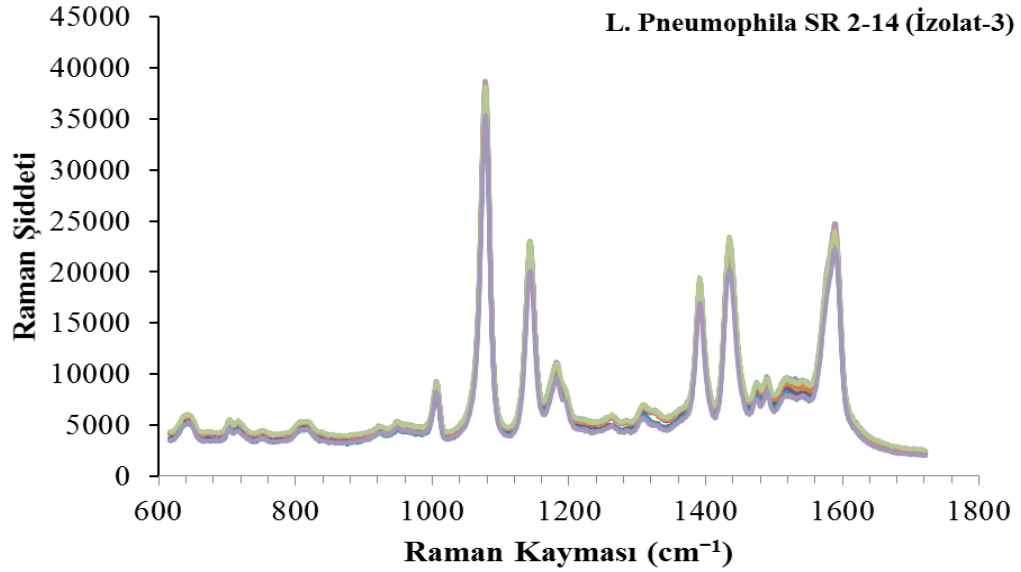


**Şekil 4.39** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoruna ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için  $1072,6$  ve  $1576,8$   $\text{cm}^{-1}$  Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde antikor bağlandığında  $1072,6$   $\text{cm}^{-1}$  pik  $1078,0$   $\text{cm}^{-1}$  değerine (kayma  $5,4$   $\text{cm}^{-1}$ ) kayarken,  $1576,8$   $\text{cm}^{-1}$  pik  $1579,1$   $\text{cm}^{-1}$  (kayma  $2,3$   $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır. Bunun yanı sıra antikora bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* SR 2-14 bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de  $1078,0$   $\text{cm}^{-1}$

1078,2  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 0,2  $\text{cm}^{-1}$ ) değerine kayarken 1579,1  $\text{cm}^{-1}$  ise 1586,1  $\text{cm}^{-1}$  (kayma 7,0  $\text{cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır.

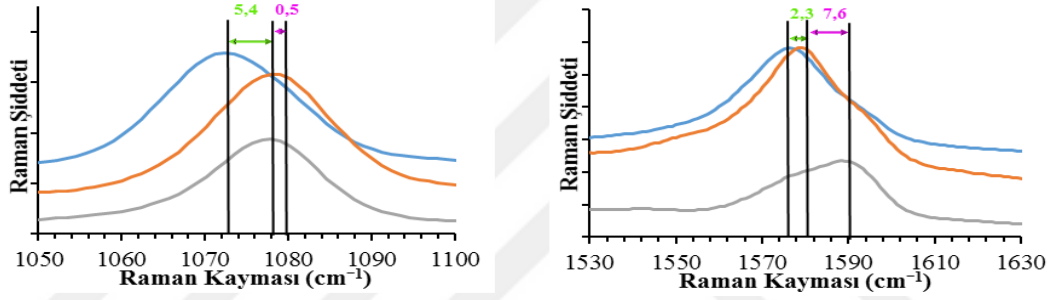
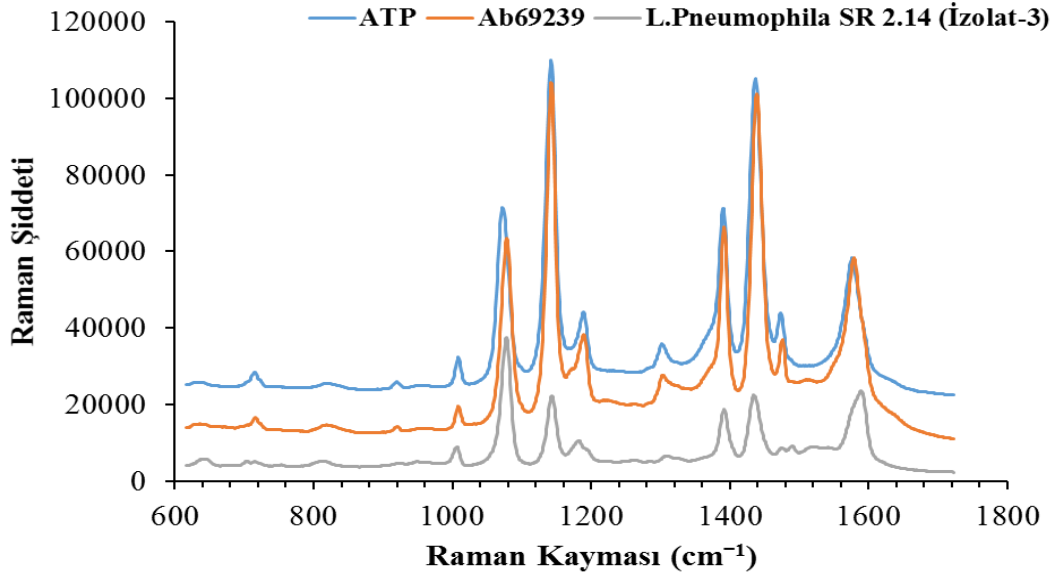
Şekil 4.40'da Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) antikoruna ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 3) bakterisi bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeylerin on farklı bölgesinden alınan YZRS spektrumları verilmektedir.



**Şekil 4.40** Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikorla modifiye edilen YZRS aktif yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 3) bakterileri bağlandıktan sonra YZRS aktif yüzeyden alınan YZRS spektrumları.

Yukarı verilen YZRS spektrumlarına bakıldığında on farklı bölgeden alınan YZRS spektrumları oldukça tekrarlanabilir. Alınan 10 YZRS spektrumun ortalaması alınarak spektrumların karşılaştırılması yapıldı (Şekil 4.41).





**Şekil 4.41** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoruna ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolot 3) bakterilerinin bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için  $1072,6$  ve  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde antikor bağlandığında  $1072,6 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1078,0 \text{ cm}^{-1}$  değerine (kayma  $5,4 \text{ cm}^{-1}$ ) kayarken,  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1579,1 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $2,3 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır. Bunun yanı sıra antikora bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolot 3) bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de  $1078,0 \text{ cm}^{-1}$   $1078,5 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $0,5 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kayarken  $1579,1 \text{ cm}^{-1}$  ise  $1586,7 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $7,6 \text{ cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır.

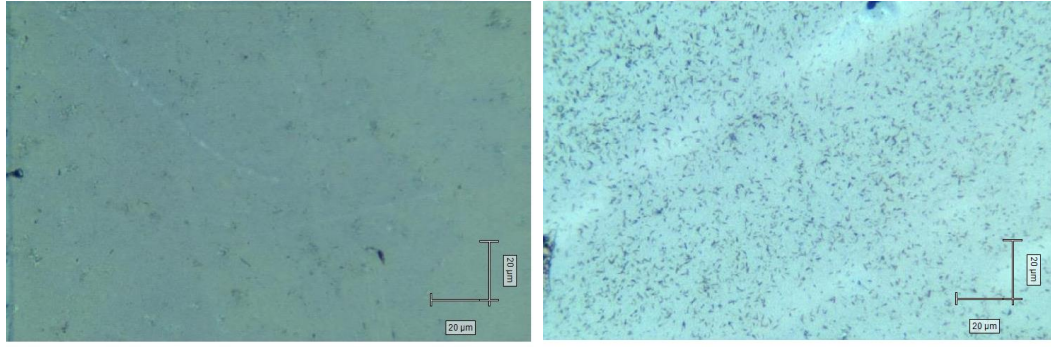
Yukarıdaki şekillerde 2 adet standart (*L. pneumophila* SR 1 (ATCC33152) ve *L. pneumophila* SR 2.14) ve 2 adet izolatlar (*L. pneumophila* SR 1 (İzolat 2) ve SR 2.14 (İzolat 3)) örnek olarak verildi. Ancak tez kapsamında kullanılan tüm *L. Pneumophila* bakterilerin kullanılarak yapılan deneyler sonucunda elde edilen YZRS spektrumlarının pik değerlerinin karşılaştırılması Tablo 4.4’de verilmektedir.

**Tablo 4.4** Baskıya bağlı olarak ATP moleküllerinden elde edilen spektrumların ortalama pik değerleri karşılaştırılması

ATP	1072,6	1576,8
<b>Anti-<i>L. pneumophila</i> (Ab65287)</b>	1076,7	1578,6
<b><i>L. pneumophila</i> ATCC 33152</b>	1077,6	1581,6
<b>Anti- <i>L. pneumophila</i> (Ab69239)</b>	1078,0	1579,1
<b><i>L. pneumophila</i> (İzolat-1)</b>	1078,9	1580,9
<b><i>L. pneumophila</i> (İzolat-2)</b>	1078,8	1583,9
<b><i>L. pneumophila</i> (İzolat-3)</b>	1078,9	1582,8
<b><i>L. pneumophila</i> SR 2.14</b>	1078,2	1586,1
<b><i>L. pneumophila</i> SR 2.14 (İzolat-1)</b>	1078,4	1589,7
<b><i>L. pneumophila</i> SR 2.14 (İzolat-2)</b>	1078,7	1588,2
<b><i>L. pneumophila</i> SR 2.14 (İzolat-3)</b>	1078,5	1586,7

Yukarıdaki çalışmalarda sadece saf bakteriler ve izolatları kullanılarak deneyler yapıldı. Ancak gerçek örneklerde bakteriler saf halde bulunmayacağından non-spesifik bağlanmanın nasıl olacağını ve bağlanma gerçekleştiğinde nasıl bir kayma etkisi

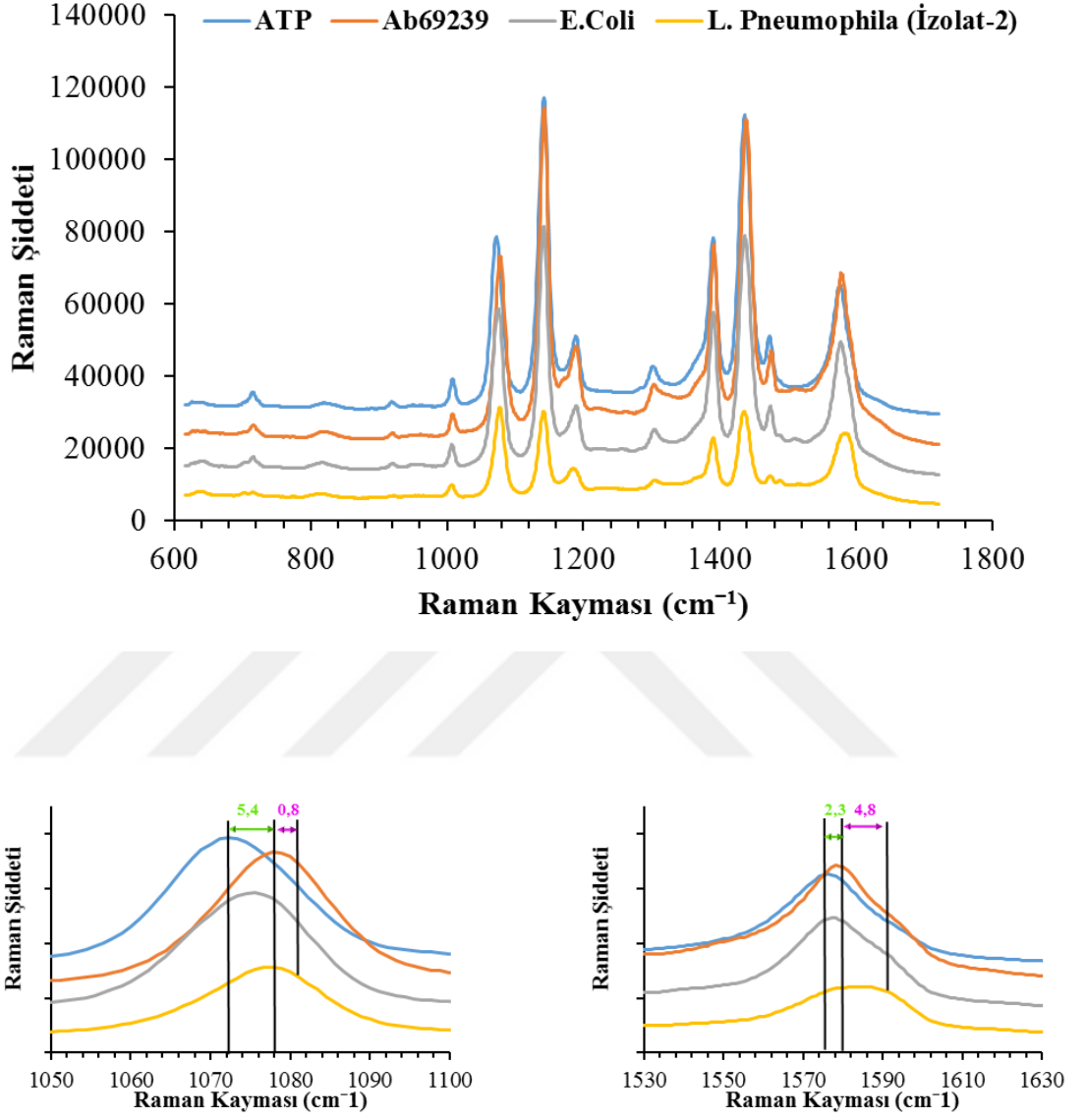
yapacağını belirlemek için iki farklı antikor bağlı yüzeye spesifik olmayan *E.coli* ve *Pseudomonas aeruginosa* bakterileri kullanıldı. Çünkü bunlar *L. pneumophila* gibi çubuk şeklindedirler. Mikroskop altında yapısal olarak farklı olmadıklarından bu bakteriler tercih edildi. *E. coli* için Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) ve *P. aeruginosa* için ise Anti- *L. pneumophila* (Ab65287) antikorlarla modifiye edilen yüzeyler kullanıldı. Ayrıca bu yüzeylere spesifik olan *L. pneumophila* (İzolat 2) ve *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterilerin bağlanması sağlandı. Şekil 4.42’de ışık mikroskopu ile 50X objektifle alınan görüntüler verilmektedir. Sol tarafta spesifik olmayan *E. coli* bakteri ile Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoru ile modifiye edilen yüzeyin ışık mikroskop görüntüsü, sağ tarafta ise spesifik olarak Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikoruna bağlanabilen. *L. pneumophila* (İzolat 2) bakterilerinin yüzeye bağlanmasının ışık mikroskop görüntüsü görülmektedir.



**Şekil 4.42** YZRS aktif yüzeylerin ışık mikroskop görüntüleri, Sol: Spesifik olmayan bakterilerin (*E.coli*) yüzeye bağlanması, Sağ: Spesifik olan bakterilerin (*L. pneumophila* (İzolat 2) yüzeye bağlanması.

Şekil 4.42’de görüldüğü gibi antikorlara spesifik bakterilerin antikor yardımı ile yüzeye çok yoğun bir şekilde tutunduğu görülmektedir (Sağ). Ancak antikorlara spesifik olmayan *E. coli* bakterilerinin neredeyse hiç yüzeye tutunmadığı görülmektedir. Sadece çok büyük bir alanda spesifik olmayan birkaç çubuksu bakteri görülmektedir. Bu tutunmanın AgNPs den hazırlanan yüzeye fiziksel olarak tutunduğu düşünülmektedir. Bu spesifik olmayan bakterilerin ATP molekülü üzerindeki baskısını ve buna bağlı olarak elde edilen Raman kaymasının olup olmadığını belirlemek için yüzeye bağlanan *E. coli* bakterilerin üstünden ve aynı zamanda spesifik

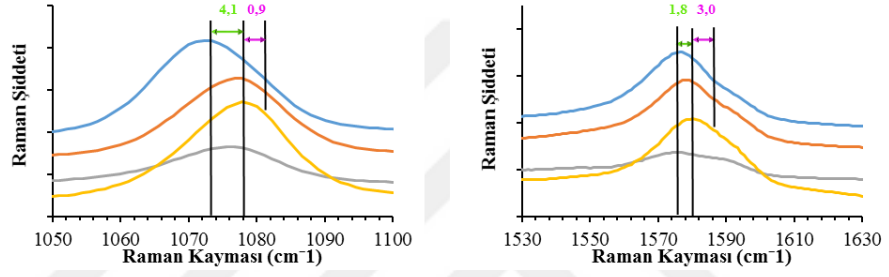
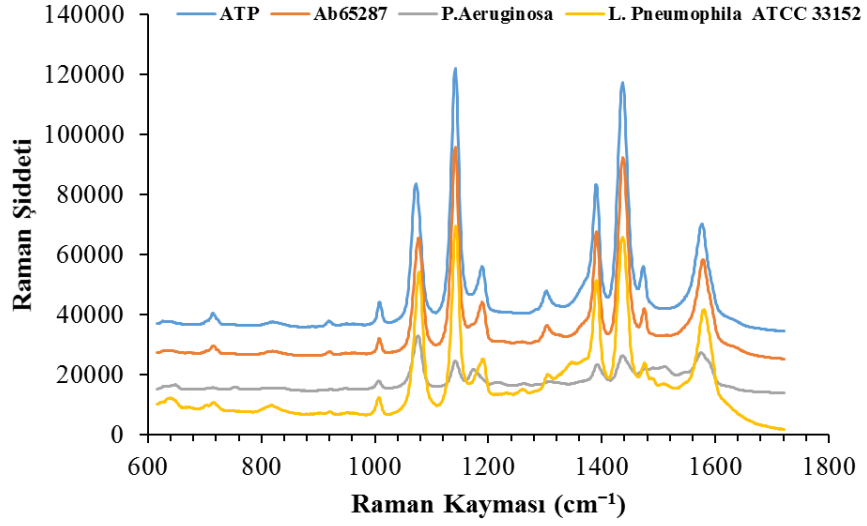
olarak bağlanan (*L. pneumophila* (İzolat 2) bakteriler üzerinden YZRS spektrumları alınarak karşılaştırma yapıldı. (Şekil 4.43)



**Şekil 4.43** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab69239) antikorü ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* SR 2-14 (İzolat 2) bakterilerinin ve *E. coli* bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için 1072,6 ve 1576,8 cm<sup>-1</sup> Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde

antikor bağlandığında  $1072,6 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1078,0 \text{ cm}^{-1}$  değerine (kayma  $5,4 \text{ cm}^{-1}$ ) kayarken,  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1579,1 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $2,3 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır. Bunun yanı sıra antikora bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* SR 1 (İzolat 2) bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de  $1078,0 \text{ cm}^{-1}$   $1078,8 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $0,8 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kayarken  $1579,1 \text{ cm}^{-1}$  ise  $1583,9 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $4,8 \text{ cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır. Ancak spesifik olmayan *E. coli* bakterilerinin üzerinden alınan spektrumun tepe noktalarına baktığımız zaman antikor bağlı yüzey ile benzer spektrumalar vermektedir. Spesifik olarak bağlanan bakteriler gibi bariz bir kayma görülmemektedir (Şekil 4.43). Tepe noktalarına baktığımızda  $1077,9$  ve  $1579,2 \text{ cm}^{-1}$  olarak elde edildi. Yani spesifik olmayan *E. coli* antikorlar ile antijen antikor ilişkisi ile yüzeye bağlanmadığından antikor üzerinde herhangi bir stres oluşturmadığından dolayı ekstra bir kayma elde edilememektedir. Bu kaymanın sadece spesifik olarak bağlanan bakterilerden kaynaklandığını göstermektedir. Ayrıca Anti-*L.pneumophila* (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen yüzeylere hem spesifik olan *L. pneumophila* ATCC 33152 hem de spesifik olmayan *P. aeruginosa* bakterilerle muamele edilerek elde edilen yüzeylerden YZRS spektrumları alındı. Şekil 4.44'de elde edilen YZRS spektrumları görülmektedir.



**Şekil 4.44** ATP, Anti- *L. pneumophila* (Ab65287) antikoruna ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden ve antikor ile modifiye edilen yüzeye *L. pneumophila* ATCC 33152 bakterilerinin ve *P. aeruginosa* bağlandıktan sonra elde edilen YZRS spektrumlarının karşılaştırılması.

## BÖLÜM 5

### SONUÇ

Bu çalışmada YZRS spektrumunu almak yerine, seçilen bir moleküldeki spektrumun baskıya bağlı olarak seçilen bazı piklerdeki kaymalarını kullanarak *L. pneumophila* tanısı amaçlandı. YZRS yönteminde ilk aşama olarak uygun metal nanoparçık ile ince film hazırlamak. Yaptığımız çalışmalarda AgNPs ve AuNPs'ler metal tuzlarından kimyasal indirgeme yöntemi ile hazırlandı. Hazırlanan nanoparçacıklar UV-vis, Zetasizer, AFM, SEM, TEM ve Raman analizleri yapıldı. Yapılan karakterizasyon işlemleri sonucu nanoparçacıklar istenilen boyuta yaklaşık ve yuvarlak şekillerde olduğu belirlendi. Sentezlenen NPs'ler farklı derişimlerde santifüjlenerek stoklandı. Farklı derişimlerde AgNPs elde etmek için yapılan santrifüj işlemi sonrası kalan süspansiyon kısmına göre 25X, 50X ve 100X AgNPs süspansiyonları hazırlandı. AuNPs aynı şartlarda fakat daha fazla santrifüj işlemine tabi tutuldu ve derişimleri artırıldı. Bunun nedeni AuNPs büyüklükleri küçük olduğundan yüzey oluşturmak için daha fazla nanoparçacığa ihtiyaç vardır. Bunun için 100X, 250X ve 500X AuNPs süspansiyonları hazırlandı. Derişimi artırılan AgNPs ve AuNPs süspansiyonları iletim derleme (convective-assembly) yöntemi ile cam lam üzerine hızı 1 ve 2  $\mu\text{m/s}$  ile 27  $^{\circ}\text{C}$ 'de yürütüldü. Elde edilen yüzeyler AFM, SEM ve Raman spektrometre ile yüzey görüntüleri alındı. Yapılan karakterizasyon işleminde 1  $\mu\text{m/s}$  ile yürütme yapılarak hazırlanan ve derişimi 100x olan AgNPs'lerden edilen ince filmlerin daha homojen olarak istiflendiği görüldü. AuNPs'lerde ise 500x derişiminde elde edilen ince filmlerin daha homojen olduğu belirlendi. Raman spektrometresinde beyaz ışık mikroskop görüntüleri yüzeylerin homojenliği kontrol edildi. Aynı zamanda AFM ile hazırlanan yüzeylerin kalınlıkları 3D ile görüntüler ile gözlemlendi.

Yaptığımız çalışmalar sonucu hazırlanan AgNPs yüzeyler aktif moleküller (ATP) ile inkübe edildikten sonra YZRS spektrumları alındı. YZRS spektrumları Renishaw inVia Raman mikroskopu ile alındı. Deneysel koşullar AgNPs yüzeyler için % 0,005

lazer gücünde ve 1500 static modunda alındı. Lazerin örnek üzerinde kalma süresi 1 s'dir. 3 farklı derişimlerdeki AgNPs ile oluşturulan yüzeylerin farklı konumlarından alınan 10 farklı YZRS spektrumlarının tekrarlanabilirlikleri test edildi. ATP elde edilen YZRS pikleri C-C bağlarından kaynaklanan  $1590\text{ cm}^{-1}$ , C-S bağlarından kaynaklanan  $1078\text{ cm}^{-1}$  şiddetli olarak gözlemlendi. AuNPs ve AgNPs kullanılarak elde edilen yüzeyler YZRS aktiviteleri karşılaştırılması da yapıldı. Aynı koşullarda AuNPs kullanılarak elde edilen yüzeyden spektrum alınamazken AgNPs elde edilen yüzeylerden şiddetli YZRS spektrumları alındı. Bundan sonraki çalışmalarda AuNPs hazırlanan yüzeyler kullanılmadı. Bunun nedeni YZRS aktivitesinin düşük olması, tekrarlanabildiğın kötü olması ve pahalı olmasıdır. Bundan sonraki tüm çalışmalarda 100X AgNPs ile hazırlanan ince filmler kullanıldı.

AgNPs yüzeylerine bağlanan model bakterilerin spesifik antikorların karakterizasyonu için AFM görüntüleri alınarak antikorların varlığı görüntüldü. Antikor bağlı yüzeyler ile ATP moleküllerin bağlı olduğu yüzeyler karşılaştırılarak farklılık olduğu belirlendi. Buda bize antikoların yüzeylere bağlandığını göstermektedir.

Yüzeylere *L. pneumophila*'nın bağlanıp bağlanmadığını karakterize etmek için SEM ve AFM kullanıldı. Alınan görüntülerden bakterilerin yüzeye antikor yardımı ile bağlandığı görüntüldü. Bu tez için 8 adet bakteri bağlanan YZRS aktif yüzeylerden sadece 1 tanesi Anti-*L. pneumophila* (Ab65287) antikoru ile modifiye edilen ve ticari olarak satın alınan *L. pneumophila* (ATCC 33152) yakalanan YZRS aktif yüzeydir. Diğer 7 yüzey ise Anti-*L. pneumophila* (Ab69239) monoklonal antikoru ile modifiye edilen ve 1 adet standart *L. pneumophila* SR 2-14 ve 6 adet izolatları spesifik olarak yakalanan YZRS aktif yüzeylerdir. Hazırlanan her bir yüzeyden Renishaw in Via marka Raman spektrometre ile 1500 static modunda 0,005 % lazer gücünde 50X lens kullanılarak 10 adet spektrumlar alındı.

Tüm spektrumlar detaylı bir şekilde incelendiğinde ilk antikor bağlandığında C-S bağından kaynaklanan  $1072,6\text{ cm}^{-1}$  deki pik iki antikorun bağlanması ile de  $4-5\text{ cm}^{-1}$  kayma elde edilmektedir. Ancak benzen halkasındaki C-C bağından kaynaklanan  $1576,8\text{ cm}^{-1}$  dalga sayısındaki piklerde antikor bağlanması ile çok az kayma elde edilmektedir (yaklaşık  $2\text{ cm}^{-1}$ ). Bunun nedeni ilk antikor bağlandığında baskı olarak



ilk YRZS aktif yüzeye bağlı olan C-S bağına yapmasından olabilir. Çünkü antikor ağırlığı tek bağ olan ve daha kolay deforme olan C-S bağına yapmaktadır. Benzen halkası daha rigid bir yapı olduğundan antikor bağlandığında C-C bağı üzerindeki baskı C-S bağındaki kadar fazla değildir. Bu nedenle C-C bağındaki kayma C-S kaymaya göre daha azdır. Ancak mikron boyutundaki bakteriler antikor yardımı ile yüzeye bağlandığında bakterilerin altındaki ATP moleküllerinden alınan YZRS pikleri, antikor ile modifiye olan yüzeylerden alınan YZRS spektrumları ile karşılaştırıldığından bu defa da C-S bağından elde edilen pikte az bir kayma (yaklaşık  $1 \text{ cm}^{-1}$ ) elde edilirken, C-C bağından kaynaklanan pikte daha fazla kayma görülmektedir. Bunun nedeni, bakterinin boyutunun çok daha büyük olması ve buna bağlı olarak protein yapısındaki antikora göre daha fazla baskı yaptığından rigid olan C-C bağındaki polarizlenebilirliği de değiştirmesidir. Ancak C-S bağında bakteri bağlanması ile antikor bağlanması arasında çok büyük kaymalar görülmemektedir. Bu ise bir bağı antikor bağlanması ile yeterince kaymasına bağlı olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle antikor bağlanması ile çok fazla bir kayma elde edildiğinden bakteri bağlanması polarlanabilirliği çok değiştirmedığı için az kayma elde edilmektedir. Tüm sonuçlar dikkate alındığında bakterinin tanısı için kayma izlenirken  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  deki pikin kullanılması daha doğru sonuçlar vereceği düşünülmektedir.

Aynı zamanda örneklerde bakteriler saf halde bulunmayacağından non-spesifik bağlanmanın nasıl olacağını ve bağlanma gerçekleştiğinde nasıl bir kayma etkisi yapacağını belirlemek için iki farklı antikor bağlı yüzeye spesifik olmayan *E. coli* ve *P. aeruginosa* bakterileri kullanıldı. Bu bakterilerin kullanılmasında ki neden *L. pneumophila* gibi çubuk şeklinedirler. Mikroskop altında yapısal olarak farklı olmadıklarından bu bakteriler tercih edildi. ATP ile modifiye edilen YZRS aktif yüzeyden alınan spektrumda bu iki pik için  $1072,6 \text{ (C-S)}$  ve  $1576,8 \text{ (C-C)}$   $\text{cm}^{-1}$  Raman kayması elde edildi. Ancak ATP molekülleri üzerinde antikor bağlandığında  $1072,6 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1076,7 \text{ cm}^{-1}$  değerine (kayma  $4,1 \text{ cm}^{-1}$ ) kayarken,  $1576,8 \text{ cm}^{-1}$  pik  $1578,6 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $1,8 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kaymaktadır. Çünkü antikor protein yapısında olduğu için ATP molekülü üzerine bir baskı oluşturarak stress oluşturmaktadır ve buna bağlı olarak Raman kayma değerlerinde kayma olmaktadır. Bunun yanı sıra antikora

bağlanan mikron boyutundaki *L. pneumophila* (ATCC 3352) bakterilerinin ağırlığına bağlı olarak ATP molekülünün pik değerleri de  $1076,7 \text{ cm}^{-1}$   $1077,6 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $0,9 \text{ cm}^{-1}$ ) değerine kayarken  $1578,6 \text{ cm}^{-1}$  ise  $1581,6 \text{ cm}^{-1}$  (kayma  $3,0 \text{ cm}^{-1}$ ) pik değerine kaymaktadır. Ancak spesifik olmayan *E.coli* bakterilerinin üzerinden alınan spektrumun tepe noktalarına baktığımız zaman antikor bağlı yüzey ile benzer spektrumalar vermektedir. Spesifik olarak bağlanan bakteriler gibi bariz bir kayma görülmemektedir. Tepe noktalarına baktığımızda  $1077,9$  ve  $1579,2 \text{ cm}^{-1}$  olarak elde edildi. Yani spesifik olmayan *E.coli* antikorlar ile antijen antikor ilişkisi ile yüzeye bağlanmadığından antikor üzerinde herhangi bir stres oluşturmadığından dolayı ekstra bir kayma elde edilememektedir. Aynı şekilde yüzeylere spesifik olmayan *P. aeruginosa* bakterileri bağlandığında ATP molekülünün pik değerleri  $1076,7 \text{ cm}^{-1}$  ve  $1578,4 \text{ cm}^{-1}$  değerlerinde elde edilmektedir. Yine bir önceki örnekte olduğu gibi spesifik olmayan bakterilerin antikor üzerine baskısının/stresin olmadığı görülmektedir. Bu iki örnekten de anlaşılacağı gibi çok az da olsa spesifik olmayan bakterilerin yüzeye bağlanması ile herhangi bir belirgin kayma elde edilememektedir. Benzer şekillerdeki bakteri karışımları olsa bile eğer bir kayma elde edilemiyor ise bu bakterinin aranan bakteri olma olasılığı düşüktür. Eğer belirgin bir kayma elde ediliyor ise bu aranan bakteri olduğu sonucuna varılabilir. Bu şekilde bu yaklaşımın spesifik bakteriler için uygun olacağı düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Al-Khaldi, S. F., Mossoba, M. M., (2004). Gene and Bacterial Identification Using High-throughput Technologies: Genomics, Proteomics, and Phenomics., *Nutrition*, **20**, 32-38.
- Aizpurua, J., Hanarp, P., Sutherland, D. S., Kall, M., Bryant, G.W. & deAbajo, F. J. Alary, M., Joly, J. R., 1991. "Risk factors for contamination of domestic hot water systems by legionellae. Applied and Environmental Microbiology", **57**, 2360–2367.
- Alivisatos, A. P. (2004). The Use of Nanocrystals in Biological Detection. *Nat. Biotechnol.*, **22**, 47-52.
- Bao, L., Mahurin, S. M., Haire, R. G., Dai, S. (2003). Silver-Doped Sol-Gel Film as a Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate for Detection of Uranyl and Neptunyl Ions. *Anal. Chem.* **75**, 6614–6620
- Bohren, C. F., Huffman, D. R. 1983. Absorption and Scattering of Light by Small Particles, *New York, MA: Wiley*
- Bouzar, H., Jones, J. B., Stall, R. E., Hodge, N. C., Minsavage, G. V., Benedict, A. A. Alvarez, A. M., (1994). Physiological, Chemical, Serological, and Pathogenic Analyses of a Worldwide Collection of *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Phytopathology*, **84**, 663-671.
- Breiman, R. F., Cozen, W., Fields, B. S., Mastro, T. D., Carr, S. J., Spika, J. S., Mascola, L., (1990). Role of air sampling in investigation of out- break of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser, *The Journal of Infectious Diseases*, **161**, 1257–61
- Cam D., Keseroglu, K., Kahraman, M., Sahin, F., Culha, M., (2010). Multiplex Identification of Bacteria in Bacterial Mixtures with Surface-enhanced Raman scattering, *J. Raman Spectroscopy*, **41**, 484-489.
- Campion, A., Kambhampati, P. (1998). Surface-enhanced Raman scattering. *Chem.*
- Cao, Y. C., Jin, R., Mirkin, C. A. (2002). Nanoparticles with Raman Spectroscopic Fingerprints for DNA and RNA Detection. *Science* **297**, 1536–1540
- Chase, B., 1987. *Anal. Chem.*, **59**, 888A.
- Chem. Phys. Lett.* **82**, 561-565.
- Claydon, M. A., Davey, S. N., Edwards-Jones, V., Gordon, D. B., (1996). The Rapid Identification of Intact Microorganisms Using Mass Spectrometry, *Nat. Biotechnol.*, **14**, 1584-1586.
- Culha, M., Stokes, D., Allain, L. R., Vo-Dinh, T. (2003). Surface-Enhanced Raman Scattering Substrate Based on a Self-Assembled Monolayer for Use in Gene Diagnostics. *Anal. Chem.* **75**, 6196–6201

- Çotuk, A., Zeybek, Z., Kimiran, A., Türetgen, \_ Kalaç Y., (1998). Farklı binaların su sistemlerinde *L. pneumophila* izolasyonu, *Kükem Derg*; **21**, 7-12.
- Doering, W. E., Nie, S. (2003). Spectroscopic Tags Using Dye-Embedded Nanoparticles and Surface-Enhanced Raman Scattering. *Anal. Chem.* **75**, 6171–6176
- Efrima, S., Bronk, B. V., (1998). Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria, *J. Phys. Chem. Ser. B.*, **102**, 5947-5950.
- Efrima, S., Bronk, B. V., Czege, J., (1999). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria Coated by Silver, *Proc. SPIE.*, **3602**, 164-171
- Elghanian, 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.
- El-Sayed, I. H., Huang, X., El-Sayed, M. A. (2005). Surface Plasmon Resonance Scattering and Absorption of Anti-EGFR Antibody Conjugated Gold Nanoparticles in Cancer Diagnostics: Applications in Oral Cancer. *Nano Lett.* **5**, 829-834.
- Ferraro, J., R. ve Nakamoto, K., 1994. Introductory Raman Spectroscopy. Academic Press, New York.
- G. (2003). Optical Properties of Gold Nanorings. *Phys. Rev. Lett.* **90**, 057401.
- Goodacre, R., Hiom, S.J., Cheeseman, S. L., Murdoch, D., Weightman, A. J., Wade, W.G., (1996). Identification and Discrimination of Oral Asaccharolytic Eubacterium spp. by Pyrolysis Mass Spectrometry and Artificial Neural Networks, *Curr. Microbiol.*, **32**, 77-84
- Grubisha, D. S., Lipert, R. J., Park, H. Y., Driskell, J., Porter, M. D. (2003). Femtomolar Detection of Prostate-Specific Antigen: An Immunoassay Based on Surface-Enhanced Raman Scattering and Immunogold Labels. *Anal. Chem.* **75**, 5936–5943
- Haag, A.M., Taylor, S. N., Johnston, K. H., Cole, R. B., (1998). Rapid Identification and Speciation of Haemophilus Bacteria by Matrixassisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **33**, 750-756.
- Haes, A. J., Haynes, C. L., McFarland, A. D., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P., Zou, (2005a). Plasmonic Materials for Surface-Enhanced Sensing and Spectroscopy. *MRS Bulletin.* **30**, 368-375.
- Haes, A. J., Van Duyne, R. P. (2002). A Nanoscale Optical Biosensor: Sensitivity and Selectivity of an Approach Based on the Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy of Triangular Silver Nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 10596-10604.
- Haynes C., Mcfarland, A. D., Van Duyne, R. P. (2005b). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Anal. Chem.* 339A-346A.
- Haynes, C. L., ve Van Duyne, R. P. (2003a). Dichroic Optical Properties of Extended Nanostructures Fabricated Using Angle-Resolved Nanosphere Lithography. *Nano Lett.* **3**, 939-943

- Henzie, J., Lee, J., Lee, M. H., Hasan, W., Odom, T. W. (2009). Nanofabrication of Plasmonic Structures. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 147-65.
- Hirsch, L. R., Stafford, R. J., Bankson, J. A., Sershen, S. R., Rivera, B., Price, R. E., Hazle, J. D., Halas, N. J., West, J. L. (2003). Nanoshell-Assisted Tumor Ablation Using near Infrared Light under Magnetic Resonance Guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13549-13554.
- Hossain, M. K., Shibamoto, K., Ishioka, K., Kitajima, M., Mitani, T., Nakashima, S., 2007. 2D Nanostructure of Gold Nanoparticles: An Approach to SERS-Active Substrate, 122-123, 792-795.
- Hsu, S. C., Martin, R., Wentworth, B. B., 1984. "Isolation of Legionella species from drinking water", *Applied and Environmental Microbiology*, **48**, 830-832.
- Huang, X., El-Sayed, I. H., Qian, W., El-Sayed, M. A. (2006). Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 2115-2120.
- Hulteen, J. C., Treichel, D. A., Smith, M. T., Duval, M. L., Jensen, T. R., Van Duyne, R. P. (1999). Nanosphere Lithography: Size-Tunable Silver Nanoparticle and Surface Cluster Arrays. *J. Phys. Chem. B.* **103**, 3854– 3863
- Hutter, E., Fendler, J. H. (2004). Exploitation of Localized Surface Plasmon Resonance. *Adv. Mater.* **16**, 1685-1706
- Jain, P. K., Lee, K. S., El-Sayed, I. H., El-Sayed, M. A. (2006). Calculated Absorption and Scattering Properties of Gold Nanoparticles of Different Size, Shape, and Composition: Applications in Biological Imaging and Biomedicine. *J. Phys. Chem. B.* **110**, 7238-7248
- Jarvis, R. M., Brooker, A., Goodacre, R. (2004). Surface-enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface. *Anal. Chem.* **76**, 5198–5202.
- Jarvis, R. M., Brooker, A., Goodacre, R., (2004b). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy for Bacterial Discrimination Utilizing a Scanning Electron Microscope with a Raman Spectroscopy Interface, *Anal. Chem.*, **76**, 5198-5202.
- Jarvis, R. M., Brooker, A., Goodacre, R., (2006). Surface-Enhanced Raman Scattering for the Rapid Discrimination of Bacteria, *Faraday Discussions*, **132**, 281-292.
- Jarvis, R. M., Goodacre R., (2004a), Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Anal. Chem.*, **76**, 40-47.
- Jarvis, R. M., Goodacre, R., (2004c). Ultra-Violet Resonance Raman Spectroscopy for the Rapid Discrimination of Urinary Tract Infection Bacteria, *FEMS Microbiol. Lett.*, **232**, 127-132
- Jensen, T. R., Van Duyne, R. P., Johnson, S. A., Maroni, V. A. (2000). Surface-Enhanced Infrared Spectroscopy: A Comparison of Metal Island Films with Discrete and Nondiscrete Surface Plasmons. *Appl. Spectrosc.* **54**. 371–77
- Kahraman, M. Yazıcı, M., Şahin, F., Çulha, M., (2008). Convective-Assembly of Bacteria for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Langmuir*, **24(3)**, 894-901.

- Kahraman, M., Keseroğlu, K., Çulha, M., (2011). On Sample Preparation for Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria and The Source of Spectral Features of The Spectra, *Applied Spectroscopy*, **65**(5), 500-506.
- Kahraman, M., Yazıcı, M., Şahin, F., Bayrak, Ö. F. and Çulha, M., (2007). Reproducible Surface-Enhanced Raman Scattering Spectra of Bacteria on Aggregated Silver Nanoparticles, *Applied Spectroscopy*, **61**(5), 479-485
- Kahraman, M., Zamaleeva, A. I., Fakhrullin, R. F., Culha, M., (2009). Layer-by-Layer Coating of Bacteria with Noble Metal Nanoparticles for Surface-Enhanced Raman Scattering, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **395**(8), 2559-2567
- Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L., Schatz, G. C. (2003). The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B.* **107**, 668–677.
- Kho, K.W., Dinish, U. S., Kumar, A. and Olivo, M. (2012). Frequency Shifts in SERS for Biosensing, *ACS Nano*, **6**, 4892–4902.
- Knauer, M., Ivleva, N. P., Liu, X., Niessner, R., Haisch, C., (2010). Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Label-Free Microarray Readout for the Detection of Microorganisms, *Anal. Chem.*, **82**, 2766–2772.
- Knauer, M., Ivleva, N. P., Liu, X., Niessner, R., Haisch, C., (2010). Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Label-Free Microarray Readout for the Detection of Microorganisms, *Anal. Chem.*, **82**, 2766–2772.
- Kneipp, K., Kneipp, H., Kneipp, J. (2006). Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold Nanoaggregates From Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells. *Acc. Chem. Res.* **39**, 443-450.
- Lee, P.C., Meisel, D., (1982). Adsorption and Surface-enhanced Raman of Dyes on Silver and gold sols, *J. Phys. Chem.*, **86**, 3391-3395.
- Lelliot, R. A., Stead, D. E. 1987. *Methods for the Diagnosis of Bacterial Diseases of Plants*, Black well Scientific Publicatio, Oxford.
- Lopez-Diez, E. C., Goodacre, R., (2004). Characterization of Microorganisms Using UV Resonance Raman Spectroscopy and Chemometrics, *Anal. Chem.*, **76**, 585-591.
- Louws, F. J., Fulbright, D. W., Stephens, C. T., de Bruijn, F. J., (1995). Determination of genomic structure by rep-PCR fingerprinting to rapidly classify *Xanthomonas campestris* pv. *Vesicatoria*, *Phytopathology*, **85**, 528-536.
- Lu L., Randjelovic, I., Capek, R., Gaponik, N., Yang, J., Zhang, H., Eychmüller, A., (2005). Controlled Fabrication of Gold-Coated 3D Ordered Colloidal Crystal Films and Their Application in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *Chem. Mater.*, **17**, 5731-5736.
- Lu, X., Rycenga, M., Skrabalak, S. E., Wiley, B., Xia, Y. (2009). Chemical Synthesis of Novel Plasmonic Nanoparticles. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **60**, 167-192.
- Lu, X., Samuelson, D. R., Xu, Y., Zhang, H., Wang, S., Rasco, B. A., Xu, J., Konkel, M. E., (2013). Detecting and Tracking Nosocomial Methicillin-Resistant

Staphylococcus aureus Using a Microfluidic SERS Biosensor, *Anal. Chem.*, **85**, 2320–2327

Ly, N., Foley, K., Tao, N. (2007). Integrated Label-Free Protein Detection and Separation in Real Time Using Confined Surface Plasmon Resonance Imaging. *Anal. Chem.* **79**, 2546-2551.

Manoharan, R., Ghiamati, E., Dalterio, R. A., Britton, K. A., Nelson, W. H., Sperry, J. F., (1990). UV Resonance Raman Spectra of Bacteria, Bacterials spores, Protoplasts, and Calcium Dipicolinate, *J. Microbiol. Methods*, **11**, 1-15.

Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Puppels, G. J., (2002a). Rapid Identification of Candida Species by Confocal Raman Microspectroscopy *J. Clin. Microbiol.*, **40**, 594-600

Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Vreeswijk, T. V., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H. A., Puppels, G. J., (2000). Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture medium, *Anal. Chem.*, **72**, 12-19.

Maquelin, K., Choo-Smith, L. P., Vreeswijk, T. V., Endtz, H. P., Smith, B., Bennett, R., Bruining, H. A., Puppels, G. J., (2000). Raman Spectroscopic Method for Identification of Clinically Relevant Microorganisms Growing on Solid Culture medium, *Anal. Chem.*, **72**, 12-19.

Maquelin, K., Dijkshoorn, L., van der Reijden, T. J.K., Puppels, G. J., (2006). Rapid Epidemiological Analysis of Acinetobacter Strains by Raman Spectroscopy, *Journal of Microbiological Methods*, **64**, 126-131.

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., Ngo-Thi, N. A., van Vreeswijk, T., Stammler, M., Endtz, H. P., Bruining, H. A., Naumann, D., Puppels, G. J., (2003).

Maquelin, K., Kirschner, C., Choo-Smith, L. P., van den Braak, N., Endtz, H. P., Naumann, D., Puppels, G. J., (2002b). Identification of Medically Relevant Microorganisms by Vibrational Spectroscopy, *J. Microbiol. Methods*, **51**, 255-271.

McCreery, R. L. 2000. Raman Spectroscopy for Chemical Analysis. 420 pp. New York: Wiley Intersci.

Michael B. Z., Isabelle A., Maria A., Vincent A., Jorge A., Pieter J., Tomislav Jukić, Djoko K., Zvonko Kusic, Eduardo P., (2013). Thyroglobulin Is a Sensitive Measure of Both Deficient and Excess Iodine Intakes in Children and Indicates No Adverse Effects on Thyroid Function in the UIC Range of 100–299 µg/L: A UNICEF/ICCIDD Study Group Report, *The Journal of Clinical*, **98**, 1271–1280.

Moskovits M. (1985). Surface-Enhanced Spectroscopy. *Rev. Mod. Phys.* **57**, 783- 826.

Moskovits, M. (1978). Surface Roughness and the Enhanced Intensity of Raman Scattering by Molecules Adsorbed on Metals. *J. Chem. Phys.* **69**, 1459-1461.

Mulvaney, S. P., Musick, M. D., Keating, C. D., Natan, M. J. (2003). Glass-Coated, Analyte-Tagged Nanoparticles: A New Tagging System Based on Detection with Surface-Enhanced Raman Scattering. *Langmuir*. **19**, 4784–4790.

Naumann, D. 2000. "Infrared Spectroscopy in Microbiology", p. 102–131. In R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, United Kingdom.

Naumann, D., Helm D., Labischinski, H., Giesbrecht, P. 1991. The Characterization of Microorganisms by Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), p. 43–96. In W. H. Nelson (ed.), *Modern techniques for rapid microbiological analysis*. VCH Publishers, New York, N.Y.

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

Oldenburg, S. J., Averitt, R. D., Westcott, S. L., Halas, N. J. (1998). Nanoengineering of Optical Resonances. *Chem. Phys. Lett.* **288**, 243–247

Otto, A., 1984. Sayfa 289-418. Surface-Enhanced Raman Scattering: "Classical" and "Chemical" Origins. *Light Scattering in Solids IV. Electronic Scattering, Spin Effects, SERS and Morphic Effects*, Editörler: Cardona, M., Guntherodt, G. Berlin: Springer-Verlag.

Persson, B. N. J. (1981). On The Theory of Surface-Enhanced Raman Scattering.

Perumal, J., Kong, K.V., Dinish, U. S., Bakker R. M. and Olivo, M.,(2014). Design and fabrication of random silver films as substrate for SERS based nano-stress sensing of proteins, *RSC Adv.*, **4**, 12995–13000.

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

Prospective Study of the Performance of Vibrational Spectroscopies for Rapid Identification of Bacterial and Fungal Pathogens Recovered from Blood Cultures, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 324-329

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

Rosi, N. L., Mirkin, C. A. (2005). Nanostructures in Biodiagnostics. *Chem. Rev.* **105**, 1547-1562

Sasser, M. 1990. Identification of Bacteria Through Fatty Acid Analysis. Pages 199-204 in: *Methods in Phytobacteriology*. Z. Klement, K. Rudolph, and D. Sands, eds. Akademiai Kiado, Budapest.

Sayin, I., Kahraman, M., Sahin, F., Yurdakul, D., Culha, M., (2009). Characterization of Yeast Using Surface-Enhanced Raman Scattering, *Applied Spectroscopy*, **63(11)**, 1276-1282

Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. (2002). In *Handbook of Vibrational Spectroscopy*. Vol. 1, pp 759–774. Chalmers, J. M., Griffiths, P. R., Eds.; John Wiley & Sons: New York.



- Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. 2002. Handbook of Vibrational Spectroscopy. 1. Cilt: 759 New York, MA: Wiley.
- Sengupta, A., Laucks, M. L., Davis, E. J., (2005). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy of Bacteria and pollen, *Applied Spectroscopy*, **59**, 1016-1023.
- Sengupta, A., Mujacic, M., Davis, E. J., (2006). Detection of Bacteria by Surface Enhanced Raman Spectroscopy, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **386**, 1379-1386.
- Shafer-Peltier, K. E., Haynes, C. L., Glucksberg, M. R., Van Duyne, R. P. (2003). Toward a Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 588–593.
- Soc. Rev.*, **27**, 241-250.
- Sokolov, K., Follen, M., Aaron, J., Pavlova, I., Malpica, A., Lotan, R., Richards-Kortum, R. (2003). Real-Time Vital Optical Imaging of Precancer Using Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Antibodies Conjugated to Gold Nanoparticles. *Cancer Res.* **63**, 1999-2004.
- Sönnichsen, C., Reinhard, B. M., Liphardt, J., Alivisatos, A. P. (2005). A Molecular Ruler Based on Plasmon Coupling of Single Gold and Silver Nanoparticles. *Nat. Biotechnol.* **23**, 741-745.
- Stewart, M. E., Anderton, C. R., Thompson, L. B., Maria, J., Gray, S. K., Rogers J. A., Nuzzo, R. G. (2008). Nanostructured Plasmonic Sensors. *Chem. Rev.* **108**, 494- 521.
- Stiles, P. L., Dieringer, J. A., Shah, N. C., Van Duyne, R. P. (2008). Surface- Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.* **1**, 601-626.
- Stout, J. E., Muder, R. R., 2007. Role Of Environmental Surveillance in Determining The Risk of Hospital-Acquired Legionellosis: A National Surveillance Study with Clinical Correlations, *Infection Control and Hospital Epidemiology*, **28**, 7.
- Stout, S. E., Yu, V. L., Yee, Y. C., Vaccarello, S., Diven, W., Lee, T. C., (1992). *L. pneumophila* in residential water supplies: environmental surveillance with clinical assessment for Legionnaires' disease, *Epidemiol Infect.* **109**, 49–57.
- Swings, J. G., Civerolo, E. L. 1993. *Xanthomonas*. 1st eds, Chapman and Hall, London.
- Taflove, A., Hagness, S. C. 2000. Computational Electrodynamics (Artech House, Boston
- Tessier, P.M., Velev, O. D., Kalambur, A. T., Rabolt, J. F., Lenhoff, A. M., Kaler, E. W., (2000). Assembly of Gold Nanostructured Films Templated by Colloidal Crystals and Use in Surface-Enhanced Raman Spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 9554-9555.
- van de Vossenberg, J., Tervahauta, H., Maquelin, K., Blokker-Koopmans, C. H. W., Uytewaal-Aarts, M., van der Kooij, D., van Wezel, A. P., van der Gaag, B., (2013). Identification of bacteria in drinking water with Raman spectroscopy, *Anal. Methods*, **5**, 2679-2687.

- Van de Vossenberg, J., Tervahauta, H., Maquelin, K., Blokker-Koopmans, C. H. W., Uytewaal-Aarts, M., van der Kooij, D., van Wezel, A. P., van der Gaag, B., (2013). Identification of bacteria in drinking water with Raman spectroscopy, *Anal. Methods*, **5**, 2679-2687.
- Weienbacher, N., Lendl, B., Frank, J., Wanzenböck, H. D., Mizaikoff, B., Kellner, R. (1997). Continuous Surface Enhanced Raman Spectroscopy for the Detection of Trace Organic Pollutants in Aqueous Systems. *J. Mol. Struct.* **410–411**, 539–542
- Willets, K. A., Van Duyne, R. P. (2007). Localized Surface Plasmon Resonance Spectroscopy and Sensing. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **58**, 267-297.
- Winn, W. C., Koneman, E. W., Stephen, D. A., Gary, W. P., Janda, W. M., Schreckenberger, P. C., Woods, G. L., 2006. *Koneman's Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology*, 6th ed. New York: Lippincott Williams & Wilkins;
- Wintermeyer, E<sup>1</sup>., Rdest, U., Ludwig, B., Debes, A., Hacker J., 1991.” Characterization of legiolysin (lly), responsible for haemolytic activity, colour production and fluorescence of *Legionella pneumophila*”, *Mol Microbiol.*, **5**, 1135-43.
- Yang, W. H., Schatz, G. C., Van Duyne, R. P. (1995). Discrete Dipole Approximation for Calculating Extinction and Raman Intensities for Small Particles with Arbitrary Shapes. *J. Chem. Phys.* **103**, 869–875.
- Yonzon, C. R., Haynes, C. L., Zhang, X., Walsh, J. T., Van, R. P. (2004). A Glucose Biosensor Based on Surface-Enhanced Raman Scattering: Improved Partition Layer, Temporal Stability, Reversibility, and Resistance to Serum Protein Interference. *Anal. Chem.* **76**, 78-85.
- Young, M. A., Stuart D. A., Lyandres, O., Glucksberg, M. R., Van Duyne, R. P. (2004). Surface-enhanced Raman Spectroscopy with q Laser Pointer Light Source and Miniature Spectrometer. *Can. J. Chem.* **82**, 1435–1441.
- Young, M. A., Stuart D. A., Lyandres, O., Glucksberg, M. R., Van Duyne, R. P. (2004). Surface-enhanced Raman Spectroscopy with q Laser Pointer Light Source and Miniature Spectrometer. *Can. J. Chem.* **82**, 1435–1441.
- Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Czege, J., Efrima, S., (2002). Silver Metal Induced Surface Enhanced Raman of Bacteria, *Colloids Surf. Ser.*, **208**, 357-362.
- Zeiri, L., Bronk, B. V., Shabtai, Y., Eichler, J., Efrima, S., (2004). Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria, *Applied Spectroscopy*, **58**, 33-40.
- Zhang, X., Young, M. A., Lyandres, O., Van Duyne, R. P. (2005). J Rapid Detection of an Anthrax Biomarker by Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Am. Chem. Soc.* **127**, 4484-4489.
- Zhou, H., Yang, D., Ivleva, N. P., Mircescu, N. E., Niessner, R., Haisch, C., (2014). SERS Detection of Bacteria in Water by in Situ Coating with Ag Nanoparticles, *Anal. Chem.*, **86**, 1525–1533.