

**DOPING KONTROL ANALİZLERİNDE ERİTROPOETİN
TESPİTİNE YÖNELİK SPEKTROSKOPİK METOTLARIN
GELİŞTİRİLMESİ**

**THE DEVELOPMENT OF SPECTROSCOPIC METHODS
FOR THE ERYTHROPOIETIN DETECTION IN DOPING
CONTROL ANALYSIS**

YEŞİM SOMAY SELBES

PROF. DR. NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

PROF. DR. ARİF AHMET BAŞARAN

Tez Eş Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

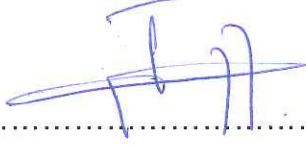
Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin Nanoteknoloji ve Nanotıp
Anabilim Dalı için Öngördüğü DOKTORA TEZİ olarak Hazırlanmıştır.

2016

Yeşim SOMAY SELBES'in hazırladığı "Doping Kontrol Analizlerinde Eritropoetin Tespitine Yönelik Spektroskopik Metotların Geliştirilmesi" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **NANOTEKNOLOJİ ve NANOTIP ANABİLİM DALI**' nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur TAMER

Başkan



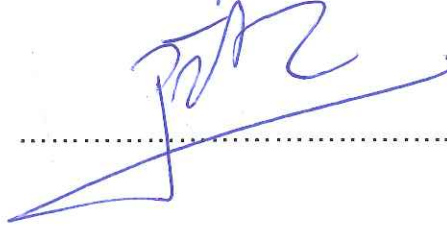
Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Danışman



Prof. Dr. Petek KORKUSUZ

Üye



Doç. Dr. Eylem GÜVEN ÖZTÜRK

Üye



Yrd. Doç. Dr. Mesut ŞAM

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Salih Bülent ALTEN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

.17./06/2016

İmza

Yeşim SOMAY SELBES

ÖZET

DOPİNG KONTROL ANALİZLERİNDE ERİTROPOETİN TESPİTİNE YÖNELİK SPEKTROSKOPİK METOTLARIN GELİŞTİRİLMESİ

YEŞİM SOMAY SELBES

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

İkinci Tez Danışmanı: Prof. Dr. Arif Ahmet BAŞARAN

Haziran 2016, 95 sayfa

Dopingle mücadele, sporcuların haksız rekabetlerini engellemek amacıyla Dünya Anti Doping Ajansı (World Anti-Doping Agency, WADA)'nın yasaklı maddeler ve yöntemler listesinde yer alan maddelerin detaylı analizleriyle mümkün olmaktadır. Eritropoetin (EPO), WADA tarafından yayınlanan listede 'peptit hormonlar ve büyüme faktörleri ve ilişkili maddeler' sınıfında yer alır ve özellikle dayanıklılık gerektiren spor dallarında (yüzme, koşu, bisiklet gibi) kanın oksijen taşıma kapasitesini arttırdığından dolayı doping maddesi olarak kullanılır. Günümüzde doping analizlerinde EPO tayini için WADA'nın belirlediği elektroforetik ve Western Blot teknikleri kullanılır. Ancak bu tekniklerin uygulanmasındaki zorluklar ve uzun süren deney aşamalarından dolayı daha hızlı ve kolay yeni analiz yöntemlerinin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu çalışmada biorad orijinli kontrol idrar matrisinden oldukça düşük miktarlarda bulunan Eritropoetin (EPO)'i hızlı ve hassas bir şekilde tayin edebilmek için SERS ölçümüne dayanan iki farklı sandviç immunoanaliz yöntemi geliştirilmiştir. Her iki yöntemde de SERS probu (5-5'-Ditiobis (2-

Nitrobenzoik asit), DTNB) olarak antikor ile modifiye edilmiş altın nanoçubuklar kullanılmıştır. Homojen sandviç immunoanaliz yönteminde EPO, idrar matriksinden antikor ile modifiye edilmiş altın kaplı manyetik nanopartiküller kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Manyetik nanopartiküller, altın nanoçubuklar ile etkinleştirilmiştir ve sandviç yöntemle EPO analizi gerçekleştirilmiştir. Heterojen sandviç immunoanaliz yönteminde ise EPO'nun katı faz ekstraksiyonu'ndan sonra altın nanoçubuklar ile etkinleştirilerek sandviç analizi gerçekleştirilmiştir. Aynı zamanda hedef protein EPO ile antikor bağlı manyetik nanopartiküller arasındaki seçici bağlanma SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri ile kontrol edilmiştir. EPO derişimlerine karşı DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait sinyal şiddetlerinin grafiğe geçirilmesiyle kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Biorad orijinli kontrol idrar örneklerinde EPO derişimi ve SERS sinyalleri arasındaki korelasyon 0 – 1000 pg/mL derişimleri arasında doğrusal olarak bulunmuştur (homojen sandviç sistemi, R²=0.9692; heterojen sandviç sistemi, R²=0.9320). Geliştirilen analiz sistemlerinin seçicilikleri ve hassasiyetleri incelenmiş; idrar örnekleri üzerinde uygulanabilir olduğu görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: Altın kaplı manyetik nanopartikül. Altın nanoçubuklar, SERS, Eritropoetin, DTNB, , Sandviç immunoanaliz, SDS-PAGE, Western Blot.

ABSTRACT

THE DEVELOPMENT OF SPECTROSCOPIC METHODS FOR THE ERYTHROPOIETIN DETECTION IN DOPING CONTROL ANALYSIS

YEŞİM SOMAY SELBES

**Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology and
Nanomedicine**

Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Co-supervisor: Prof. Dr. Arif Ahmet BAŞARAN

June 2016, 95 pages

Fighting against doping is possible with detailed analysis of the prohibited substances and methods in the list of the World Anti -Doping Agency to prevent unfair competition of the athletes. Erythropoietin (EPO) takes place in the class of the peptide hormones and growth factors and related substances in the list published by WADA and especially is used as a doping agent in the demanding sport endurance (swimming, jogging, bicycle, etc.) to increase the oxygen-carrying capacity of the blood. Today in doping analysis, electrophoretic and Western Blot techniques, which are determined by WADA, are used to detecting of EPO analysis. However, the development of new analytical methods are required faster and easier due to difficulties in the implementation of these techniques and time consuming.

In this study, two different sandwich immunoassays based on surface enhanced Raman Spectroscopy (SERS) were developed for fast and sensitive detection of ultra trace amounts of erythropoietin (EPO) in biorad lypocheck urine matrix. In both methods, antibody modified rod shaped gold nanoparticles were used as SERS probe (5-5'-Ditiobis (2-Nitrobenzoik asit), DTNB). In homogeneous assay, EPO were extracted from biorad lypocheck urine matrix by using antibody modified core shell-structured magnetic iron oxide gold nanoparticles. Magnetic nanoparticles were activated with the gold nanorods and EPO analysis was

performed with sandwich assay. In Heterogenous assay, after solid phase extraction of prohibited substances, sandwich assay with the rod shaped gold nanoparticles was performed. The selective binding between the target protein EPO and antibody bound magnetic nanoparticle was also monitored by SDS-PAGE and Western blotting. The correlation between the EPO concentration in urine and SERS signal was found to be linear within the range of 0–1000 pg /mL ($R^2=0.96920$ and 0.9320 for homogeneous assay and heterogenous assay, respectively). The selectivity and sensitivity of developed analysis methods; it is shown that the developed methods can be applied on urine samples.

Key Words: Gold coated magnetic nanoparticle, Gold nanorod, SERS, Erythropoietin, DTNB, Sandwich immunoassay, SDS-PAGE, Western Blot.



TEŞEKKÜR

Tezim sırasında bilgi ve tecrübesiyle çalışmalarına yön veren, karşılaştığım güçlükler karşısında desteğini esirgemeyen, değerli hocalarım ve tez danışmanlarım Sayın Prof. Dr. Necdet SAĞLAM ve Prof. Dr. Arif Ahmet BAŞARAN'a,

Çalışmalarım kapsamında bilgi ve tecrübesi ile çalışmalarına yön veren, tezimin her aşamasında yanımda olan değerli hocam Sayın Prof. Dr. Uğur TAMER'e

Her türlü desteklerinden ötürü Arş. Gör. Mehmet Gökhan ÇAĞLAYAN, Arş. Gör. Merve ERYILMAZ' a,

Çalışmalarım boyunca desteklerine hiç esirgemeyen Hacettepe Üniversitesi Türkiye Doping Kontrol Merkezi personeline,

Çalışmalarım boyunca manevi destekleriyle hep yanımda olan dostlarım Uzman Kimyager Seda OLGAZ BİNGÖL, Uzman Biyolog Seçil AYTEKİN, Sağlık Teknisyeni Vasfi UĞRAŞ, Arş. Gör. Demet ERDÖNMEZ, Arş. Gör. Kübra ERKAN'a

Hayatım boyunca maddi ve manevi her konuda bana destek olan, hayattaki en değerli varlıklarım; annem Nazire SOMAY, babam Sadık SOMAY, kardeşlerim Engin ve Canan SOMAY' a ,

Sevgisi, sabrı ve her konuda güveni ile yanımda olan kıymetli eşim Dr. Hilmi Caner SELBES' e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER.....	ix
ÇİZELGELER	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR	xii
1. GİRİŞ	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1.Eritropoetin	3
2.1.1.Eritropoetin Yapısı.....	3
2.1.2.Eritropoetin Metabolizması	4
2.1.3. Eritropoetin Üretiminin Düzenlenmesi.....	4
2.1.4. Eritropoetin Etki Mekanizması.....	5
2.1.5. Rekombinant İnsan Eritropoetin (rEPO) Formları.....	6
2.1.6. Rekombinant Eritropoetin Sporda Kullanımı.....	7
2.1.7. Rekombinant Eritropoetin Tespitinde Kullanılan Metotlar.....	9
2.2. Raman Spektroskopisi.....	12
2.2.1 Raman Spektroskopisi Çalışma Prensipleri.....	12
2.2.2 Raman Spektroskopisi Bileşenleri.....	15
2.3. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS).....	17
2.3.1. SERS aktif Substratları.....	19
2.3.1.1. Metal Nanopartiküller.....	19
2.3.1.2. Metal Elektrotlar.....	21
2.3.1.3. İnce Film Yüzeyleri.....	21
2.3.1.4. Protein aracılı Substratlar.....	21
3. Materyal ve Metot	22
3.1. Materyal.....	22
3.1.1. Kimyasallar ve Biyokimyasallar.....	22

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler.....	23
3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereçler.....	24
3.2. Metot.....	25
3.2.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi.....	25
3.2.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi.....	25
3.2.1.2. Küresel Yapıda Altın Kaplı Fe ₃ O ₄ Nanopartiküllerin Sentezi.....	25
3.2.1.3. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubuk Sentezi.....	26
3.2.1.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	26
3.2.1.5. Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu.....	26
3.2.1.5.1. Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu.....	26
3.2.1.5.2. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların Yüzey Modifikasyonu.....	27
3.2.1.5.3. Nanopartikül Yüzeyine Antikorun İmmobilizasyonu.....	27
3.2.1.6. Altın kaplı Metal Yüzey Modifikasyonu.....	28
3.2.1.6.1. Altın kaplı Metal Yüzeyine Antikorun İmmobilizasyonu.....	28
3.2.1.7. Optimizasyon Çalışmaları.....	29
3.2.1.7. 1. Antikor Derişiminin Belirlenmesi.....	29
3.2.1.7.2. rEPO ve Antikor Etkileşim Süresinin Belirlenmesi.....	29
3.2.1.8. Seçici Olmayan Bağlanmaların Önlenmesi.....	29
3.2.1.8. 1. Seçici Olmayan Bağlanmaların Blokama Ajanları ile Önlenmesi.....	29
3.2.1.8. 2. Seçici Olmayan Bağlanmaların Yıkama Prosedürleri ile Önlenmesi.....	30
3.2.1.9. Hedef Analitin Manyetik Partikül ve Altın Metal Plaka Yüzeylerine Bağlanması.....	30
3.2.1.10. Homojen Sandviç Sistemi için Yapının Tamamlanması.....	31
3.2.1.11. Heterojen Sandviç Sistemi için Yapının Tamamlanması.....	31
3.2.1.12. Tasarlanan Sistemlerin Gerçek Örneklerde Uygulanması.....	32
3.2.1.13. Kontrol Deneyleri.....	33
3.2.1.13.1. Validasyon Deneyleri.....	33
3.2.1.13.2. Antikor Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	33
3.2.1.13.3. Eritropoetin İmmunopürifikasyonu.....	33
3.2.1.13.4. Jel Elektroforezi ve Western Blot.....	34
4. BULGULAR	37
4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	37
4.1.1 Altın Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu.....	37

4.1.2 Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu.....	39
4.2. Optimizasyon Deneyleri.....	40
4.2.1. Antikor Derişiminin Belirlenmesi.....	40
4.2.2. rEPO ve Antikor Etkileşim Süresinin Belirlenmesi.....	42
4.2.3. Seçici Olmayan Bağlanmaların Önlenmesi.....	44
4.2.3.1. Bloklama Ajanın Seçilmesi.....	44
4.2.3.2 Bloklama Süresinin Belirlenmesi.....	45
4.2.3.3 Seçici Olmayan Bağlanmaların Yıkama Prosedürleri ile Önlenmesi.....	47
4.3. Homojen Sandviç Sisteminde rEPO Tayini.....	48
4.4.Heterojen Sandviç Sisteminde rEPO Tayini.....	50
4.5.Yöntemlerin Biorad Orijinli Kontrol İdrar Örneklerine Uygulanması	52
4.5.1.Homojen Sandviç Sisteminde İdrarda rEPO Tayini.....	52
4.5.2.Heterojen Sandviç Sisteminde İdrarda rEPO Tayini.....	54
4.6. Kontrol Deneyleri.....	56
4.6.1.Validasyon Deneyleri.....	56
4.6.2. Antikor Seçiciliğinin Belirlenmesi.....	60
4.6.3. SDS-PAGE ve Western Blotting Yöntemi Çapraz Validasyon.....	62
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	63
KAYNAKLAR	68
ÖZGEÇMİŞ	78

ŞEKİLLER

Şekil 2.1. Eritropetin molekül yapısı.....	4
Şekil 2.2. Oksijen ihtiyacına göre eritrosit üretimini düzenleyen feedback sistemi.....	6
Şekil 2.3. Enerji diyagramı üzerinde Raman saçılımları.....	14
Şekil 2.4. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi.....	16
Şekil 3.1. Homojen Sandviç Sisteminde Rekombinant Eritropoetin analizi.....	31
Şekil 3.2. Heterojen Sandviç Sisteminde Rekombinant Eritropoetin Analizi.....	32
Şekil 3.3. Blotting yönteminin şematize gösterimi.....	35
Şekil 4.1. Altın manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsü.....	37
Şekil 4.2. Altın manyetik nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	38
Şekil 4.3. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların TEM görüntüsü.....	39
Şekil 4.4. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların UV-Vis absorpsiyon spektrumları.....	40
Şekil 4.5. Homojen sandviç sistemi antikor derişimi	41
Şekil 4.6. Heterojen sandviç sistemi antikor derişimi.....	41
Şekil 4.7. Homojen sandviç sisteminde rEPO ve antikor etkileşim süresi.....	42
Şekil 4.8. Heterojen sandviç sisteminde rEPO ve antikor etkileşim süresi.....	43
Şekil 4.9. Homojen sandviç sisteminde bloklama ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi.....	44
Şekil 4.10. Heterojen sandviç sisteminde bloklama ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi.....	45
Şekil 4.11. Homojen sandviç sisteminde farklı bloklama sürelerinde elde edilen SERS sinyali.....	46
Şekil 4.12. Heterojen sandviç sisteminde farklı bloklama sürelerinde elde edilen SERS sinyali.....	46
Şekil 4.13. Homojen sandviç sisteminde yıkama sayısının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi.....	47
Şekil 4.14. Heterojen sandviç sisteminde yıkama sayısının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi.....	48
Şekil 4.15. Homojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu	49

Şekil 4.16. Homojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği.....	50
Şekil 4.17. Heterojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu.....	51
Şekil 4.18. Heterojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği.....	52
Şekil 4.19. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen SERS spektrumu örneğinin analizinden elde edilen SERS spektrumu.....	53
Şekil 4.20. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	54
Şekil 4.21. Heterojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen SERS spektrumu	55
Şekil 4.22. Heterojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen kalibrasyon grafiği.....	56
Şekil 4.23. Homojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumu.....	59
Şekil 4.24. Heterojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumu.....	60
Şekil 4.25. Homojen sandviç sisteminin antikor seçiciliğini gösteren SERS spektrumu.....	61
Şekil 4.26. Heterojen sandviç sisteminin antikor seçiciliğini gösteren SERS spektrumu.....	61
Şekil 4.27. Manyetik nanopartikül ile yapılan immunopürifikasyonun CCD kamera görüntüsü.....	62

ÇİZELGELER

Çizelge 2.1. Kanda ya da idrarda ESA'ların tespitinde kullanılan elektroforetik yöntemler.....	11
Çizelge 2.2. Raman Spektroskopisi için Kullanılan Bazı Lazer Kaynakları.....	16
Çizelge 4.1. Homojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol idrar örneklerinden elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanan LOQ ve LOD değerleri	57
Çizelge 4.2. Heterojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol idrar örneklerinden elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanan LOQ ve LOD değerleri	57
Çizelge 4.3. Homojen sandviç sisteminin doğruluğu ve kesinliği.....	58
Çizelge 4.4. Heterojen sandviç sisteminin doğruluğu ve kesinliği.....	58
Çizelge 5.1. Geliştirilen yöntemlerin diğer analitik metotlarla karşılaştırılması.....	65

SİMGELER ve KISALTMALAR

Simgeler

$\Delta\nu$	Raman Kayma Değeri
Σ	Dalga sayısı
kDA	Kilo dalton
V	Volt
mA	Miliamper

Kısaltmalar

ACT	: α 1-Antikimotripsin
BSA	: Sığır Serum Albümin
BFU-E	: Burst-forming unit erythroid
CARS	: Koherent Anti-Stokes Raman Spektroskopisi
CCD	: Kemilüminesans Kamera
CE-MS	: Kapiller Elektforez Spektrokopisi
CERA	: Sürekli Eritropoetin Reseptör Aktivatörü
CFU-E	: Colony-forming unit erythroid
CHO	: Çin hamsterı over
DTNB	: 5,5-dithiobis (2-Nitrobenzoik asit)
CTAB	: Hezadesiltrimetil Amonyum Bromit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
EDC	: N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorit
EDTA	: Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	: Enzim İlintili İmmün Testi
EPO	: Eritropoetin
EpoR	: Eritropoetin Reseptörleri
EPO-Fc	: Eritropoetin Füzyon proteini
ESA	: Eritropoezis Stimüle Edici Ajan
FIBA	: Uluslararası Basketbol Federasyonu
FIFA	: Uluslararası Futbol Federasyonları Birliği
HPLC	: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

HR-MS	: Yüksek Çözünürlüklü Kütle Spektrokopisi
HSG	: α -2-HS- Glikoprotein
IEF	: İzoelektrik Odaklama
IOC	: Uluslararası Olimpiyat komitesi
LC-FAIMS-MS	: Sıvı Kromatografisi Yüksek Alan Asimetrik Dalga Formu İyon Hareketliliği Kütle Spektrometresi
LC-MS/MS	: Sıvı Kromatografisi Kütle Spektrokopisi
LOD	: Tespit Limiti
LOQ	: Tayin Limiti
MES	: 2-morfolinoetanesulfonik Asit Monohidrat
MUA	: Merkaptoandekanoik Asit
mRNA	: Haberci ribonükleik asit
NESP	: Darbepoetin alfa
NHS	: N-Hidroksisülfosüksinimid sodyum tuzu
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
PAGE	: Poliakrilamid jel elektroforezi
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PCR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
rEPO	: Rekombinant İnsan Eritropoetin
RSD	: Relative standard deviation
SAM	: Kendiliğinden Düzenlenen Tabaka
SAR	: Sodyum Sarcocyl
SERS	: Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi
SDS	: Sodyum Dodasil Sülfat
SPR	: Yüzey Plazmon Rezonans
TEM	:Geçirimli Elektron Mikroskobu
THP	: Tamm-Horsfall proteini
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UEFA	: Avrupa Futbol Federasyonları Birliği
uEPO	: Endojen Eritropoetin
UV	:Ultraviolet
XRD	: X Işını Difraksiyon Spektroskopisi
WADA	: Dünya Anti-doping Ajansı

1.GİRİŞ

Doping ve dopingle mücadele, günümüzde hem sporcular arasında haksız rekabete neden olması hem de sporcu sağlığını bozması sebebiyle profesyonel sporlarda çok önemlidir ve önceliği gittikçe artan konulardan biridir. İlk çağlardan beri rekabet duygusu, yarışmalarda rakiplerine karşı avantaj elde etmek ve kazanma hırsı sık karşılaşılan bir davranış şeklidir. Bundan dolayı fiziksel ve zihinsel performansı arttırmak için çeşitli maddeler ve bir takım yöntemler sporcular tarafından kullanılmaya başlanmıştır [1]. "Doping kavramı" dopingin yasaklanmasından itibaren gündeme gelmiş ve tanımı zaman içinde değişikliklere uğramıştır. Doping, yarışma esnasında sporcunun fiziksel ve mental gücünü arttırmak için Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) tarafından "yasaklanmış madde veya yöntemlerin sporcu tarafından bilinçli ya da bilinçsiz olarak kullanımı" olarak tanımlanmaktadır [2]. Yasaklı madde ve yöntemler listesi her yıl WADA tarafından yayınlanarak yürürlüğe girmektedir.

Eritropoetin (EPO) , WADA yasaklı madde listesinde 'peptit hormonlar ve büyüme faktörleri ve ilişkili maddeler' sınıfında yer alır [3]. EPO peptit yapısına sahip bir hormondur ve insan vücudunda endojen olarak sentezlenir. Böbreklerden sentezlenen EPO, kemik iliğinde yer alan reseptörlere bağlanarak eritrosit sentezini uyarır [4]. Bu yüzden bisiklet yarışı, triathlon, yüzme ve maraton koşusu gibi dayanıklılık gerektiren sporlarda kanın vücuttaki kaslara oksijen taşıma kapasitesini arttırdığından dolayı doping amacıyla kullanılır [5,6]. EPO yasaklı maddeler ve yöntemler listesine 1990 yılında eklenmiş olmasına rağmen ilk düzenli ve etkili kontrolü 2000 yılında Sidney Olimpiyatlarında yapılmıştır [5,7].

Doping kontrol laboratuvarları tarafından EPO analizi, jel elektroforezi ve Western Blot tekniklerinin birlikte kullanılmasıyla yapılır. EPO analizine yönelik çeşitli kromatografik yöntemler geliştirilmeye çalışılmış fakat başarılı olunamamıştır [8,9]. At yarışlarında rekombinant EPO kullanımını tespit edebilmek amacıyla gaz kromatografisi kütle spektroskopisi ile yapılan çalışmada EPO analizii yapılabilmektedir [10,11]. Buna rağmen bu metotlar biyolojik sıvılardan düşük miktardaki glikoproteinleri tespit edebilecek hassasiyete sahip değildir [9].Diğer kullanılan bir teknik ise peptit hormonların lektin ve glikoprotein modifikasyonları arasındaki farkları ayırmaya dayanan lektin mikroarrayleridir. Bu teknik, kütle spektroskopisine dayalı tekniklere göre daha hassastır [12]. Bu yüzden EPO

stimüle edici ajanların tespitine yönelik kullanılan mevcut metotlarda karşılaşılan zorlukların aşılabilmesi ve idrar ya da kan matriksinden çok daha düşük miktarları tespit edebilmek amacıyla daha ucuz, seçici ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Yüzeyde güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy SERS) hızlı, duyarlı, tahribatsız analiz sağladığından ve analitik veriler elde edilebildiğinden dolayı son yıllarda dünya çapında önemi gittikçe artan güçlü bir analitik tekniktir [13] ve Raman spektroskopisinin geliştirilmiş bir çeşididir [14]. Raman tekniğinin dezavantajları (düşük tesir kesitli saçılma, zayıf sinyaller gibi) SERS ile ortadan kaldırılır ve Raman saçılmasının zenginleşmesini sağlar [15,16]. SERS, keşfedildiği günden beri kimyasal ve biyolojik moleküllerin tanısında kullanılan güçlü bir analitik yöntem olarak ilgi çekmektedir [17]. Özellikle metal yüzeyindeki moleküllerin oryantasyonlarından yola çıkarak yapısal farklılıklar ve konformasyonel değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan bir tekniktir [18,19]. SERS tekniğinin keşfedilmesiyle adli uygulamalar, farmakoloji [20,21] , mikrobiyoloji [22] , kanser araştırmaları [23] ve doping kontrol [24,25] analizleri gibi bir çok alanda kullanılmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada, doping kontrol analizlerinde kompleks idrar matriksinden oldukça düşük miktarlarda bulunan EPO'yu basit ve hızlı bir şekilde tayin edebilmek için antikor ile modifiye edilmiş nanopartikül tabanlı SERS ölçümüne dayanan iki farklı sandviç immunoanaliz yöntemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır.

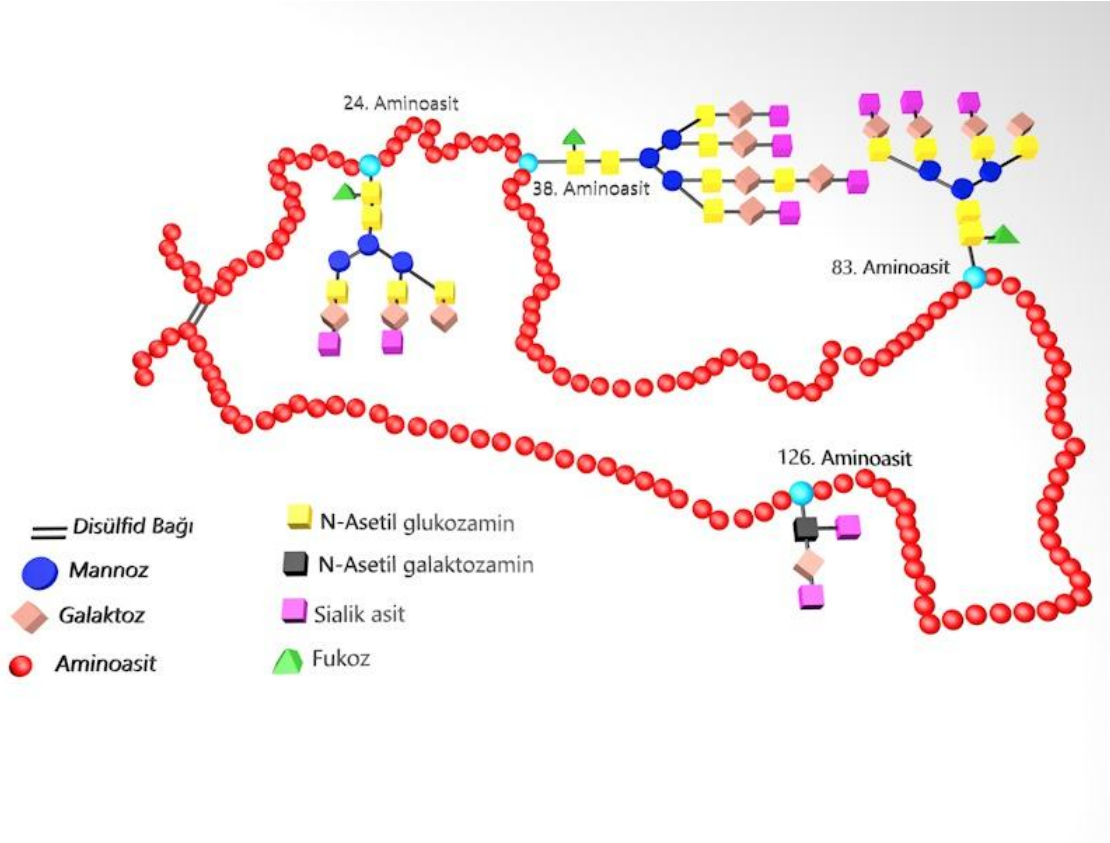
2. Genel Bilgiler

2.1.Eritropoetin

2.1.1.Eritropoetin Yapısı

Eritropoetin (EPO), düşük oksijen seviyesine cevaben esas olarak böbreklerden salgılanan glikoprotein yapısında endojen bir hormondur. Başlıca üretim yeri böbreklerin dış korteksindeki tübülüsler arasındaki dar interstisyel aralıkta yer alan fibroblast benzeri hücrelerdir, fakat karaciğer ve doku makrofajları (kemik iliği, dalak, akciğer, testis , over ve santral sinir sistemi) gibi ekstrarenal dokularda da eritropoetin sentezlenir [26]. Sentezlenen EPO, kemik iliğinde eritroid progenitor hücreleri uyarır ve eritrositlerin farklılaşmasını sağlar [27]. Eritrosit oluşumunu uyaran ve eritrositler için sitokin görevi gören bir hormon olduğundan dolayı hematopoetik büyüme faktörüdür. Eritropoezise neden olduğundan dolayı eritropoezis stimüle edici ajan (ESA) olarak da adlandırılır [28]

EPO, yaklaşık olarak 30.4 kDA molekül ağırlığında monomerik alfa globulindir [29]. %40'ını karbonhidrat oluşturur ve 4 α -heliks bağı içerir. Sialik asitle zenginleşmiş dört kompleks karbonhidrat zinciri (sialik asit, heksoz ve N-asetil glukoz amin) vardır ve üçü N-bağı, biri O-bağı şeklindedir (Şekil 2.1) [30]. mRNA, transkripsiyon sırasında 193 aminoasit içeren protein kodlar, ancak 28 aminoasidini salınım sırasında kaybeder ve olgun protein 165 aminoasitlik bir yapıya sahiptir [31,32]. EPO geninin transkripsiyonunu uyaran başlıca faktörler; anemi, hipoksi ve oksijen duyarlılık yolaklarıdır [33]. EPO'nun hedef dokularda aktivite gösterebilmesi için posttranskripsiyonal glikolizasyonu şarttır [34]. Hormonal peptidin glikolizasyonu, in vivo aktivite gösterebilmesi için zorunlu bir ihtiyaçtır [35,36]. Proteinin yapısında glikan zincirleri içinde çeşitli dallanma formları bulunur. Glikan zincirlerinin terminal sialik asit grubuna sahip olması ya da olmaması EPO'nun izoelektrik noktalarının değişmesine neden olur [37].



Şekil 2.1. Modifiye eritropetin molekül yapısı [38]

2.1.2. Eritropoetin Metabolizması

EPO'nun dolaşımdaki yarılanma ömrü 4-12 saattir ve diğer glikoproteinler gibi plazma klirensi oldukça yavaştır [39]. Terminal sialik asit rezidüleri, glikoproteinin karaciğerde galaktoz reseptörlerine bağlanmasına ve hücre içine alınmasına engel olur. Ancak N-asetil nöraminik asit kısmının yokluğunda, karaciğerde galaktoz bağlayan reseptörler tarafından hızlı bir şekilde dolaşımdan temizlenir [39,40]. Bakterilerde üretilen glikolize olmayan rekombinant EPO'nun, in vivo aktiviteye sahip olmadığı ve karaciğer tarafından hızlı bir şekilde metabolize edildiği gözlenmiştir [35,36].

2.1.3. Eritropoetin Üretiminin Düzenlenmesi

Dolaşımdaki eritrosit sayısı EPO tarafından direk olarak feedback mekanizmasıyla kontrol edilmez, EPO üretiminin temel belirleyicisi doku oksijenizasyonudur. İn vitro çalışmalarda oksijen duyarlılığının EPO üretimini mikrozomal karışık fonksiyonlu oksidaz enzimi içeren bir hem proteini aracılığıyla kontrol ettiği gösterilmiştir [41]. EPO sentezini etkileyen temel faktörler şunlardır:

1-Düşük kan oksijen kapasitesi: Dolaşımdaki EPO etkisini kanın oksijen taşıma kapasitesini büyük oranda artırarak gösterir. Hemogloblin konsantrasyonu ile EPO sentezini etkileyen faktörler arasında zıt bir aktivite mevcuttur [42,43]. Örneğin hipoplastik anemilerde aneminin derecesine göre EPO aktivitesi artarken, malign hastalıklarda ise aktivitesinde azalma gözlenir. Akut kanamalarda hem insanlarda hem hayvanlarda EPO üretimi artarken kan transfüzyonunda üretimi baskılanır [44].

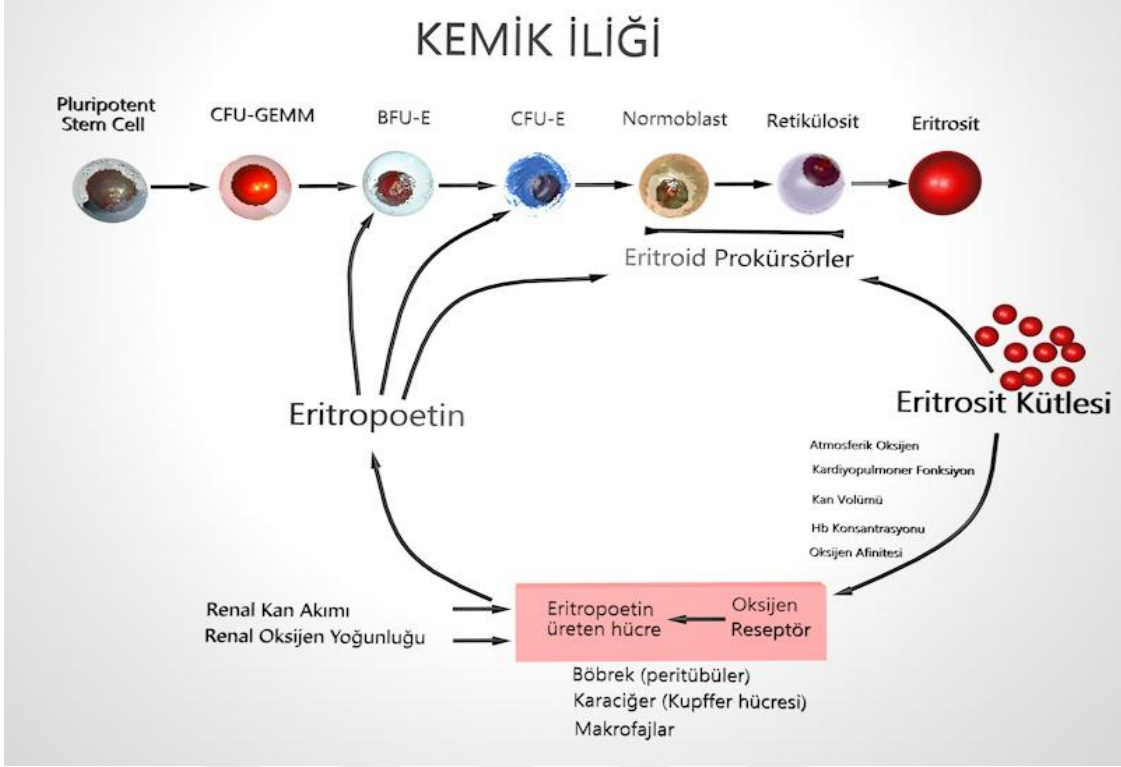
2.Düşük arteryal oksijen basıncı: İnspiratuar oksijen basıncı azaldığında dokulara giden oksijen miktarı azalır ve bunun sonucunda hipoksinin derecesine bağlı olarak EPO üretimi artar. Düşük oksijen basıncından dolayı yüksek rakımlarda yaşayan kişilerde hemogloblin ve hematokrit miktarı yüksektir. Bu yükseklik kan viskozitesinin ve kardiyak iş yükünün artmasına neden olur [45].

3.Artmış kan oksijen afinitesi: Kan oksijen afinitesindeki artış EPO üretimini arttırır. Orak hücreli anemide olduğu gibi oksijen afinitesinin azalması eritropoetin sentezini azaltırken akut karbon monoksit zehirlenmesinde ise sentezi artar.

4. Düşük böbrek kan akımı: Böbrek kan akımının azalması sonucu oksijenlenme bozulur ve EPO üretimi artar. Böylece meydana gelen viskozite artışı nedeniyle perfüzyon hızında azalma ve doku hipoksisinde artış meydana gelir. Sonucunda tekrar EPO üretimi artar [39].

2.1.4. Eritropoetin Etki Mekanizması

EPO, eritroid kök hücre farklılaşmasının ve olgunlaşmasının hormonal düzenleyicisi olarak kabul edilir [46]. EPO kemik iliğinde eritroid serinin öncü hücreleri olan Burst-forming unit erythroid (BFU-E) , farklılaşmış BFU-E ve Colony-forming unit erythroid (CFU-E) üzerine etkilidir. EPO'nun hedef hücre üzerindeki etki mekanizması; BFU-E ve CFU-E hücrelerinin yüzeyindeki spesifik EPO reseptörlerine (EpoR) bağlanarak bu hücrelerin çoğalmasını, CFU-E'nin proeritroblastta dönüşmesini sağlarken proeritroblast ve bazofilik eritroblastların proliferasyonunu artırması şeklindedir. Oluşan proeritroblastlar bir hafta içerisinde olgun normoblastlara, bunlar da retikülositlere dönüşür (Şekil 2.2) [44]



Şekil 2.2. Oksijen ihtiyacına göre eritrosit üretimini düzenleyen feedback sistemi

EpoR reseptörü tek transmembran alanlı lineer bir proteindir ve transmembran alanı yapı olarak interlökin-2 reseptörünün beta zinciri ile benzer yapıdadır. EPO'nun reseptöre bağlanmasını takiben EPO-reseptör kompleksi hücre içine alınır ve sitoplazmada GTP-bağlayıcı protein aracılığıyla taşınır ve hücre içi serbest kalsiyum konsantrasyonunda hızlı bir şekilde artış gerçekleşir. Mesajın nükleusa nasıl taşındığı net olmamakla birlikte, hedef hücre nükleusunda protein kinaz C aktivasyonunu ve protein fosforilasyonunu uyardığı düşünülmektedir [47]

2.1.5. Rekombinant İnsan Eritropoetin (rEPO) Formları

İnsan idrar EPO'sunun saflaştırılması ile benzer biyolojik aktivite, molekül ağırlığı ve amino asit dizilişine sahip iki fraksiyon (alfa ve beta) tespit edilmiştir fakat bunların elektroforetik hareketliliği ve karbonhidrat içeriği farklıdır [31,48,49]. İdrardan EPO'nun saflaştırılması, insan EPO'sunu kodlayan insan genomik DNA'sının klonlanmasına ve izolasyonuna olanak verir. Memeli hücre kültürlerinde rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak üretilen EPO preparatları böbrek yetmezliğine ya da kanser kemoterapisine bağlı anemilerin tedavisinde kullanılmaktadır [50]. Çok çeşitli farmakolojik EPO preparatları mevcuttur. Bu formların üretilmesinde farklı konak hücreleri kullanılır. Mevcut insan rEPO formları

'epoetin ' alfa, beta, delta, gama ve omega şeklinde isimlendirilir. Epoetin alfa ve beta Çin hamsteri over (CHO) hücrelerinden elde edilirken, epoetin omega bebek hamster böbrek hücrelerinden elde edilmiştir [51]. İkinci kuşak rEPO preparatlarından delta ise insan over hücrelerinden elde edilmiştir. Diğer ikinci kuşak rEPO preparatları darbepoetin alfa ('Novel Eritroid-Stimulating Protein, NESP ve Continuous Erythropoietin Receptor Activator, CERA)'dir. NESP, CHO hücrelerinde epoetin alfa'nın protein çekirdeğine ekstra iki glikan zinciri eklenmesiyle üretilir. Eklenen iki glikan zinciri yapının biyolojik aktivitesini ve yarılanma ömrünü 2 kat artırır. Ayrıca molekül ağırlığını 37 kDA'na çıkarır [52]. CERA ise epoetin beta'nın ya N-terminal ya da lizin aminoasitlerinin primer amin gruplarına polietilen glikol gruplarının eklenmesiyle üretilir. PEG gruplarının eklenmesi CERA'nın kandaki yarılanma ömrünü yaklaşık 7 kat artırır ve molekül ağırlığını 60 kDA'na çıkarır [53]. Son yıllarda yeni ESA'lar da (Eritropoetin Füzyon proteini, EPO-Fc ve Peginesatide gibi) kullanılmaya başlanmıştır [54].

2.1.6. Rekombinant Eritropoetin Sporda Kullanımı

Doping etkisi yaratan madde veya yöntemlerin kullanımı, hem sporcu sağlığını kısa ve uzun vadede olumsuz etkilemesi ve hatta ölümlerle sonuçlanabilecek durumlara neden olması hem de haksız rekabete zemin hazırlaması sebebiyle spor etiği ile bağdaşmamaktadır. Bu nedenlerle doping; WADA, Uluslararası Olimpiyat komitesi (IOC), Avrupa Futbol Federasyonları Birliği (UEFA), Uluslararası Futbol Federasyonları Birliği (FIFA), Uluslararası Basketbol Federasyonu (FIBA) gibi uluslararası spor organizasyonları tarafından yasaklanmıştır [55]. WADA tarafından yayınlanan doping yönetmeliği ve sınıflamasına giren yasaklı maddeler ve yöntemler şu şekilde sınıflandırılır;

A. Kullanımı Her Zaman Yasaklı Olan Maddeler (Yarışma İçi ve Yarışma Dışı)

S0. Onaylanmamış Maddeler

S1. Anabolik Maddeler

S2. Peptid Hormonlar, Büyüme Faktörleri ve İlişkili Maddeler

S3. Beta-2 Agonistler

S4. Hormon ve Metabolik Modülatörler

S5. İdrar Söktürücüler ve Diğer Maskeleyici Maddeler

B. MÜSABAKA SIRASINDA KULLANIMI YASAKLI MADDELER

S6. Uyarıcılar

S7. Narkotikler

S8. Kannabinoidler

S9. Glukokortikosteroidler

C. YASAKLI YÖNTEMLER

M1. Kan ve Kan Bileşenlerine Müdahale

M2. Kimyasal ve Fiziksel Müdahale

M3. Gen Dopingi .

Eritropoetin, WADA yasaklı madde listesinde peptit hormonlar ve büyüme faktörleri ve ilişkili maddeler sınıfında yer alır [3]. Bisiklet yarışı, triathlon, yüzme ve maraton koşusu gibi dayanıklılık gerektiren sporlarda kanın vücuttaki kaslara oksijen taşıma kapasitesini arttırdığından dolayı doping amacıyla kullanılır [5,6]. Sportif organizasyonlarda EPO kullanımı 1990 yılında olimpiyat organizasyonları tarafından yasaklanmıştır. Ancak o yıllarda rEPO'nun tespitine yönelik analiz yöntemleri mevcut değildi. EPO analizi ilk kez, Sydney'de (Avustralya) gerçekleştirilen 2000 Yaz Olimpiyatlarında uygulanmıştır. Analizin geçerliliği Uluslararası Olimpiyat komitesi (IOC) tarafından idrar ve kan numunelerinin incelenmesiyle sağlanmıştır. Vücuttaki rekombinant EPO varlığını göstermek için uygulanan hematolojik test sonuçlarının geçerliliği, idrar numunelerinin analiziyle doğrulanmıştır. 2003 yılında Dünya Anti-Doping Ajansı (WADA) Yürütme Kurulu bağımsız araştırmacıların raporlarına istinaden rekombinant EPO kullanımının sadece idrar numuneleri üzerinden tespitini yeterli görmüştür [56].

Sportif performansı arttırmaya yönelik EPO kullanımının sporcu sağlığını tehdit eden çok ciddi yan etkileri bulunmaktadır. EPO'nun kanın viskozitesini arttırmasına bağlı olarak felç, kalp hastalıkları, dokularda oksijen perfüzyon bozukluğuna bağlı nekrozlar, beyin ve akciğer embolileri gibi birçok ölümlü sonuçlanan hastalıklara yol açması söz konusudur[57,58].

2.1.7. Rekombinant Eritropoetin Tespitinde Kullanılan Metotlar

Sporcular tarafından EPO kullanımı Uluslararası Olimpiyat Komitesi (tarafından 1990 yılında yasaklanmıştır [5,6]. Yaklaşık on yıl sonra Fransa Ulusal Anti-Doping Laboratuvarı tarafından yürütülen bir çalışma sonucunda araştırmacı Françoise Lasne EPO'yu sporcu idrarında tespit edebilecek direk ölçüm tekniği geliştirmiştir [5]. Daha önceleri sporcuların EPO kullanımını tespit edebilmek için sadece indirekt metotlar kullanılmaktaydı. İndirekt testlerde sporcuların hemoglobin düzeylerinin normalden daha yüksek olup olmadığına bakılıyordu. Sadece bu testler kullanılarak EPO dopingi onaylanamaz. Çünkü normal hemoglobin düzeyleri önemli ölçüde değişmektedir [59].

EPO tespitine yönelik geliştirilen yöntem jel elektroforezi ve Western Blot tekniklerinin birlikte kullanımına dayanır. Jel elektroforezi; protein ve nükleik asit gibi yüklü makromolekülleri; büyüklüklerindeki, elektrik yüklerindeki ve yapılarındaki farklılıkları kullanarak yüksüz bir ortamda birbirinden ayırt etmek için kullanılan bir yöntemdir. Sahip oldukları fosfat gruplarından dolayı sabit negatif yüke sahip nükleik asitler, elektroforez sırasında jel üzerinde pozitif kutuba doğru göç ederlerken aminoasit, protein gibi makromoleküller ise elektriksel alanda net yüklerine bağlı olarak pozitif ya da negatif kutuba doğru göç ederler. Protein ya da DNA/RNA elektrik alanına maruz bırakıldıklarında sahip oldukları yükleri ile doğru orantılı fakat şekilleri ve büyüklükleri ile ters orantılı bir hızda göç ederler. Bir molekülün jel elektroforezinde göç hızını etkileyen üç önemli faktör vardır:

1. Uygulanan elektriksel alan gücü,
2. Molekülün sahip olduğu net yükü
3. Elektroforez ortamının yoğunluğudur.

Proteinlerin analizinde çeşitli jel elektroforez çeşitleri mevcuttur:

1. Poliakrilamid jel elektroforezi (PAGE): Bu yöntemde Akrilamid polimerlerinden oluşan jeller proteinlerle molekül ağırlığı 500 bç'nin altındaki nükleik asitleri ayırmak amacıyla kullanılır.
2. Agaroz jel elektroforezi: 50 kbç'nin altındaki nükleik asitleri ayırmak amacıyla kullanılan ve esas yapısı agarozdan meydana gelen bir elektroforez tekniğidir.

3. Pulsed Field Jel elektroforezi: 10 Mb'nin altında molekül ağırlığına sahip makromolekülleri ayırmak amacıyla kullanılan bir elektroforez tekniğidir.

4. Nişasta elektroforezi [60].

Günümüzde rekombinant eritropoetin ve analoglarının tespitinde WADA tarafından onaylanan (WADA Technical Document- TD2015EPO) teknik dökümanda üç farklı PAGE tekniği tanımlanmıştır (Çizelge 2.1) [54]. Bunlardan ilki İzoelektrik Odaklama (IEF)'dir ve EPO tespiti için Françoise Lasne tarafından geliştirilen ilk tekniktir. IEF-PAGE, hareket doğrultusunda değişen pH'a sahip olan dengeli pH gradientli bir ortamda harekete bağlı olarak proteinlerin ayrılmasına dayanan bir tekniktir. Proteinler, izoelektrik noktalarının eşit olduğu pH'a kadar jel üzerinde hareket ederler. Net yükün 0 olduğu pH'da proteinlerin hareketi son bulur. IEF'de bir proteinin izoelektrik noktası çok dar bir pH aralığında bulunduğundan protein bantları çok belirgindir. Çünkü protein difüzyonu pI'ye eşit olan pH'a kadar yük kazanarak hareket eder ve bu pH'da hareket sonlanır. Daha sonra elektroforetik güçlerin etkisiyle bir miktar geriye doğru hareket eder. Bu teknikle proteinler, izoelektrik noktalarına, dolayısıyla da yüklerine göre oldukça hassas bir şekilde ayrılırlar. İzoelektrik nokta değerlerinde çok düşük pH farkı olan protein molekülleri bile ayrı bantlar şeklinde gözlenebilirler [5].

WADA'nın teknik dokümanında yer alan diğer teknikler ise Sodyum Dodesil Sülfat Poliakrilamid Jel Elektroforezi(SDS-PAGE) ve Sodyum Sarcocyl Poliakrilamid Jel Elektroforezi (SAR-PAGE)'dir [54]. Her iki teknikte de ayırım, proteinlerin molekül ağırlıklarına göre gerçekleşir. Proteinin molekül büyüklüğü ve konformasyonu, bulunduğu ortamdaki hareketliliğini etkiler. PAGE de yüzey aktif madde olarak kullanılan SDS ve SAR proteinlerin üç boyutlu yapısını oluşturan hidrofobik etkileşimleri kırar ve yapısında bulunan negatif yükleri ile protein molekülünün etrafını sararak, proteinin negatif yüklenmesine neden olur. PAGE'de kullanılan deterjanlar sahip oldukları hidrofobik kuyukları sayesinde polipeptit zincirine bağlanır. Bu yüzden SDS/ SAR denatüre olmuş proteinleri yüksek miktarda negatif yük kazandırır. Bu yük proteinler üzerinde bulunan yükleri kapatır ve proteinlerin jelde yüklerine göre değil molekül büyüklüklerine göre ayrılmasını sağlar. Aynı zamanda proteinin üç boyutlu yapısını, katlanmalarını sağlayan bağları kırarak proteinin lineer bir yapı kazandırır. Böylece SDS/SAR ile etkileşime giren numuneler elektriksel ortamda molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar [60,61]. SAR-

PAGE özellikle yapısında Polietilen glikol (PEG) zinciri taşıyan EPO analoglarının ayrılmasında kullanılan bir tekniktir [54,61]

Tarama Testi Prosedürü		Doğrulama Testi Prosedürü
Metot	Pozitif Analitik Bulgu	Metot
IEF ve/veya SAR-PAGE	rEPO	SDS-PAGE /SAR-PAGE
	NESP	IEF-PAGE / SDS-PAGE / SAR-PAGE
	CERA	IEF-PAGE / SAR-PAGE
SAR-PAGE	EPO-Fc	SDS-PAGE /SAR-PAGE
SDS-PAGE veya SAR-PAGE	Peginesatide	SDS-PAGE /SAR-PAGE

Çizelge 2.1. Kanda ya da idrarda ESA'ların tespitinde kullanılan elektroforetik yöntemler [54] .

Tüm bu kullanılan jel elektroforez teknikleri Western Blot tekniği ile birleştirilmiştir. Western Blot, biyokimya ve moleküler biyolojide proteinlerin ayrılmasında kullanılan çok yaygın bir tekniktir. Bu yöntemde jel elektroforezi ile ayrılan proteinler uygun bir tampon yardımıyla elektrik akımı altında kağıt membranlara aktarılır. Daha sonra membrana aktarılan proteinler, spesifik antikorlar ile işaretlenirler. Membranda yer alan antikor ile işaretlenmiş protein bantlarının kontrol bantlarıyla karşılaştırılmasıyla protein analizleri gerçekleştirilir. Membrandaki bantların varlığı kemilüminesans kamera (CCD) ile görüntülenir [60]. Western Blot tekniği uygulanmasında tek blotting basamağı vardır fakat WADA tarafından onaylanan teknikte iki kez blotting işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem "Double Blotting " olarak adlandırılır [5].

WADA tarafından onaylanan bu tekniklerin uygulamasında pek çok kritik faktör yer almaktadır. Örneğin örnek hazırlama aşamasında oldukça yüksek miktarda (20 mL) idrar numunesi ile başlanması ve EPO tespitinin yapılabilmesi için idrarın en

az 400 kat konsantre edilmesi gerekmektedir [5,54]. Bu maddelerin tarama ve doğrulama analizlerinde farklı elektroforetik tekniklerin kullanımı zorunlu kılınmaktadır. EPO analizlerinin tespitinde oldukça fazla miktarda yöntem, kimyasala, zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden EPO stimüle edici ajanların tespitine yönelik kullanılan mevcut metotlarda karşılaşılan zorlukların aşılabilmesi ve idrar ya da kan matriksinden çok daha düşük miktarları tespit edebilmek amacıyla daha ucuz, seçici ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Nanoteknolojinin gelişmesiyle birlikte birçok yeni nesil tanı kitleri çeşitli yöntemlerle tasarlanmaktadır.

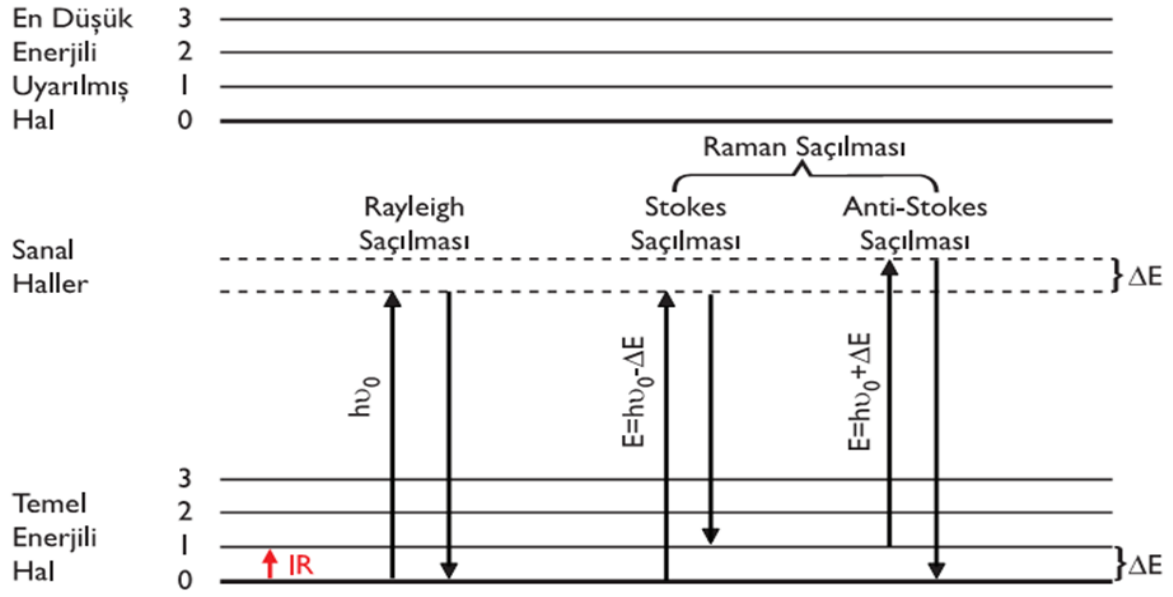
2.2. Raman Spektroskopisi

Raman etkisi olarak bilinen bu fenomen, fotonların elastik olmayan saçılmasıdır. 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 ortaya koyan bu fenomen Hintli fizikçi C.V. Raman tarafından 1928 yılında bulunmuştur. Buluşu ve sistematik açıklamalarıyla 1931'de Nobel Fizik Ödülü kazanmıştır [62, 63].

2.2.1 Raman Spektroskopisi Çalışma Prensibi

Spektroskopik bir teknik olan Raman spektroskopisi, bir numunenin görünür bölge ya da yakın-IR monokromatik ışından oluşan güçlü bir lazer kaynağıyla ışınlanmasıyla saçılan ışının belirli bir açıdan (genellikle 90 derece) ölçümüne dayanan bir tekniktir [64]. Şeffaf bir ortamdan geçen ışın demetinin radyant gücünün bir kısmı, demetin geliş yönüne göre çeşitli açılarla her yönde saçılım gösterir. Işık saçılması sırasında saçılan ışığın dalga boyu ile gelen ışığın dalga boyu aynı ise elastik bir saçılma olan Rayleigh saçılması meydana gelir [65]. Şayet tanecikler bir osilatör gibi davranıyor yani titreşim ve dönme hareketlerinden ötürü saçılan ışığın dalga boyunda değişim meydana geliyorsa, buna "**Raman Saçılması veya Raman kayması**" adı verilir ve ışık demetinde yer alan tanecikler ile ortamda bulunan moleküllerin çarpışması sonucu oluşan elastik olmayan saçılmadır [65,66]. Saçılan Raman fotonları, moleküllerin titreşim düzeylerine bağlı olarak ya düşük ya da yüksek enerjilidir. Fotonun kazandığı ve kaybettiği enerji değişiminden yararlanılarak moleküllerin titreşim düzeyleri hakkında bilgi elde edilir [67]. Raman saçılması olarak adlandırılan elastik olmayan ışık saçılması iki farklı

yolla gerçekleşir (şekil 2.3). Bunlardan ilki saçılma frekansının başlangıç frekansından daha düşük olduğu Stokes saçılmasıdır. Bu tür saçılmalarda gelen fotonun enerjisi saçılan fotonun enerjisinden daha büyüktür [66]. Saçılma frekansı başlangıç frekansından daha büyük ise Anti-Stokes saçılmaları gerçekleşir ve gelen fotonun enerjisi saçılan fotonun enerjisinden daha düşüktür. Anti-Stokes saçılmaları, daima karşılığı olan Stokes saçılmalarına göre daha zayıftır. Raman spektrumları, saçılmaya neden olan moleküllere özgüdür ve bu özelliklerinden dolayı analitik çalışmalarda ön plana çıkmıştır [68,69]. Spektrumlar, dalga sayısı kayması ' $\Delta\sigma$ ' nün kaynak hattına göre grafiğe geçirilmesiyle çizilir. Çok şiddetli piklere sahip olan Stokes pikleri, $\Delta\sigma$ (cm^{-1} cinsinden kayma) düşük dalga boylarına göre değerlendirilir. Yani, $\Delta\sigma = \sigma_s - \sigma$; σ_s özel kaynak hattının dalga sayısı (cm^{-1}), σ Raman pikinin dalga sayısıdır. Raman hatlarının üstünde verilen sayılar Raman kayma değerleridir ($\Delta\nu \text{ cm}^{-1}$) [67]. Saçılan ışında Raman kayması olabilmesi için, molekülün titreşimi sırasında fotonun frekansına eşit frekanslı olarak polarize olabilmeye değişikliğine ihtiyaç vardır yani geçici bir dipol momentinin oluşması gerekmektedir [70]. Titreşim spektrumu incelendiğinde bir bileşiğin yapısını aydınlatmaya yardımcı olmakla birlikte, yapıdaki bağ türleri ve fonksiyonlu gruplar hakkında önemli bilgiler verir [13,70]. Bir bileşiğin titreşim spektrumu o bileşiğe özgüdür. Titreşim spektrumunu oluşturan IR ve Raman sinyalleri birbirlerini tamamlamaktadır [62]. Dipol moment değişimine yol açan polar bağların ve asimetric titreşimlerin IR'de güçlü sinyal verirken, Raman'da çoğu zaman zayıf sinyal verdikleri gözlenmiştir. Polarizasyon değişimine neden olan apolar bağlar ve simetric titreşimler ise Raman'da güçlü sinyal verirken IR'de zayıf sinyal verirler. Moleküllerin yapısında bulunan $-\text{C}=\text{C}-$, $-\text{CN}-$, $-\text{N}=\text{N}-$, $-\text{S}-\text{S}-$ ve $-\text{C}-\text{O}-\text{C}-$ gibi kimyasal bağlar titreşimleri güçlü Raman sinyali verirler. Raman, IR'nin tamamlayıcısı olup IR'de gözlenmeyen zayıf titreşimler daha iyi gözlenir ve molekülün yapısı ve nitel analizi hakkında doğru sonuçlar elde edilebilmektedir [71,72].



Şekil 2.3. Enerji diyagramı üzerinde Raman saçılımları [66].

Raman tekniği kullanılarak organik, inorganik ve biyolojik örneklerin nitel ve nicel analizleri gerçekleştirilebilmektedir [73]. Raman spektroskopisi, sulu çözeltilerle çalışmaya olanak verdiği için inorganik sistemlerin analizinde infrared spektroskopisine göre daha iyi sonuçlar vermektedir [74]. Raman çalışmalarında koordinasyon bileşiklerini oluşturan atomların yapısı ve kararlılığı incelenebilmektedir. Ayrıca olefinler gibi bazı organik bileşiklerin Raman spektrumunda infrared spektrumuna göre daha fazla bilgi elde edilir [75]. Hem Raman hem de infrared spektrumu incelendiğinde fonksiyonel grupların tanımlandığı bölgeler ve özel bileşiklerin belirlenmesinde yararlı olan parmak izi bölgeleri vardır [20]. Raman spektrum katalogları referans olarak kullanılarak organik bileşiklerin tanımlaması yapılır [76]. Raman spektroskopisi özellikle biyolojik sistemlerin analizinde çok önemli sonuçlar vermektedir. Raman saçılımının invaziv olmayışı, mikroskop ile cihazın bir arada ve örneğin çok az miktarının bile inceleme için yeterli olması gibi avantajlarına sahip olmasından dolayı adli uygulamalarda analitik teknik olarak kullanılmaktadır [20,21]. Raman tekniği, hızlı ve basit bir teknik olduğu için alkollü içeceklerin belirlenmesinde, banknotların üzerinde, tırnaklarda, kıyafetlerde ve içeceklerde uyuşturucu tespit edilmesi gibi çeşitli adli uygulamalarda etkili ve çok yönlü analitik teknik olduğu kanıtlanmıştır [77]. Raman son yıllarda; bakterilerin tür, cins ve suşlarının doğru

sınıflandırılmasında, hızlı tanımlanmasında ve biyokimyasal karakterizasyonlarının tayin edilmesinde yaygın olarak kullanılan spektroskopik bir tekniktir [22] .

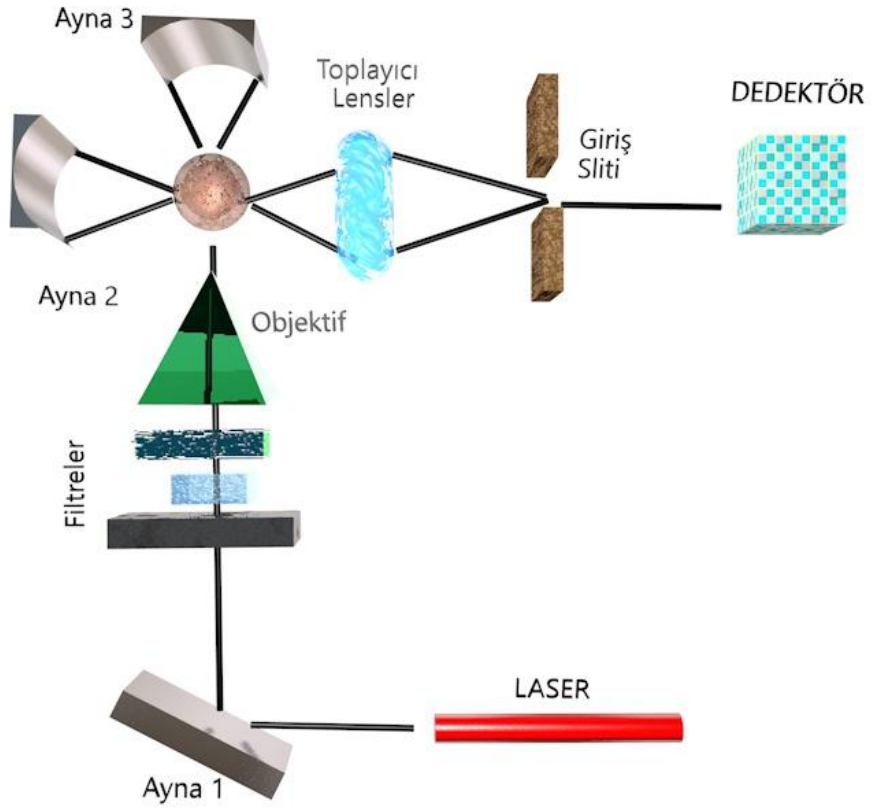
Ayarlanabilir lazerlerin geliştirilmesiyle yeni Raman Spektroskopik yöntemler geliştirilmiştir. Geliştirilen yöntemlerden biri; bir maddenin elektronik absorpsiyon piki ile aynı ya da çok yakın bir frekanstaki lazer ışık kaynağının kullanıldığı Rezonans Raman spektroskopisidir. Yöntemin hassasiyet ve seçiciliği oldukça yüksektir. Bu yöntemde yerel ısınmayla numune bozulur fakat lazer demetinin geçtiği numunenin döndürülmesiyle ya da puslu demet kullanılmasıyla numunenin hasar görmesi engellenmeye çalışılır. Diğer Raman yöntemi Koherent Anti-Stokes Raman Spektroskopisidir (CARS). CARS'da, Raman Spektroskopisinde karşılaşılan düşük verim, görünür ve ultraviyole bölgeyle sınırlama ve floresanstan etkilenme gibi bazı sorunlar ortadan kalmıştır [20].

2.2.2 Raman Spektroskopisi Bileşenleri

Modern Raman spektroskopisi cihazı dört temel bileşenden oluşur:

- 1.Şiddetli bir ışık kaynağı
- 2.Numune aydınlatma ve toplama sistemi
3. Dalga boyu seçicileri (spektrofotometre veya filtre)
4. Algılama ve bilgisayar kontrol sistemi.(Şekil 2.4)

Raman Spektroskopisinde, ışık kaynağı olarak farklı lazer kaynakları vardır (Çizelge 2.2). En ideal lazer kaynağı su soğutmalı argon iyon lazer kaynağıdır [78,79].



Şekil 2.4. Raman spektroskopisi bileşenlerinin şematik gösterimi [78].

Lazer Tipi	Dalga Boyu (nm)
Argon iyon	488.0 veya 514.5
Kripton iyon	530.9 veya 647.1
Helyum-neon	632.8
Diod	785 veya 830
Nd-YAG	1064

Çizelge 2.2. Raman spektroskopisi için kullanılan bazı lazer kaynakları [79].

2.3. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (Surface Enhanced Raman Spectroscopy, SERS)

Raman spektroskopisi, analitik kimya ve biyokimyada yaygın olarak kullanılan bir teknik olmasına rağmen en büyük dezavantajı düşük tesir kesitli saçılmadır ve zayıf sinyal veren bu saçılımlar floresans veya elastik saçılan ışın tarafından engellenirler. Raman tekniğinin bu dezavantajı SERS ile ortadan kaldırılmaya çalışılır [80].

SERS tekniğinin katı metal yüzeyler üzerinde Raman sinyallerinin arttırabileceğini ilk kez Fleischmann ve ark. tarafından bulunmuştur [81]. Güçlü moleküler spektroskopi tekniği olan SERS; altın, gümüş, bakır gibi koloidal nanometal taneciklerin yüzeyinde ya da bu metal nanopartiküllerin pürüzlendirilmiş yüzeylerinde adsorblanmış moleküllerin Raman spektrumlarının elde edilmesidir [15,82]. SERS çalışmalarında Raman saçılımının yoğunluğunun artması temel olarak plazmonik özellikteki nanoyapıların yakın olmalarından kaynaklı ortaya çıkan elektromanyetik etkilerden kaynaklanmaktadır. Metal nanopartiküllerin yüzeyinde meydana gelen plazmon rezonansı önemli derecede lokal yüzey artışına neden olur [83,84]. ve bu sayede moleküllerin Raman saçılım sinyalleri 10^2 - 10^{14} kat artar [85].

SERS tekniğini açıklamaya çalışan iki temel mekanizma bulunmaktadır. Bunlardan en yaygın olanı, gelen radyasyon ile lokal elektrik alanının artışına neden olan nanopartiküllerin kendi etrafında oluşturdukları yüzey plazmonlar arasındaki etkileşimi açıklayan elektromanyetik zenginleştirmedir. Elektromanyetik zenginleştirme, plazmonik materyalin yapısına (cinslerine ve büyüklüğüne) göre değişmektedir. Diğer mekanizma, metalik yüzey ile molekül arasında şekillenen yük transferinden kaynaklanan kimyasal zenginleştirmedir [85]. . Teorik olarak hesaplanan, kimyasal zenginleştirme faktörü 10^3 iken, elektromanyetik zenginleştirme faktörü 10^{10} - 10^{11} 'dir. Toplam SERS zenginleştirme faktörü, elektromanyetik ve kimyasal zenginleştirme mekanizmasının bir kombinasyonudur [86]. SERS çalışmalarında, rezonans Raman etkisi önemli rol oynar. Yüksek rezonans Raman cross-section (kesişim bölgeleri) olan moleküller SERS substratı olarak kullanılırlar. Raman saçılmasının zenginleşmesini sağlayabilmek için, SERS aktif substratlar geliştirilmiştir. SERS aktifliği 3 faktöre bağlıdır:

1.Optik geliştirmede kullanılan plazmonik nanoyapı tarafından oluşturulan elektromanyetik alan

2.İnceleme altında molekülün gerçek Raman özellikleri(kesit alan)

3.Molekülün plazmonik yüzeye afinitesi (adsorban-adsorbant ilişkisi) [86,87]

SERS, keşfedildiği günden beri kimyasal ve biyolojik moleküllerin tanısında kullanılan güçlü bir analitik yöntem olarak önemli bir ilgi çekmektedir. Özellikle metal yüzeyindeki moleküllerin oryantasyonlarından yola çıkarak yapısal farklılıklar ve konformasyonel değişikliklerin belirlenmesinde kullanılan bir tekniktir [87].

Proteinlerin yapısal ve fonksiyonel çalışmalarını araştırmak amacıyla birçok metot kullanılmaktadır. Proteinlerin tanımlanmasında genellikle proteinlerin ayrılması ve pürifikasyonu için SDS-PAGE, Western Blot, ELISA, HPLC ve kütle spektroskopisi gibi geleneksel yöntemler kullanılır. Kütle spektroskopisi parmak izi ve biyoinformatik, protein sekansları ve üç boyutlu yapılarının belirlenmesinde birlikte kullanılır. X-ray Kristallografisi ve NMR spektroskopisi protein yapıların belirlenmesinde kullanılan diğer tekniklerdir. Proteomiks çalışmalarında, yüksek verimli protein analizleri için yeni tespit metotlarının geliştirilmesi kaçınılmazdır. Birçok biyolojik metodun, zaman kaybı, büyük oranda malzeme kullanımı, verimi düşük analiz sonuçları gibi dezavantajları vardır [19,88]. Dar emisyon bantlarına sahip moleküler floroforların kullanıldığı floresans tabanlı metotların multipleks değildir. Bu yüzden tespit sınır hassasiyeti düşüktür. Buna karşın, fotostabilite ve spektral multipleks özelliklerine sahip SERS tabanlı metotların floresans tabanlı metotlara göre oldukça yüksek avantajı vardır [19,89]. Aynı zamanda kemilüminesans metotlardan daha üstündür. Protein tanımlanmasında ve protein-ligand etkileşimlerinin belirlenmesinde SERS tekniğinin üstünlüğü gösterilmiştir [89].

Protein ve diğer biyolojik moleküllerin tespitinde etiketsiz ve Raman-etiketli boyalar olarak iki farklı SERS stratejisi kullanılmaktadır. Etiketsiz stratejide SERS aktif substrat üzerindeki protein adsorbsiyonu ve proteinin titreşimine bağlı olarak doğrudan tespit edilir. Elde edilen titreşim bilgilerinden elde edilen spektrumlar standart spektrumlar ile karşılaştırılarak proteinin tanımlaması yapılır [89] . Örneğin hemoproteinler (sitokrom c, miyoglobin, hemoglobin) SERS tekniği ile iyi karakterize edilmiş yapılardır [90,91]. Diğer stratejide ise Raman etiketli boyalar

hedef proteine bağlanarak dolaylı olarak tespit edilir. Çeşitli boyaların kullanıldığı (Cy3, Cy5, DTNB) metal nanoprobalar hedef proteinin tespitinde kullanılırlar. Dolaylı metotta, hedef proteinin tespiti Raman etiketli boyalar ile yapılır [92,93] . Raman etiketli boyaların kullanıldığı dolaylı metotta, daha düşük tayin limitleri elde edilir. Dolaylı metot doğrudan metotta kıyaslandığında, gerçek ve kompleks matrikslerin analizi daha kolaydır ve daha uygun ve güvenilir bir metottur [94] .

2.3.1. SERS aktif Substratları

SERS tabanlı protein ve DNA çalışmalarında genellikle metal nanopartikül kolloidleri (gümüş, altın, bakır gibi), metal elektrotları, bu metaller kullanılarak oluşturulan ince film yüzeyleri ve protein aracılı substratlar kullanılmaktadır [19] .

2.3.1.1. Metal Nanopartiküller

Nanopartiküller, boyutları 1-100 nm arasında değişen inorganik koloidal bileşiklerdir. Sentetik veya doğal kaynaklı bir makro molekülden meydana gelirler. Nanopartiküller sahip oldukları eşsiz özelliklerden dolayı (elektron tutucu etki, geçici mıknatıslık özelliği, yüzey plazmon rezonansı gibi) çeşitli uygulama alanlarında aktif olarak kullanılmaktadırlar ve çeşitli fonksiyonlar kazandırabilmeleri nedeniyle biyolojik sistemlere kolayca entegre edilirler [95,96,97]. Nanopartikülleri bu kadar eşsiz özelliklerde kılan en çarpıcı özelliği maddelerin belli boyut aralığında hacimsel yapılarından farklı olarak olağandışı özellikler ve farklı görevler üstlenmektedirler [87]. SERS tekniğinde substrat olarak kullanılan nanopartiküllerin boyutları SERS aktivitesi için önemlidir. Metal nanopartiküllerin boyutlarına göre sahip oldukları lokalize yüzey plazmon rezonansı değişiklik gösterir ve bundan dolayı metal nanopartikül boyutu ve SERS aktiviteleri arasında güçlü bir ilişki bulunmaktadır [98,99]. Yapılan çalışmalarda, boyutları 11 nm'den daha küçük olan nanopartiküller zayıf SERS aktivitesi gösterirken, daha büyük boyutlara (43 -97 nm) sahip olanlar daha güçlü SERS aktivitesi gösterirler [100]. Güçlü SERS sinyalleri elde edebilmek için uygun nanopartikül boyutlarının ve yüzey plazmon rezonansını uyarmak için gerekli eksitasyon dalga boyunun seçilmesi gerekir [87].

SERS substratı olarak kullanılan metal nanopartiküller çözelti ortamında sentezi için çeşitli metotlar (elektrokimyasal sentez, kimyasal indirgenme gibi) geliştirilmiştir. SERS çalışmaları tipik olarak metal iyonlarının kuvvetli bir indirgeyici

reaktif eşliğinde metalik nanopartiküllere indirgenmesine dayanır [87]. Tipik kimyasal indirgenme ajanı olarak sodyum bor hidrür [101], sodyum sitrat [102], hidrazin [103] ve hidroksi amin hidroklorür [104,105] kullanılır. İndirgenme işlemi hem sulu hem de organik çözücü içeren ortamlarda yapılabilmektedir [106]. Örneğin sodyum sitratın indirgeyici ajan olarak kullanıldığı yöntemde 20-100 nm boyutunda küresel nanopartikülleri sentezlenirken [107], sodyum bor hidrürün indirgeyici ajan olarak kullanıldığı yöntemde 25 nm'nin altında küresel nanopartiküller sentezlenir [108] .

Elektrokimyasal sentez ise katı yüzeyler üzerinde inorganik depozitler oluşturmak için kullanılan bir metottur. Element haldeki metalin, okside olmasını ve çözeltiliye geçen metal iyonlarının katotta indirgenmesidir [109] .

SERS substratı olarak kullanılan küresel nanopartiküller dışında farklı şekillere sahip (küp, prizma, çubuk gibi) nanopartiküller de sentezlenir. Bu nanopartiküllerin şekilleri reaksiyon koşulları ve kullanılan yüzey aktif ajana bağlı olarak değişir. Metal nanopartiküllerin keskin bir kenar ve açığa sahip olması güçlü bir SERS etkisi göster. Sahip oldukları bu özellik 'lighting rod effect' olarak tanımlanır. Yapılan çalışmalarda, anizotropik nanopartiküllerin küresel nanopartiküllere kıyasla daha güçlü sinyal artırıcı etkileri bulunmaktadır. Çeşitli şekillere sahip nanopartiküllerin sentezi tipik olarak çekirdek yönlendirmeli büyüme yöntemi ile gerçekleştirilmektedir. Şimdiye kadar gümüş ve altın nanoçubuklar [110,111] ve dallanmış metal nanoçiçekler [112] çekirdek yönlendirmeli büyüme yöntemi ile sentezlenir ve SERS aktif substrat olarak kullanılırlar. Altın nanoçubuklar deneysel çalışmalarda en yaygın kullanılan örnekleridir [113]. Altın nanoçubuklar farklı boy oranlarına sahiptirler. Bu özellikleri sentezinde önemli bir rolü bulunan $AgNO_3$ konsantrasyonu ile kontrol altında tutulur. Altın nanoçubuklar hem enlemesine hem de boylamasına yüzey plazmon rezonansına sahiptirler. Sahip oldukları geometrik asimetri ve boyuna şekilleri sayesinde güçlü bir absorpsiyon bandına sahiptirler. Bu özellikleri sayesinde SERS aktivitesi belirlenir [114].

2.3.1.2. Metal Elektrotlar

Pürüzlendirilmiş metal elektrotlar, oksidasyon-redüksiyon tepkimeleri ile sentezlenirler ve hedef proteinlerin tanımlanmasında SERS substratı olarak kullanılırlar [19,115]. Gümüş elektrot yüzeyleri moleküllerin tek tabaka halinde düzenlenmesi (SAM) ile kaplanır. Metal elektrot yüzeylerinde SAM oluşturulması işlemi için genellikle kimyasal olarak SERS aktif molekül olan karboksilat (CO₂⁻) kullanılır [116].

2.3.1.3. İnce Film Yüzeyleri

İnce film yüzeyleri, genellikle vakum ortamında elektron demetiyle buharlaştırma yöntemi kullanılır. Sentezlenen gümüş ince film yüzeylerine proteinlerin adsorbsiyonu ile modifiye edilmiş ince film yüzeyleri hazırlanır [117].

2.3.1.4. Protein aracılı Substratlar

Biyokimyada, proteinlerin tanımlanmasında gümüş boyama en çok kullanılan radyoaktif olmayan metottur. Gümüş boyama tekniği jel elektroforezi ile ayrılan proteinlerin tanımlanmasında Coomassie “brilliant blue” parlak mavisi boyamasına göre 100 kat daha hassastır. Proteinlerin gümüş ile boyanmasında, gümüş iyonları proteinlerin yapısında bulunan aminoasit zincirlerine (COO⁻, -SH) bağlanarak indirgeyici ajanlar (sitrik asit, formaldehit veya fotoindirgeme) yardımıyla serbest metalik gümüşe indirgenir.

Yapılan pek çok SERS çalışmasında öncelikle SERS aktif substratı sentezlenir ve daha sonra hedef molekül substrata bağlanır. Gümüş ile boyamada, gümüş nanopartikülleri immobilize hedef proteinler ile adsorbe olur. Bu adsorbsiyon olayı hidrofobik, elektrostatik ve kovalent etkileşimler sayesinde gerçekleşir. Gümüş nanopartiküllerin agregasyonu ile güçlü sinyal üreten SERS substratları elde edilir [19].

3. Materyal ve Metot

3.1. Materyal

3.1.1. Kimyasallar ve Biyokimyasallar

Eritropoetin BRP3 standardı EDQM (Europe), Monoklonal Fare IgG2A Klon # AE7A5 insan eritropoetin Antikoru R&D Systems (Minneapolis, US), insan idrar eritropoetin (uEPO) 2nd international standards NIBSC 67/343 (WHO, UK), Hidrojen tetraklorat (HAuCl₄), heksadesiltrimetil amonyum bromit (CTAB), L-askorbik asit (AA), 11-merkaptandekanoik asit (11-MUA), %98 etanolamin, N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimit hidroklorit (EDC), demir (III) klorit (FeCl₃), 2-(N-morfolino) etansülfonik asit monohidrat (MES), etilen diamin tetra asetik asit (EDTA) disodium tuzu, Fosfat Tamponu (PBS), hidroksilamin hidroklorür, sığır serum albümini (BSA), Trisma Base, α 1-Antikimotripsin (ACT), α -2-HS-Glikoprotein (HSG), Tamm-Horsfall protein (THP), tween 20, altın kaplı metal yüzeyler (0.1 mm, 99.99 %), sodyum dodasil sülfat (SDS), sodyum N-Lauroylsarcosinate (SAR), Tris-HCL, 1,4 DL-Dithiotreitol (DDT), gliserol, 4-Morpholinopropanessulfonic Asit (MOPS) ve fenol kırmızısı Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Almanya and Saint Louis, USA), mutlak etanol, gümüş nitrat (AgNO₃), demir sülfat penta hidrat (FeSO₄.7H₂O), sodyum borhidrit (NaBH₄), perklorik asit (HClO₄), 37%'lik hidroklorik asit (HCL), 99% asetik asit, Durapore membran ve Immobilon-P transfer membran Merck (Darmstadt, Almanya), 5,5-Dithiobis (2-nitrobenzoik asit) (DTNB) ve L-alanin Acros (Morris Plains, NJ ABD), Sodyum Hidroksit (NaOH) J.T. Baker (Deventer, Hollanda), N-Hidroksisülfosüksinimid sodium tuzu (NHS) Pierce Biotechnology (Bonn, Almanya), Steriflip-GP, 0.22 μ m, polyethersulfone (PES) Millipore (Billerica MA, USA), %10'luk bis-tris mini jel, lityum dodasil sülfat numune tamponu (LDS), indirgeyici ajan (10X), moleküler markır, poliklonal ikincil antikor ve strepdauidin peroksidaz ve kemilüminesans reaktif Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), antioksidant Life Technologies (Carlsbad, CA, USA), yağsız süt tozu, Lyphochek Quantitative Urine Control, Level 1, Normal ve elektrot transfer kağıtları Biorad (Hercules, CA, USA), firmasından sağlanmıştır.

3.1.2. Kullanılan Çözeltiler

Hidrojen tetrakloro Altın (III) (HAuCl_4) çözeltisi; HAuCl_4 stok çözeltisinden 35 μL , 5 mL'lik balon jojeye aktarıldı ve üzeri 5 mL'ye deiyonize su ile tamamlanarak 0.01M HAuCl_4 çözeltisi hazırlandı.

Sodyum Borhidrid (NaBH_4) çözeltisi; 3.8 mg katı NaBH_4 tartılarak ,10 mL soğutulmuş deiyonize su içerisinde çözülerek 0.01M NaBH_4 çözeltisi hazırlandı.

Askorbik Asit Çözeltisi; 88 mg katı askorbik asit tartılıp, 5mL deiyonize su içerisinde çözülerek 0.05M askorbik asit çözeltisi hazırlandı.

Gümüş nitrat (AgNO_3) Çözeltisi; 8,45 mg katı AgNO_3 tartılıp, 5mL deiyonize su içerisinde çözülerek 0.01M AgNO_3 çözeltisi hazırlandı.

Hekzadesiltrimetil-amonyum bromür (CTAB) çözeltisi; 920 mg katı CTAB tartılıp, 25mL deiyonize su içerisinde çözülerek 0.1M CTAB çözeltisi hazırlandı.

PBS tamponu; 1 tane PBS tableti 200 mL deiyonize su ile çözülerek pH 7.4 fosfat tamponu hazırlandı.

PBST tamponu; Hazırlanan PBS tamponu (pH 7.4) üzerine %1 (v/v) oranında Tween 20 eklendi.

MES tamponu;975 mg katı MES tartılıp, 50mL deiyonize su içerisinde çözülerek 0.05 M MES tamponu hazırlandı. MES tamponu pH 6.5' e 1M NaOH çözeltisi ile ayarlandı. EDC/NHS çözeltisi (100 mM EDC ve 100 mM NHS) MES tamponunda hazırlanmıştır.

FeCl_3 ve FeSO_4 çözeltisi; 1.728 gr katı FeCl_3 (1,28 M) ve 0,89 gr FeSO_4 (0,64M) tartılıp 5 mL deiyonize su içerisinde çözülerek hazırlandı.

EDTA çözeltisi; 1gr katı EDTA tartılıp, 10mL 1M NaOH çözeltisi içerisinde çözülerek EDTA çözeltisi hazırlandı.

MUA çözeltisi; 0,16 gr katı MUA tartılıp, 5mL mutlak etanol ile çözülerek 150 mM MUA çözeltisi hazırlandı.

3.75 M Tris HCL pH7.4 Tamponu; 45.4 gr Tris Base tartılıp. 40mL deiyonize su içerisinde çözüldü. Üzerine 20 mL %37'lik HCL eklenerek pH 7.4'e ayarlandı.

SDS Yürütme Tamponu(1X); 6 gr Trisma Base, 14.4 gr Glisin ve 2 gr SDS tartılıp 2000 mL deiyonize su içinde çözöldü.

TE 10X Tamponu; 60.6 gr Trisma Base, 288.2gr Glisin tartılıp, 1000 mL deiyonize su içinde çözöldü. Toplam hacim 2000 mL'ye tamamlandı.

SDS Transfer Tamponu(1X); 200 mL TE10 X tamponundan alınıp, üzerine 400 mL Metanol eklendi. Toplam hacim 2000 mL'ye deiyonize su ile tamamlandı.

%5 Süt Çözeltisi; 5 gr katı yağsız süt tozu tartılıp, 100 mL PBS pH 7,4 tampon çözeltisinde çözöldü.

%0.7 Asetik Asit Çözeltisi; 950 mL deiyonize su üzerine 7 mL Asetik asit eklendi. Toplam hacim 1000 mL'ye tamamlandı.

Bovin Serum Albumin (BSA)- PBS Çözeltisi pH7.4; 2.5 mg katı BSA tartılıp, 50 mL PBS pH 7.4 tampon çözeltisinde çözölerek %0.005 BSA çözeltisi hazırlandı.

Etanolamin-Alanin Çözeltisi; 20 mg katı alanin tartılıp, 5 mL'lik balon jøjeye aktarıldı ve 2 mL PBS pH 7.4 tampon çözeltisinde çözöldü. Üzerine etanolamin stok çözeltisinden 500 µL eklendi. Toplam hacim 5 mL'ye deiyonize su ile tamamlanarak etanolamin (10 %, v/v)-alanin (4 mg mL⁻¹) çözeltisi hazırlandı.

Tüm çözeltilerin hazırlanmasında analitik saflıkta kimyasal maddeler, Milli-Q kalite su (18 MΩcm) ve kalibre edilmiş laboratuvar cam malzemeleri kullanılmıştır.

3.1.3. Kullanılan Cihaz ve Gereçler

Deneyler sırasında; DeltaNu Examiner Raman Mikroskop (Deltanu Inc. Laramie, WY, A.B.D.) 785 nm lazer kaynağı, mikroskop için hareketli lamel (numune tutma) haznesi ve CCD dedektör kullanılmıştır. Cihaz parametreleri ise 20X objektif ve yaklaşık 30 µm lazer spot alanı, 150 mW lazer gücü ve 60 sn veri toplama süresi olarak ayarlanmıştır. Ayrıca UV spektroskopisi cihazı (Agilent Technologies, Inc., CA, USA), Santrifüj cihazı (MiniSpin® plus , Eppendorf, Hamburg · Germany), Ultasonik banyo cihazı (Bandelib Sonorez) ,Hassas terazi (Shimadzu), deiyonize su cihazı (Millipore Simplicity 185), SEM analiz cihazı (JSM-6400), Dikey Elektroferez Tankı (Biorad), Blotting Cihazı (Semi Dry Blot, Biorad), Kemilüminesans kamera (EpoCAM, Seibersdorf, Austria),pH metre (SX-610 PEN Type) , Mikropipet (1-10,10-200,100-1000µL, 0.5-5 mL).

3.2. Metot

3.2.1. Nanopartiküllerin Sentezlenmesi

3.2.1.1. Manyetik Nanopartiküllerin Sentezi

Yaptığımız çalışmada, manyetik özelliğe sahip küresel demir nanopartiküller sentezlendi. Fe^{+3} ve Fe^{+2} karışımı kullanılarak oda koşullarında, demir iyonlarının bazik hidroliz reaksiyonu düzeneği ile manyetik nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentez işlemine 1.28 M $FeCl_3$ ve 0.64 M $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 5mL deiyonize su içerisinde çözüldükten sonra demir tuzları çözünene kadar şiddetli bir şekilde 2 dakika karıştırılarak başlanmıştır. Daha sonra karışım üzerine 25 mL 1M NaOH çözeltisinden 40 dakika boyunca damla damla ilave edilmiştir. Karıştırma işlemine inert bir gaz olan azot gazı altında 4 saat devam edilmiştir. NaOH eklenmesiyle oluşan demir tuzlarının ileri derecede yükseltgenmesini önlemek için reaksiyon azot gazı atmosferinde gerçekleştirilmiştir. Elde edilen demir tuzları 4000 rpm de 5 dakika santrifüjlenmiştir. Bu işlem üç defa yapıldıktan sonra demir tuzları üzerine 5 mL 2 M $HClO_4$ çözeltisi konularak oda koşullarında 24 saat bekletilmiştir. Daha sonra oluşan açık kahverengi renkli demir nanopartikülleri içeren çözelti üç defa santrifüjlenerek (10.000 rpm de 20 dakika) fazla miktardaki asitin uzaklaşması sağlanmıştır. Oluşan demir hidroksit tuzlarının kontrollü bir şekilde yükseltgenmesiyle kendiliğinden manyetik özellik gösteren demir nanopartiküller (Fe_3O_4) oda koşullarında elde edilmiştir [118].

3.2.1.2. Küresel Yapıda Altın Kaplı Fe_3O_4 Nanopartiküllerin Sentezi

Manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 (çekirdek) nanopartikülleri Au kabuk kaplama işlemi için 10 mg Fe_3O_4 nanopartiküller tartılarak 5 mL deiyonize suda çözüldü ve iyice karışması sağlandı. Bu yeni çözelti üzerine 5mL 0.01M EDTA çözeltisi eklendi ve ultrasonik banyoda 2 saat boyunca bekletilerek bileşenlerin karışması sağlanmıştır. Daha sonra süspanse edilen çözelti 10.000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant atıldıktan sonra nanopartiküller mıknatıs yardımıyla 3 kez deiyonize su ile yıkanmıştır. Çökelti üzerine sırasıyla; 7 mL 0,1M CTAB, 3 mL 0.01M $HAuCl_4$ çözeltisi ve 300 μ L 1M NaOH eklenmiştir. Her çözeltinin eklenme aşamasında ultrasonik banyoda karıştırma işlemi gerçekleştirilmiştir. Yeni çözelti üzerine 150 mg hidroksilaminklorür eklenmiştir ve şiddetli bir şekilde 3 dakika karıştırılmıştır. Elde edilen şarap kırmızı renkli altın kaplı manyetik nanopartiküller kullanmadan önce 24 saat bekletilmiştir [119].

3.2.1.3. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubuk Sentezi

Senteze ilk olarak yaklaşık 3-4 nm boyutta altın nanopartiküllerden oluşan çekirdek çözeltisinin hazırlanmasıyla başlanılmıştır. Çekirdek çözeltisi için, sırasıyla 7,5 mL 0,1 M CTAB, 250 µL 0.01 M HAuCl₄ çözeltisi eklenmiştir. Hazırlanan çözelti üzerine 600 µL 0,01 M NaBH₄ buz banyosunda hazırlanmış NaBH₄ çözeltisi ilave edilmiştir. Yeşil çay renginde meydana gelen çözelti, kullanılabilir çekirdek partiküller elde etmek amacıyla buz banyosunda 30 dk. bekletilmiştir. Altın nanoçubukları sentezlemek için bir tüp içerisine sırasıyla 4.75 mL 0.1 M CTAB, 1 mL 0,01 M HAuCl₄, 60 µL 0.01 M AgNO₃ çözeltisi eklenmiştir. Koyu turuncu renkteki çözelti üzerine 250 µL 0,01 M AA çözelti ilave edilmiştir. AA çözeltisi eklenmesiyle koyu turuncu renk kaybolmuştur. Hazırlanan büyüme çözeltisi üzerine 5 µL çekirdek çözeltisi eklenilmiştir ve şiddetli bir şekilde karıştırıldıktan sonra 3 saat boyunca 30°C su banyosunda bekletilmiştir. Çözeltinin rengi şeffaflıktan lacivert renk tonuna doğru değişmiştir [120].

3.2.1.4. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Sentezlenen demir nanopartiküllerinin ve altın nanoçubukların karakterizasyonu için geçişli Elektron Mikroskobu (TEM) ve UV-görünür bölge moleküler absorpsiyon spektroskopisi kullanılmıştır.

3.2.1.5. Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

3.2.1.5.1. Manyetik Nanopartiküllerin Yüzey Modifikasyonu

Tasarlanan homojen sistemde eritropoetin analiz matriksinde immunopürifikasyonunu gerçekleştirebilmek için nanopartiküllerin yüzeylerinde antikörlerin bağlanabilmesine yönelik karboksil gruplarının oluşturulması ve yüzeyde açık yerlerin kapatılması gerekmektedir. Manyetik demir altın nanopartiküllerin yüzeyinde kendiliğinden düzenlenen tabaka (SAM) oluşturulması işleminden önce nanopartiküllerin yüzeylerinde bulunan CTAB'ı uzaklaştırmak için bir mıknatıs yardımıyla partiküller bir araya getirilip sıvı kısım uzaklaştırılmış ve yıkama işlemi 3 defa tekrar edilmiştir. Daha sonra 5 mL etanol içinde 150 mM 11-merkaptodekanoik asit (11-MUA) hazırlanmıştır. Modifikasyon için hazırlanan 11-MUA çözeltisi içerisine yıkanan nanopartiküller aktarılmıştır. Manyetik nanopartiküller, yüzeyinde SAM işleminin oluşması için 18 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. 11-MUA'nın fazlasını uzaklaştırmak için bir mıknatıs yardımıyla

partiküller önce 2 kez etanol daha sonra 50 mM 2-(*N*-morfolin) etansülfonik asit (MES, pH 6.50) tampon ile yıkanmıştır. Partiküller yüzeyinde meydana gelen SAM işlemi sonrasında serbest halde bulunan karbonil grupları ile bu gruplar üzerine gönderilen amin gruplarının kovalent bağ oluşturabilmesi için MES tamponu içerisinde hazırlanan 0.1M EDC-0.1M NHS ile 1 saat muamele edilmiştir. İşlem sonrasında nanopartikül yüzeyinde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Yıkama işlemi sırasında ilk olarak manyetik nanopartiküller mıknatıs yardımıyla toplanmıştır ve üstteki berrak sıvı atılmıştır. Daha sonra PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez yıkanmıştır.

3.2.1.5.2. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların Yüzey Modifikasyonu

Manyetik özellik göstermeyen nanoçubukların yüzey modifikasyonunda, SERS sinyali takibi için uygun olan DTNB kullanılmıştır. Nanoçubukların yüzeyinde SAM oluşturulması işleminden önce yüzeylerinde bulunan CTAB'ı uzaklaştırmak için nanoçubuklar 10.000 rpm de 10 dakika santrifüj edilmiştir ve üstteki sıvı atılmıştır. Partiküller etanol içerisinde dağıtılmıştır ve tekrar santrifüj edilmiştir. Bu işlem 3 kez tekrar edilmiştir. Yüzeyde SAM oluşturmak için, nanoçubuklar etanol kullanılarak hazırlanan 50 mM (5,5'-dithiobis-(2- nitrobenzoik asit) (DTNB) ile 24 saat oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra nanoçubuklar önce 2 kez etanol daha sonra 1 kez 50 mM 2-(*N*-morfolin) etansülfonik asit (MES, pH 6.50) tamponu ile yıkanmıştır. Yüzeyde bulunan karboksil grupların aktivasyonu için MES tamponu içerisinde hazırlanan 0.1M EDC-0.1M NHS ile 1 saat muamele edilmiştir. Yüzey modifikasyonu yapılan nanoçubuklar santrifüj (10.000 rpm, 10 dk.) edilerek yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi PBS tamponu (pH 7.4) ile 3 kez tekrar edilmiştir.

3.2.1.5.3. Nanopartikül Yüzeyine Antikoron İmmobilizasyonu

Planlanan çalışma kapsamında sentezlenen manyetik nanopartiküller ve manyetik olmayan nanoçubuklar yüzeyinde aktifleştirilen karbonil grupları üzerinden hedef proteini analiz ortamında seçici bir şekilde izole edebilmek için antikoron bağlanması gerekmektedir. Eritropoetin izolasyonu için monoklonal fare IgG2A Klon # AE7A5 insan eritropoetin antikoru kullanılmıştır. PBS tamponu içerisinde hazırlanan 20 µg/mL derişiminde antikor dilüsyonu yapılmıştır. Sentezlenen partiküller ve nanoçubuklar, hazırlanan antikor dilüsyonu ile +4C⁰'de karıştırıcı üzerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün bağlanmayan antikoru uzaklaştırmak

için manyetik nanopartiküller mıknatıs kullanılarak, nanoçubuklar ise santrifüj edilerek PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez yıkanmıştır.

3.2.1.6. Altın Kaplı Metal Yüzey Modifikasyonu

Tasarlanan heterojen sistemde eritropoetinin analiz matriksinden izolasyonunu gerçekleştirebilmek için altın yüzeylerinde antikorların bağlanabilmesine yönelik karboksil gruplarının oluşturulması ve yüzeyde açık yerlerin kapatılması gerekmektedir. Altın yüzeylerinde kendiliğinden düzenlenen tabaka (SAM) oluşturulması işleminden önce yüzeyler 30 dakika boyunca pirana çözeltisinde bekletilmiştir. Daha sonra bol su ve alkol ile yıkanmıştır. Temizlenen yüzeyler kurutulduktan sonra etanol içinde hazırlanan 150 mM 11-merkapto undekanoik asit (11-MUA) çözeltisi içinde oda sıcaklığında 24 saat bekletilmiştir. Bu işlem sonunda altın yüzeylerde kimyasal olarak fonksiyonel grupların (karboksil grupları) bağlanması sağlanmıştır. 11-MUA'nın fazlasını uzaklaştırmak için yüzeyler su ve 50 mM 2-(*N*-morfolin) etansülfonik asit (MES, pH 6.50) tampon ile yıkanmıştır. Altın yüzeylerinde oluşturulan SAM işlemi sonrasında serbest halde bulunan karbonil grupları ile bu gruplar üzerine gönderilen amin gruplarının kovalent bağ oluşturabilmesi için MES tamponu içerisinde hazırlanan 0.1M EDC-0.1M NHS ile 1 saat muamele edilmiştir. İşlem sonrasında altın yüzeylerinde amin reaktif NHS esterleri oluşturulmuştur. Daha sonra altın yüzeyler su ve PBS tamponu (pH 7,4) ile 3 kez yıkanmıştır.

3.2.1.6.1. Altın Kaplı Metal Yüzeyine Antikorum İmmobilizasyonu

Planlanan çalışma kapsamında altın yüzeyler üzerinde aktif hale getirilen karbonil grupları üzerinden hedef proteini analiz ortamında seçici bir şekilde izole edebilmek için antikorum bağlanması gerekmektedir. Eritropoetin izolasyonu için monoklonal fare IgG2A Klon # AE7A5 insan eritropoetin antikoru kullanılmıştır. PBS tamponu içerisinde 20 µg/mL derişiminde antikor dilüsyonu hazırlanmıştır. Modifikasyonu yapılan altın yüzeyler, hazırlanan antikor dilüsyonu ile +4C⁰'de karıştırıcı üzerinde 24 saat inkübe edilmiştir. Ertesi gün bağlanmayan antikoru uzaklaştırmak için altın yüzeyler PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez yıkanmıştır.

3.2.1.7. Optimizasyon Çalışmaları

3.2.1.7. 1. Antikor Derişiminin Belirlenmesi

İmmunomanyetik ayırımın etkinliğini etkileyecek uygun antikor derişimini belirleyebilmek için farklı derişimlerde (10, 20 ve 40 µg/mL) antikor dilüsyonları hazırlanmıştır. Optimum antikor derişimini belirlemek için 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi yüzeyi antikor ile kaplanmış nanopartiküller ve altın plakalar farklı antikor dilüsyonları ile etkileştirilmiştir ve DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır.

3.2.1.7.2. rEPO ve Antikor Etkileşim Süresinin Belirlenmesi

Optimum etkileşim süresini belirleyebilmek için 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi yüzeyi antikor ile kaplanmış nanopartiküller ve altın plakalar farklı zamanlarda (30, 60, 120 dk.) etkileştirilmiştir ve DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır.

3.2.1.8. Seçici Olmayan Bağlanmaların Önlenmesi

3.2.1.8. 1. Seçici Olmayan Bağlanmaların Bloklama Ajanları ile Önlenmesi

Homojen ve heterojen sandviç sistemlerinde kullanılan altın yüzeyler ve altın kaplı manyetik küre partiküller ile altın çubuk partiküller arasında seçici olmayan etkileşimlerin gerçekleşmemesi için yüzeylerinde açıkta kalan grupların bloklama ajanları ile kapatılması gerekmektedir. Planlanan çalışma kapsamında yüzeylerin bloklanması için farklı bloklama ajanları ile farklı denemeler yapılmıştır. Bloklama ajanı olarak BSA, yağsız süt, etanolamin ve alanin seçilmiştir.

İlk çalışmada antikor bağlı yüzeyler %1BSA, %1yağsız süt ve %1etanolamin ile bloke edilmiştir. Daha sonra ortamda kör çözeltisi (hedef analitin bulunmadığı PBS tamponu) kullanılarak iki partikül ve altın yüzey ile altın nanoçubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir. Homojen sistemde partiküller mıknatıs kullanılarak birbirinden ayrılmıştır. Heterojen sistemde ise yüzeyler ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilmiştir. Yıkama işlemi yine PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yapılmıştır. Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır.

İkinci çalışmada bloklama ajanları ile ilgili denemelere devam edilmiştir. Bloklama ajanı olarak %10 etanolamin -4 mg/mL alanin karışımı kullanılmıştır. Bloklama

etkinliğini karşılaştırmak amacıyla bloke edilmemiş partiküller ve altın yüzeyler kullanılmıştır. Daha sonra ortamda kör çözeltisi kullanılarak iki partikül ve altın yüzey ile altın nanoçubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir. Homojen sistemde partiküller mıknatıs kullanılarak birbirinden ayrılmıştır. Heterojen sistemde ise yüzeyler ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilmiştir. Yıkama işlemi yine PBS - %0.05 Tween 20 tamponu ile yapılmıştır. Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır.

Üçüncü çalışmada %10 etanolamin-4 mg/mL alanin karışımı bloklama ajanı kullanılması durumunda bloklama süreleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. %10 etanolamin -4 mg/mL alanin karışımı farklı sürelerde (0 dk,30 dk,1 saat,2saat ve 3 saat) partikül ve altın plaka yüzeyleri ile etkileştirilmiştir. . Daha sonra ortamda kör çözeltisi kullanılarak nanopartikül ve altın yüzeyleri ile altın nanoçubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir. Homojen sistemde partiküller mıknatıs kullanılarak birbirinden ayrılmıştır. Heterojen sistemde ise yüzeyler ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilmiştir. Yıkama işlemi yine PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yapılmıştır. Bloklama süresinin etkinliği, DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri ile kontrol edilmiştir.

3.2.1.8. 2. Seçici Olmayan Bağlanmaların Yıkama Prosedürleri ile Önlenmesi

Spesifik olmayan etkileşimleri gidermek amacıyla yüzeyine antikor bağlı antikor nanopartiküller ve altın plaka yüzey ile rEPO etkileşimi sonrasında yüzey aktif maddelerle yıkama işlemi yapılmış ve yıkama sayılarının spesifik olmayan etkileşimler üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla yıkama çözeltisi olarak literatür verilerine dayanarak -%0.05'lik Tween 20 içeren PBS (PBST) tamponu hazırlanmıştır. Daha sonra ortamda kör çözeltisi ve 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi kullanılarak antikor bağlı nanopartikül ve altın yüzeyleri ile altın nanoçubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir. Farklı sayılarda PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmış ve yıkama sayısının etkinliği, DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri ile kontrol edilmiştir.

3.2.1.9. Hedef Analitin Manyetik Partikül ve Altın Metal Plaka Yüzeylerine

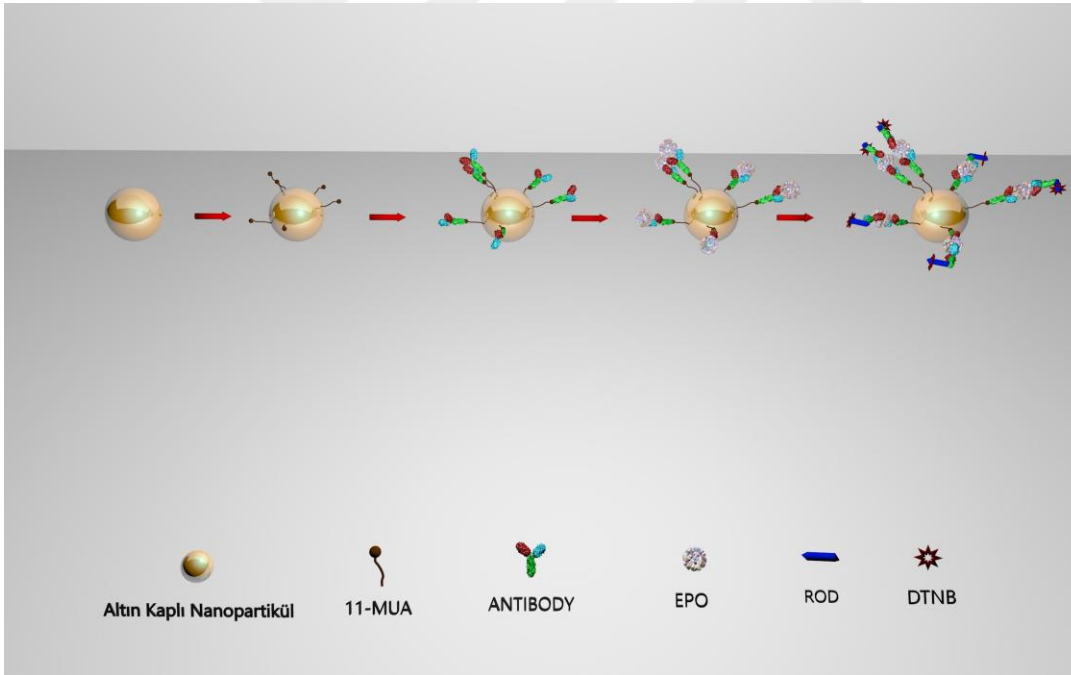
Bağlanması

Yüzeyi antikor ile kaplanmış manyetik nanopartiküller ve altın plakalar, PBS tamponu içerisinde ardışık dilüsyonları (~0, 0,1, 1, 10, 100, 1000, 10000 pg/mL)

hazırlanmış rekombinant eritropoetin (rEPO) standartları ile oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bağlamayan rekombinant eritropoetin ortamdan uzaklaştırmak için 4 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmıştır. Yıkama işlemi sırasında manyetik partiküller için mıknatıs kullanılırken, altın metal yüzeyler ultrasonik banyoda 10 saniye bekletilmiştir.

3.2.1.10. Homojen Sandviç Sistemi için Yapının Tamamlanması

Şekil 3.1’de şematize edilen homojen immunoanaliz sisteminde modifiye edilen altın manyetik nanopartiküller ve hedef analit (rEPO) yapısı modifiye edilmiş nanoçubuklar ile oda sıcaklığında 1saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bağlanmayan nanocubukları ortamdan uzaklaştırmak için 4 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile manyetik yıkama yapılmıştır. Daha sonra partiküller 100 µL PBS tamponu içinde dağıtılmıştır ve bu çözeltiden 10 µL TLC kâğıt üzerine damlatılarak, yüzeylerde SERS ölçümü için sinyaller takip edilmiştir.

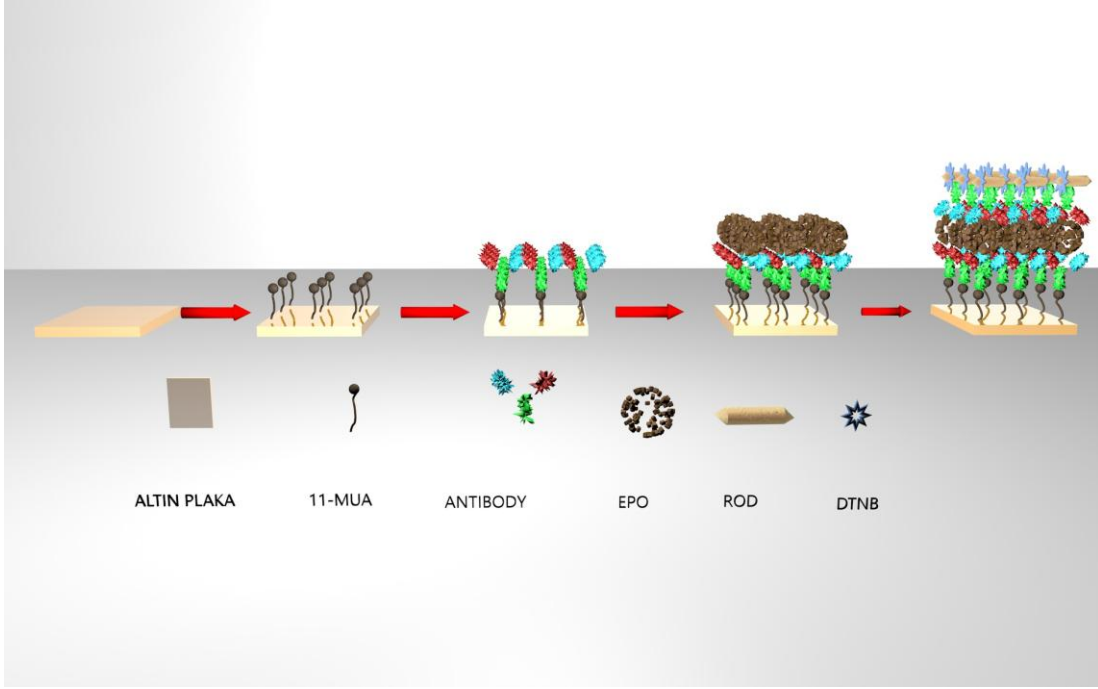


Şekil 3.1. Homojen sandviç sisteminde rekombinant eritropoetin analizi

3.2.1.11. Heterojen Sandviç Sistemi için Yapının Tamamlanması

Şekil 3.2’ de şematize edilen heterojen immunoanaliz sisteminde modifiye edilen altın metal yüzeyler ve hedef analit (rEPO) yapısı modifiye edilmiş nanoçubuklar ile oda sıcaklığında 1 saat inkübe edilmiştir. Bu süre sonunda bağlanmayan

nanocubukları ortamdan uzaklaştırmak için 4 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmıştır. Daha sonra altın metal yüzeyler oda sıcaklığında kurumaya bırakılmış ve yüzeylerde SERS ölçümü için sinyaller takip edilmiştir.



Şekil 3.2. Heterojen sandviç sisteminde rekombinant eritropoetin analizi

3.2.1.12. Tasarlanan Sistemlerin Kontrolü

Tasarlanan sistemlerin kontrolü için biorad lyphocheck kontrol idrar örneklerine uygulanarak eritropoetin analizi test edilmiştir. İlk olarak nanopartikül ve metal yüzeylerine bağlanan antikorun hedef analit ile etkileşimi girebilmesi için ortam pH'nın pH 7.4 ayarlanması gerekmektedir. Bu yüzden idrar örneklerinin pH' 7.4 'e, 3.75 M Tris HCL tamponu kullanılarak ayarlanmıştır. Daha sonra biorad lyphocheck orijinli kontrol idrar örneklerine farklı derişimlerdeki (0.1, 1, 5, 10, 100, 1000 pg/mL) rEPO standartları eklenmiştir. Ayrıca kör olarak endojen eritropoetin (uEPO) içeren aynı kaynaklı idrar örnekleri kullanılmıştır. Yukarıda açıklanan prosedürler idrar numunelerine uygulanmıştır ve SERS sinyalleri ölçülmüştür. Eritropoetin konsantrasyonundaki değişime paralel SERS sinyali ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

3.2.1.13. Kontrol Deneyle

3.2.1.13.1. Validasyon Deneyle

Validasyon çalışmalarında yöntemlerin doğruluğunu ve kesinliğini tespit edebilmek amacıyla biorad orijinli kontrol idrar rneklelerine 0,1, 1 ve 5 pg /mL rEPO eklenmiştir ve 4 gün aynı koşullarda analiz tekrar edilmiştir. Ayrıca idrardaki endojen ve rekombinant eritropoetin ayırımını gösterebilmek için pozitif ve negatif kontrol için biorad orijinli kontrol idrar rnekleleri kullanılmıştır. Üç farklı derişimde uEPO içeren idrar rnekleleri iki kısıma ayrılmıştır. Numunenin ilk kısmı direk olarak analiz edilmiştir. İkinci kısmına ise 1 pg /mL rEPO eklenmiş ve analiz edilmiştir. Analiz sonucunda elde edilen SERS sinyali ile validasyon parametreleri değerlendirilmiştir.

3.2.1.13.2. Antikor Seçiciliğinin Belirlenmesi

Tasarlanan sistemlerin hedef proteini yakalayabilmesi için proteine özgü antikor kullanılmaktadır. Seçilen antikor eritropoetin molekülünün ilk 26 amino asit epitopunun N-terminal bölgesinden bağlanır. Bu yüzden antikor seçiciliğini kontrol etmek amacıyla idrar matriksinde bulunan benzer epitoplara sahip proteinler (α -1-Antikimotripsin (ACT), α -2-HS- Glikoprotein (HSG), Tamm-Horsfall protein (THP)) ve protein yapısında olmayan üre seçilmiştir. PBS tamponu içerisinde hazırlanmış 100 pg /mL konsantrasyonlarındaki ACT, HSG, THP ve üre ile sandviç yapı oluşturulmaya çalışılmıştır. Analiz sonucunda elde edilen SERS sinyali ile antikor seçiciliği test edilmiştir.

3.2.1.13.3. Eritropoetin İmmunoprifikasyonu

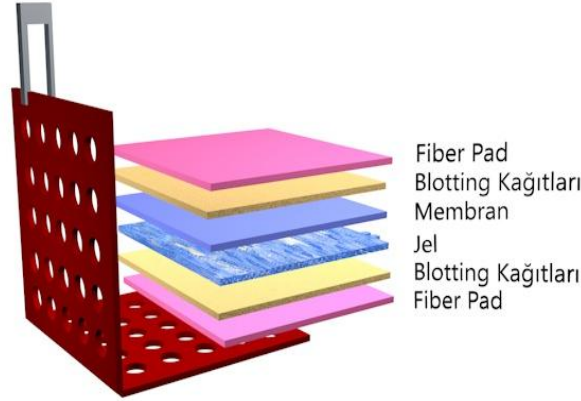
Protein İmmunoprifikasyonu, biyolojik matrikslerden tek bir tip proteini izole etmek için gerekli olan bir süreçtir. Planlanan alışma kapsamında kompleks idrar matriksinden eritropoetini düşük miktarlarda dahi yakalayabilmek için sentezlediğimiz manyetik nanopartiküller kullanılmıştır. Manyetik nanopartikül yüzeyler üzerinde aktif hale getirilen karbonil grupları üzerinden hedef proteini analiz ortamında seçici bir şekilde izole edebilmek için antikorun bağlanması gerekmektedir. Eritropoetin izolasyonu için monoklonal Fare IgG2A Klon # AE7A5 insan eritropoetin antikorunu kullanılmıştır. PBS tamponu içerisinde 20 μ g/mL derişiminde antikor dilüsyonu yapılmıştır. Modifikasyonu yapılan nanopartikül yüzeyleri, hazırlanan antikor dilüsyonu ile +4C⁰de karıştırıcı üzerinde 24 saat

inkübe edilmiştir. Bağlanmayan antikorun 3 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile manyetik yıkama ile uzaklaştırılmasından sonra manyetik nanopartiküllerin yüzeydeki seçici olmayan bölgeler %10 etanolamin-4 mg/mL alanin karışımı kullanılarak 1 saat etkileştirilerek açıkta kalan karbonil gruplarının kapatılması sağlanmıştır. Bu işlem sonunda manyetik nanopartiküller 4 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra yüzeyi antikor ile kaplanmış manyetik nanopartiküller biorad orijinli kontrol idrarı içerisine eklenen farklı derişimlerdeki (0.1, 1, 10, 50 100 pg/mL, 1,10,100 ng/mL) rEPO standartları ile oda sıcaklığında 1 saat karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bağlanmayan rekombinant eritropoetin ortamdan uzaklaştırmak için 4 kez PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile manyetik yıkama yapılmıştır. Manyetik nanopartiküllere bağlı olan eritropoetini ayırmak için 30µL elüsyon tamponu (100 µL LDS Örnek Tamponu(4X) +40 µL İndirgeyici Ajan (10 X) +260 µL Milli Q su) kullanılmıştır. Partikül –elüsyon tamponu çözeltisi 95°C’de 5 dakika karıştırıcı üzerinde karıştırıcı üzerinde inkübe edilmiştir. Daha sonra elüsyon çözeltisi oda sıcaklığında 10 dakika soğumaya bırakılmıştır. Bu işlem sonunda partiküller manyetik ayırma ile ortamdan uzaklaştırılmıştır. Eritropoetini içeren süpernatant ilerde kullanılmak üzere eppendorf tüplerine alınmıştır.

3.2.1.13.4. Jel Elektrofrez ve Western Blot

Elektrofrez sırasında Mini-protean TGX %10 hazır jeli ve BİORAD Mini-protean elektrofrez ekipmanları kullanılmıştır. %10'luk hazır jel tank içerisinde yer alan destek kısmına yerleştirildikten sonra, tankın iç ve dış çemberi SDS yürütme tamponu ile doldurulmuştur. İmmunopürifikasyon işlemi uygulanan örnekler her bir kuyucuğa 30 µL olacak şekilde pipetlenmiştir. Tankın kapağı kapatıldıktan sonra elektrofrez işlemi sabit 150 V, 90 dakika koşullarında gerçekleştirilmiştir. Elektrofrezin bitmesine yakın birinci blotting işleminin hazırlıkları yapılmıştır. İşlem sırasında kullanılacak membran uygun ölçülerde kesilmiştir, membranı aktive etmek ve yıkamak için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. Elektrofrez tamamlandıktan sonra jel, membran ve 2 tabaka blotting kağıtları SDS transfer tamponu içerisinde 5 dakika karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. Birinci blotting işleminde jel üzerindeki proteinleri BİORAD Mini Trans Blot Cell ekipmanlarıyla birinci poliviniliden florür (PVDF) membrana aktarmak için şekil 3.3’de gösterilen şekilde jel, PVDF membran, blotting kağıtları sırasıyla yerleştirilerek sandviç yapı

oluşturulmuştur. Oluşturulan sandviç yapı dikey tank içine yerleştirilmiş ve tankın kapağı kapatılmıştır. Birinci blotting işlemi 100V, 350 mA koşullarında 1 saat boyunca gerçekleştirilmiştir.



Şekil 3.3. Blotting yönteminin şematize gösterimi

Birinci blotting tamamlandıktan sonra PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası membranın bloklanması için %5'lik süt çözeltisinde karıştırıcı üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Bloklama sonrası PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 1kez 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama tamamlandıktan sonra membran primer antikor çözeltisinde (1/1000 dilüsyon) +4C⁰'de karıştırıcı üzerinde 1 gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 5 kez 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemleri sırasında ikinci blotting işlemleri için gerekli hazırlıkları yapılmıştır. İşlem sırasında kullanılacak membran kesilmiş, membranı aktive etmek ve yıkamak için gerekli çözeltiler hazırlanmıştır. İkinci membran ve 2 tabaka blotting kağıtları % 0,7'lik Asetik asit içerisinde 5 dakika karıştırıcı üzerinde bekletilmiştir. İkinci blotting işlemi için Biorad Semi-Dry Transfer Ünitesi kullanılmıştır. Ünitenin anot plakasının üzerine sırasıyla birinci tabaka blotting kağıtları + birinci Immobilon Membran (EPO+primer antikor)+ ikinci tabaka blotting kağıtları yerleştirilmiştir. Katot plakası kapatılmış ve Semi-Dry Transfer Ünitesi 10dk süresince santimetrekare başına 1

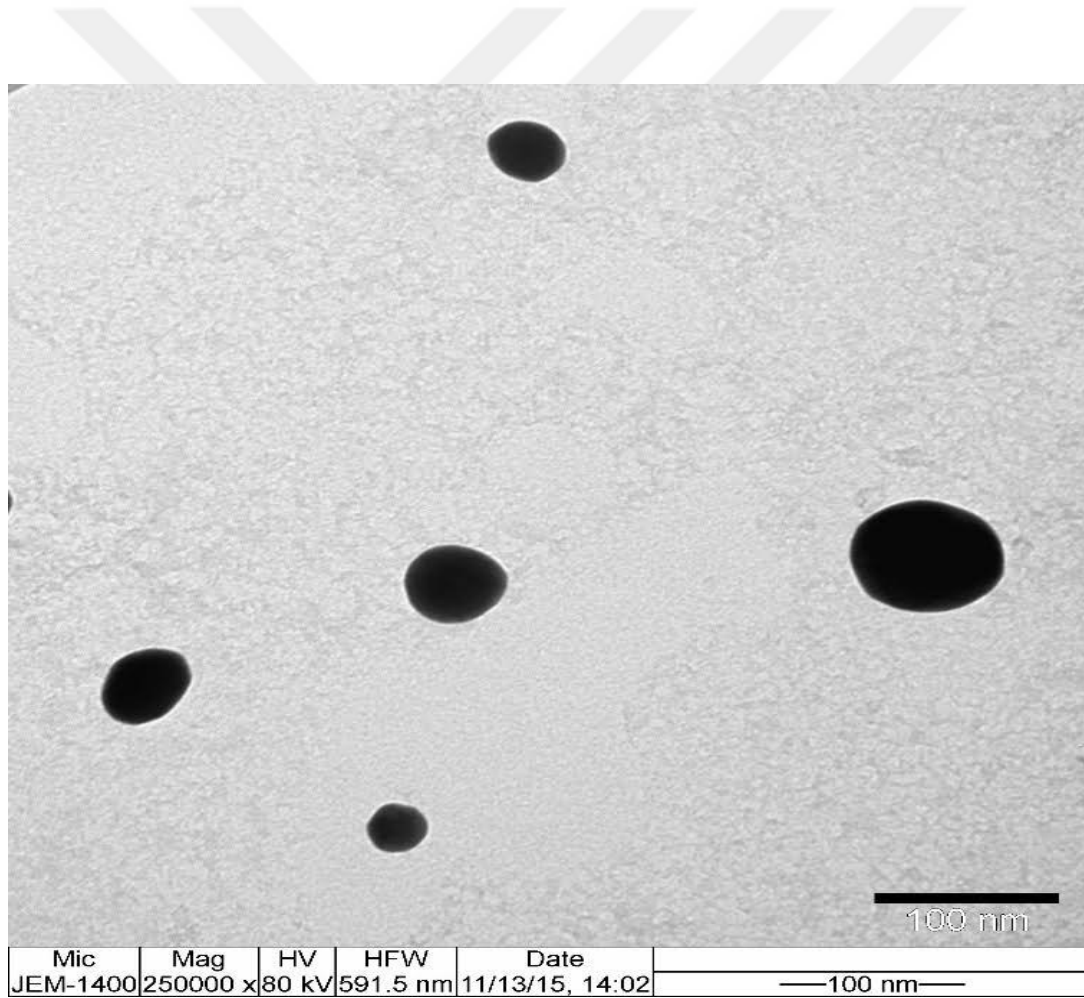
mA olacak şekilde çalıştırılmıştır. Birinci blotting tamamlandıktan sonra PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez 5 dakika yıkanmıştır. İkinci blotting tamamlandıktan sonra PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 3 kez 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi sonrası ikinci membranın bloklanması için %5'lik süt çözeltisinde karıştırıcı üzerinde 1 saat bekletilmiştir. Bloklama sonrası PVDF membran PBS tamponu (pH7.4) ile 1 kez 5 dakika yıkanmıştır. Yıkama tamamlandıktan sonra ikinci membran sekonder antikor çözeltisinde (1/100.000 dilüsyon) oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. İkinci membran PBS tamponu (pH7.4) ile 5 kez 5 dakika yıkanmıştır. Daha sonra ikinci membran streptavidin peroksidaz çözeltisi içerisinde oda sıcaklığında karıştırıcı üzerinde 1 saat inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası ikinci membran PBS tamponu (pH7.4) ile 5 kez 5 dakika yıkanmıştır ve kemilüminesans reaktif içerisine alınarak CCD kamerada görüntülenmiştir.

4. BULGULAR

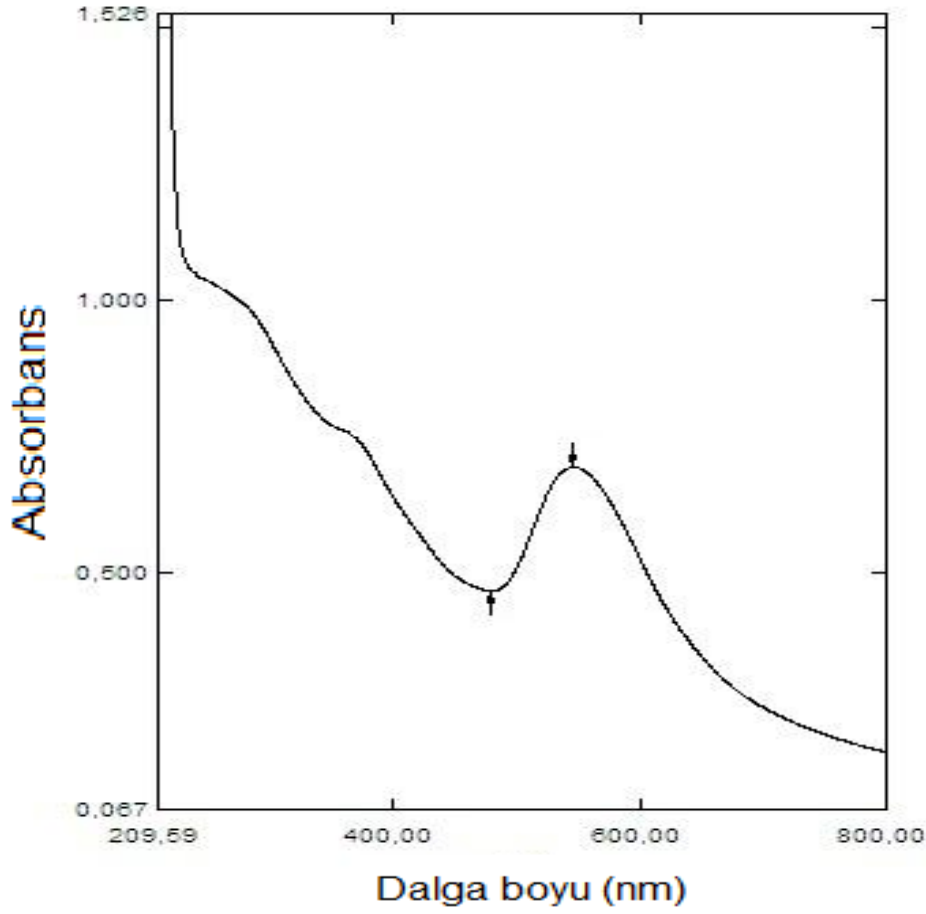
4.1 Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

4.1.1 Altın Manyetik Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Altın manyetik nanopartiküllerin karakterizasyonu için, partiküllerin metal optik özelliklerinden yararlanılmaktadır. Küresel altın demir nanopartiküllerin karakterizasyonu için UV-visible spektrofotometresi ve transmisyon elektron mikroskobu (TEM) kullanılmıştır. Şekil 4.1'de manyetik nanopartiküllerin homojen bir partikül dağılımı sahip olduğu gösterilmiştir. Yüksek manyetik özellik gösteren demir nanopartikülleri TEM görüntülerinde görüldüğü gibi partikül boyutunun 100 ± 3 nm olduğu saptanmıştır



Şekil 4.1. Altın manyetik nanopartiküllerin TEM görüntüsü.

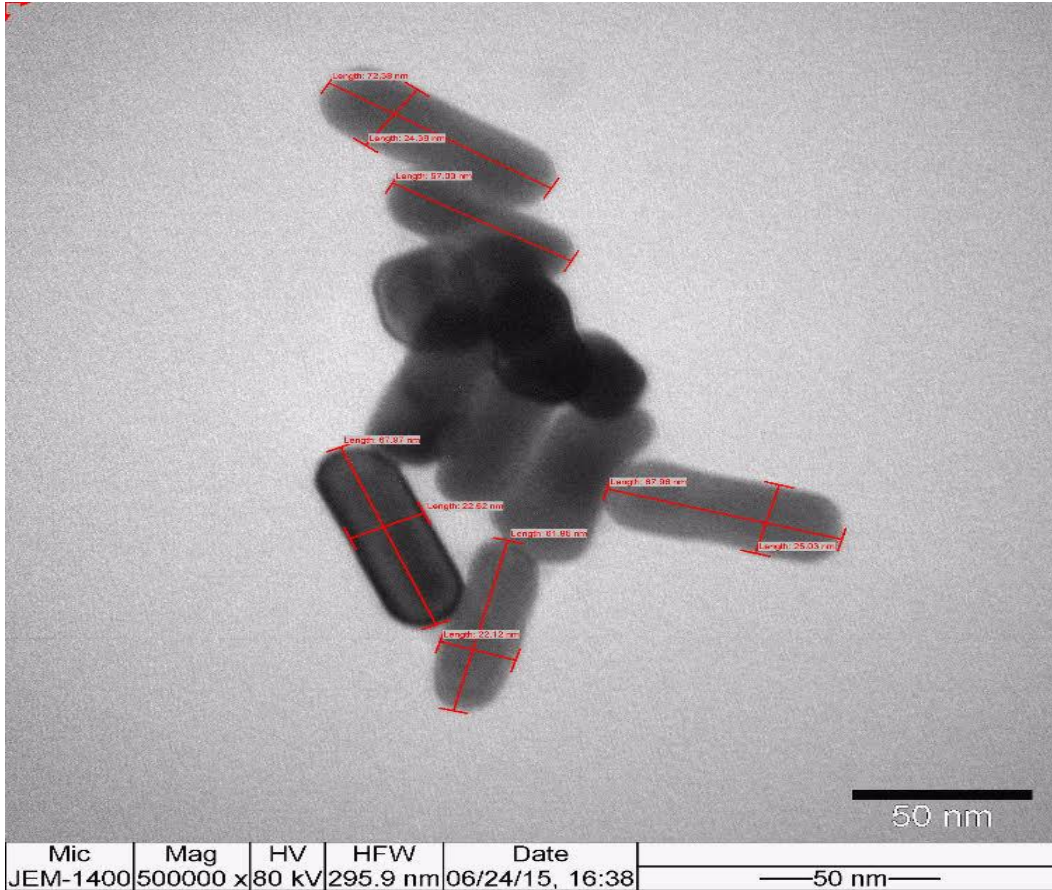


Şekil 4.2. Altın manyetik nanopartiküllerin UV-Vis absorpsiyon spektrumları.

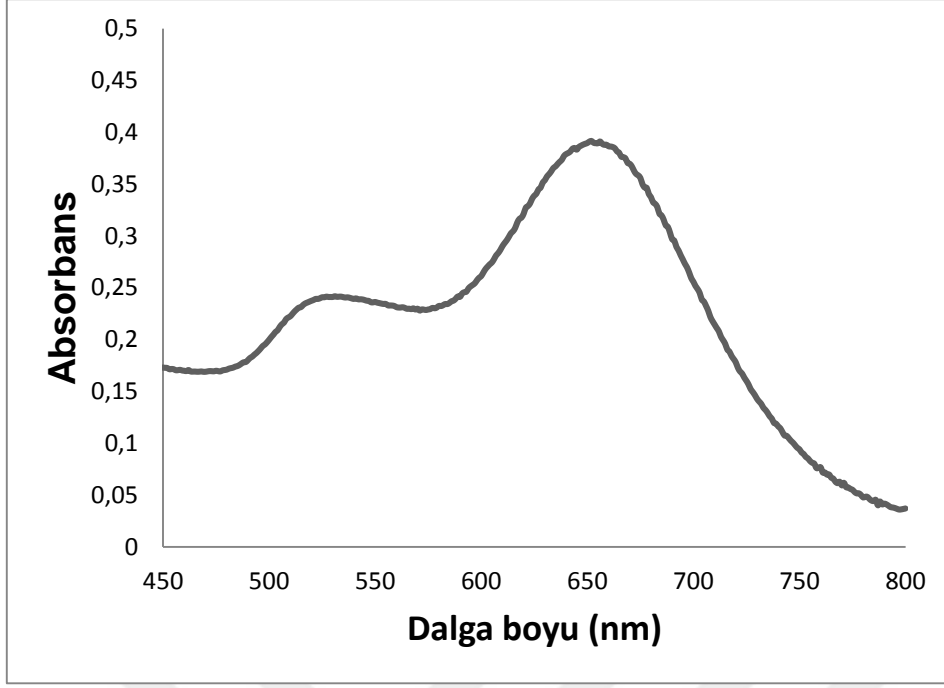
Şekil 4.2’de küresel altın kaplı demir nanopartiküllerin Uv-vis spektrumları görülmektedir. Nanopartiküller sahip olduğu yüzey plazmonu özelliklerinden yararlanılarak şekil ve boyut özellikleri hakkında bilgi elde edilmektedir. Uygun dalga boyunda bir ışık demeti gönderildiğinde iletkenlik bandında bulunan elektronların salınım hareketi yüzeyde büyük bir elektrik alanı oluşmasını neden olur ve oluşan bu elektromanyetik alanın nanopartikül ile rezonansa girmesi sonucunda nanopartikülün ışığı absorplama ve saçılma özelliği artar. Şekil 5.2’de küresel manyetik nanopartiküllerin spektrumları incelendiğinde 550 nm’ de plazmon bandına sahiptir ve gözlenen bu bant demir nanopartiküllerinin altın ile kaplandığının bir göstergesidir.

4.1.2. Manyetik Olmayan Altın Nanoçubukların Karakterizasyonu

Şekil 4.3'de altın nanoçubukların TEM görüntüsü incelendiğinde nanoçubukların boyutları yaklaşık olarak boyu 45 nm, eni 15 nm olarak saptanmıştır ve sentezlenen nanoçubukların boy/en oranı yaklaşık olarak 3'tür.



Şekil 4.3. Manyetik olmayan altın nanoçubukların TEM görüntüsü



Şekil 4.4. Manyetik olmayan altın nanoçubukların UV-Vis absorpsiyon spektrumları

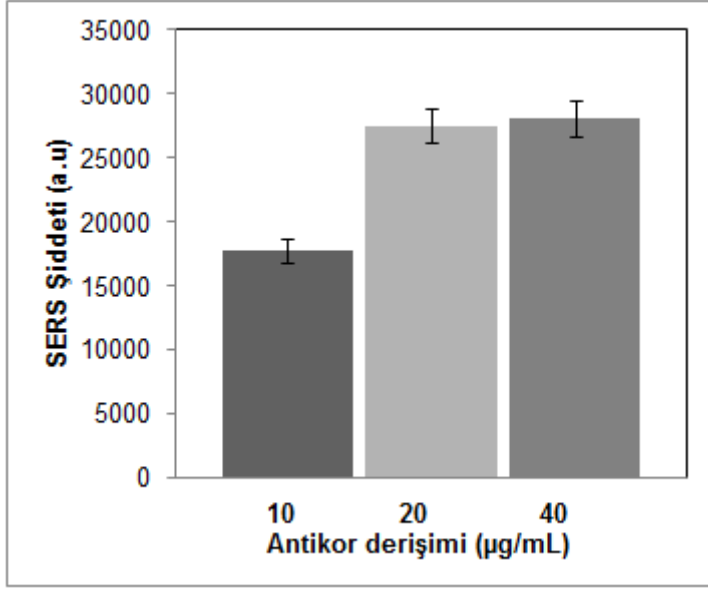
Şekil 4.4'te verilen UV-Vis spektrumları incelendiğinde 520 nm' deki enine plazmon bandı iken 656 nm deki plazmon bandı ise boyuna plazmon bandıdır. Nanoçubuklar sahip oldukları anizotropik özelliklerinden dolayı iki farklı plazmon rezonansı göstermelerine neden olur. Bunun nedeni kısa ve uzun yüzeylerdeki elektron salınımlarıdır [121]. En/boy oranındaki değişim, ışığın gelme açısına ve polarizasyon değişimine göre soğurma değişimleri gösterir. Nanoçubukların boy/en oranının büyük olmasından dolayı düşük enerjili görünür bölge ile NIR'da çalışma olanı sağlaması büyük bir avantajdır. Nanoçubukların boy/en oranları değiştirilerek farklı boyutta nanoçubuklar sentezlenmesi nanoçubukların farklı optik özellikler kazanmasına neden olur. Bu özelliklerinden dolayı biyolojik analizlerde kullanılırlar. Nanoçubukların boy/en oranı arttıkça Raman verimliliği artmaktadır.

4.2. Optimizasyon Deneyleri

4.2.1. Antikor Derişiminin Belirlenmesi

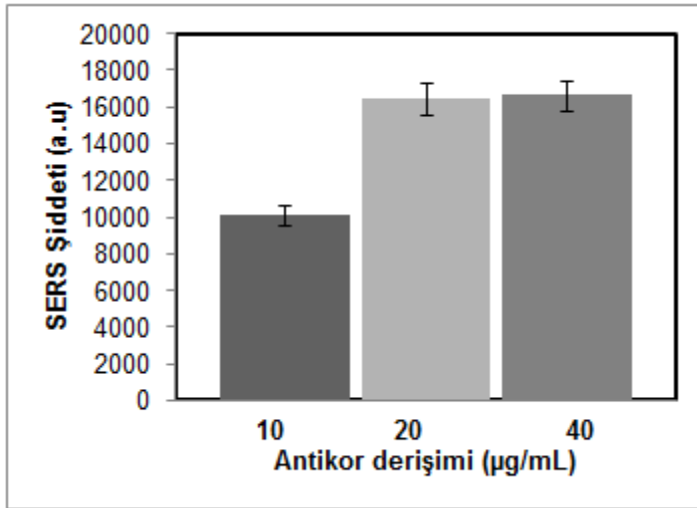
rEPO nanopartikül ve altın plaka yüzeyine seçici olarak antikorun amino terminal bölgesinden bağlanmaktadır. Bu yüzden ortamda rEPO'yu bağlayabilecek yeterli miktarda antikor gereklidir. Optimum antikor derişimini belirlemek için farklı antikor derişimlerdeki (10, 20 ve 40 $\mu\text{g/mL}$) partikül ve altın plaka örnekleri 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi ile etkileştirilerek sandviç yapı tamamlanmıştır.

Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır (Şekil 4.5 ve Şekil 4.6).



Şekil 4.5. Homojen sandviç sistemi antikor derişimi

Elde edilen verilere göre (şekil 4.5) antikor derişimi artıkça SERS sinyallerinde artış gözlenmiştir fakat 20 µg/mL antikor derişiminden sonra önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir. Homojen immunoanaliz sistemi için optimum antikor derişimi 20 µg/mL olarak belirlenmiştir.

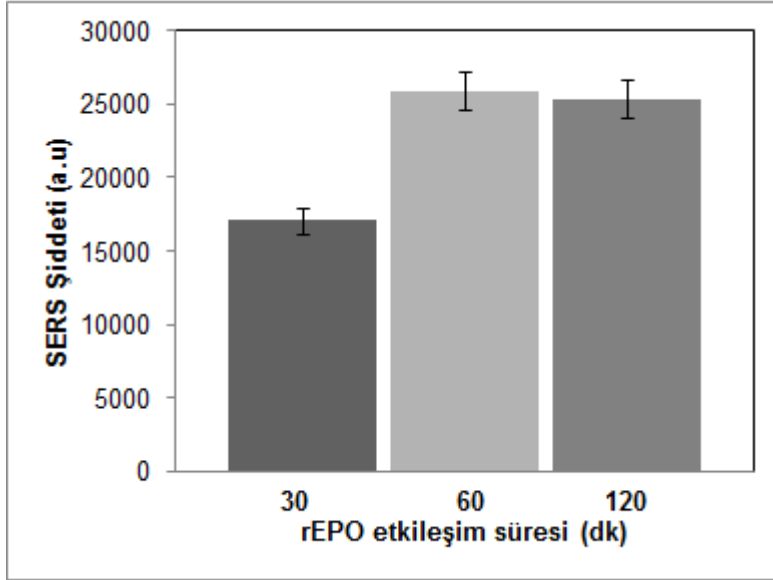


Şekil 4.6. Heterojen sandviç sistemi antikor derişimi

Elde edilen verilere göre (şekil 4.6) antikor derişimi artıkça SERS sinyallerinde artış gözlenmiştir fakat 20 µg/mL antikor derişiminden sonra önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir. Heterojen immunoanaliz sistemi için optimum antikor derişimi 20 µg/mL olarak belirlenmiştir.

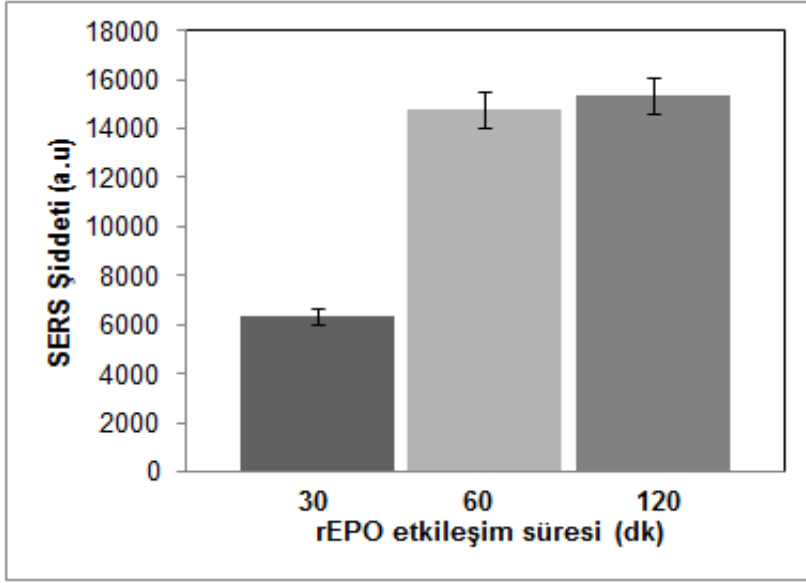
4.2.2. rEPO ve Antikor Etkileşim Süresinin Belirlenmesi

Optimizasyon çalışmalarının bu aşamasında optimum etkileşim süresini belirleyebilmek için 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi yüzeyi antikor ile kaplanmış nanopartiküller ve altın plakalar farklı zamanlarda (30, 60, 120 dk) etkileştirilerek sandviç yapı tamamlanmıştır. Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır (şekil 4.7 ve şekil 4.8).



Şekil 4.7. Homojen sandviç sisteminde rEPO ve antikor etkileşim süresi

Bu verilere göre inkübasyon süresi artıkça SERS sinyallerinde artış gözlenirken 60 dk. sonrasında önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir. Homojen immunoanaliz sistemi için optimum rEPO etkileşim süresi 60 dk. olarak belirlenmiştir.



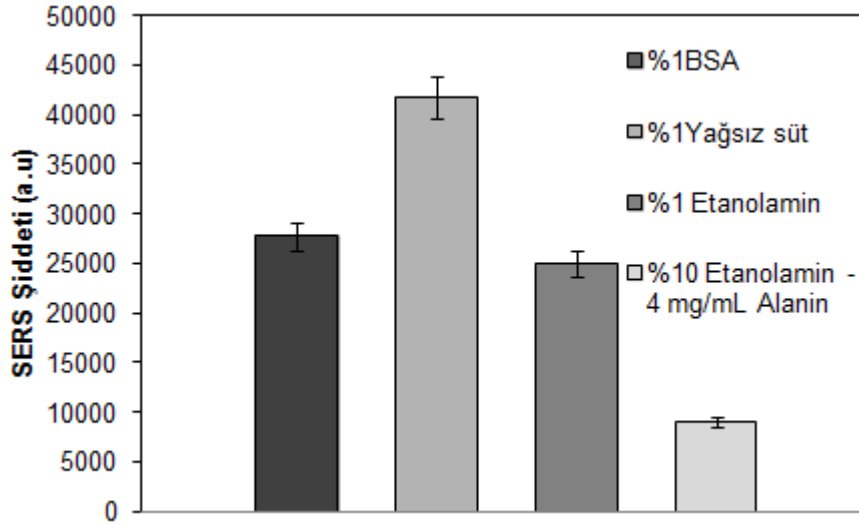
Şekil 4.8. Heterojen sandviç sisteminde rEPO ve antikor etkileşim süresi

Antikor bağlı altın plaka yüzeyleri ile yapılan çalışma sonrasında inkübasyon süresi arttıkça SERS sinyallerinde artış gözlenirken 60 dk. sonrasında önemli düzeyde bir artış gözlenmemiştir. Heterojen immunoanaliz sistemi için optimum rEPO etkileşim süresi 60 dk. olarak belirlenmiştir. At plazmasından rEPO'nun tayinine yönelik bir çalışmada EPO-partikül etkileşim süresi 15 dakika olduğu [24], insan idrarının dan rEPO'nun tayinine yönelik bir çalışmada ise etkileşim süresinin 30 dk. olduğu belirtilmiştir [25]. Bu iki çalışmada benzer antikorlar kullanılmıştır. Bu çalışmalar ile kıyaslandığında tasarladığımız yöntemlerin rEPO etkileşim süresinin daha uzun olmasının nedeninin seçilen antikordan kaynaklandığını düşünmekteyiz. Manyetik nanopartikül yüzeyine antikor immobilizasyonuna yönelik başka bir çalışmada küçük boyutlara sahip manyetik nanopartiküllerin kullanıldığı yöntemlerin hassasiyetini artırmak için 1 saat inkübasyon süresinin gerekli olduğu belirtilmiştir [122]. İmmunoanaliz yöntemlerin pek çok basamağında inkübasyon basamağı 1 saattir. Buna göre yaptığımız çalışmada optimum inkübasyon süresinin mevcut birçok yöntemde ile benzer olduğu görülmüştür.

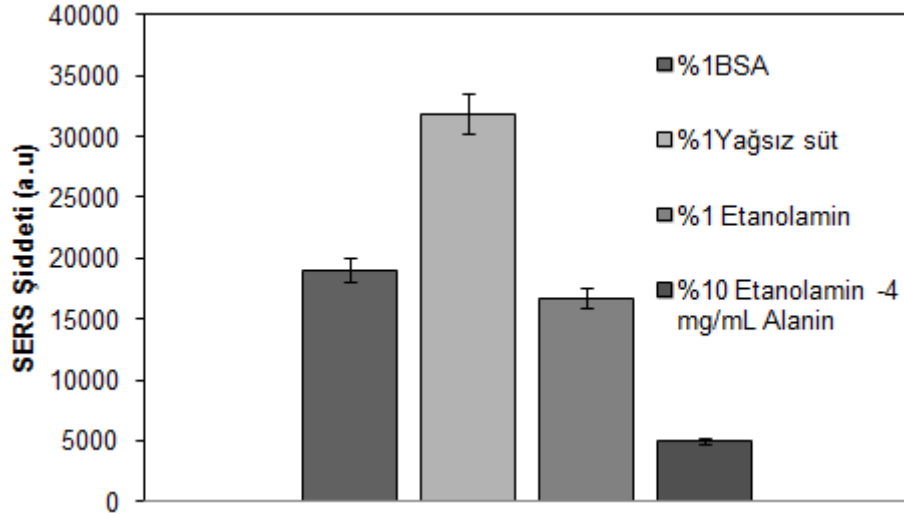
4.2.3. Seçici Olmayan Bağlanmaların Önlenmesi

4.2.3.1. Bloklama Ajanının Seçilmesi

Hedef analitin tayini için sandviç yapı oluşturacak altın kaplı manyetik küre partiküller ve altın plaka yüzeyleri ile altın çubuk partiküller arasında özgün olmayan bağlanmaların gerçekleşmemesi için yüzeylerinde açıkta kalan grupların bloklama ajanları ile kapatılması gerekmektedir. Bu amaçla farklı bloklama ajanları kullanılarak en etkili bloklama ajanının belirlenmesi için, antikor bağlı yüzeyler ile %1BSA, %1yağsız süt, %1 etanolamin ve %10 etanolamin -4 mg/mL alanin çözeltileri ile 1 saat bloka edilmiştir. Daha sonra ortamda kör çözeltisi (hedef analitin bulunmadığı PBS tamponu) kullanılarak iki partikül ve altın yüzey ile altın nanoçubuklar birbirleriyle etkileştirilmiş ve PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmıştır. Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır (şekil 4.9 ve 4.10).



Şekil 4.9. Homojen sandviç sisteminde bloklama ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi

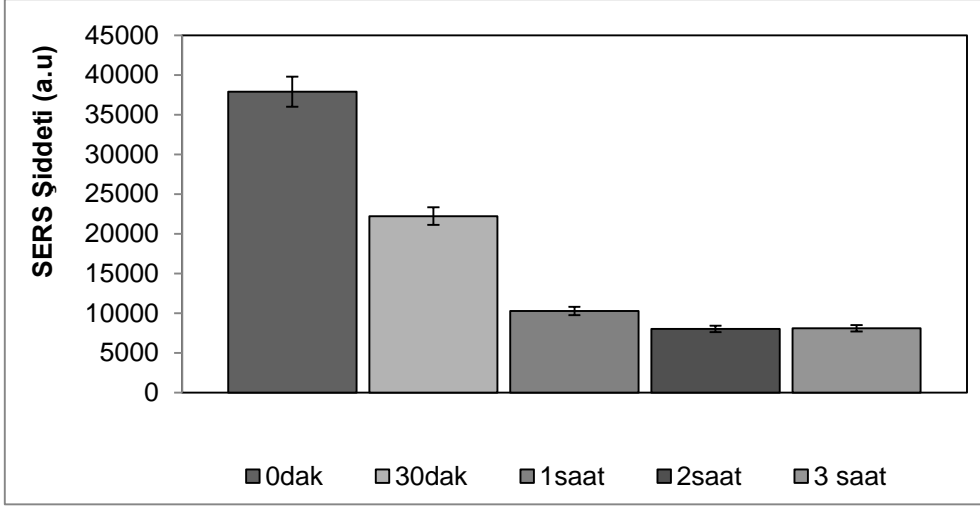


Şekil 4.10. Heterojen sandviç sisteminde bloklama ajanlarının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi

Çalışmanın birinci aşamasında kullanılan bloklama ajanlarının SERS sinyalleri incelendiğinde %1 yağsız sütün bloklama ajanı olarak uygun olmadığı ve %1 BSA ve %1 etanolaminin seçici olmayan bağlanmaları azaltmış fakat tam olarak engelleyemediği gözlenmiştir. Literatürdeki makalelerde bloklama ajanı seçimi bakımından incelendiğinde alanin' in bloklama ajanı olarak kullanıldığı görülmüştür [123]. Bundan dolayı çalışmanın ikinci aşamasında etanolamin derişimi %10'na çıkarılmış ve ortama -4 mg/mL alanin çözeltisi eklenmiştir. Hem homojen hem de heterojen sandviç sistemden elde edilen SERS sinyalleri incelendiğinde ise %10 etanolamin-4 mg/mL alanin' in bloklama ajanı olarak beklenen etkinliğini gösterdiği saptanmıştır.

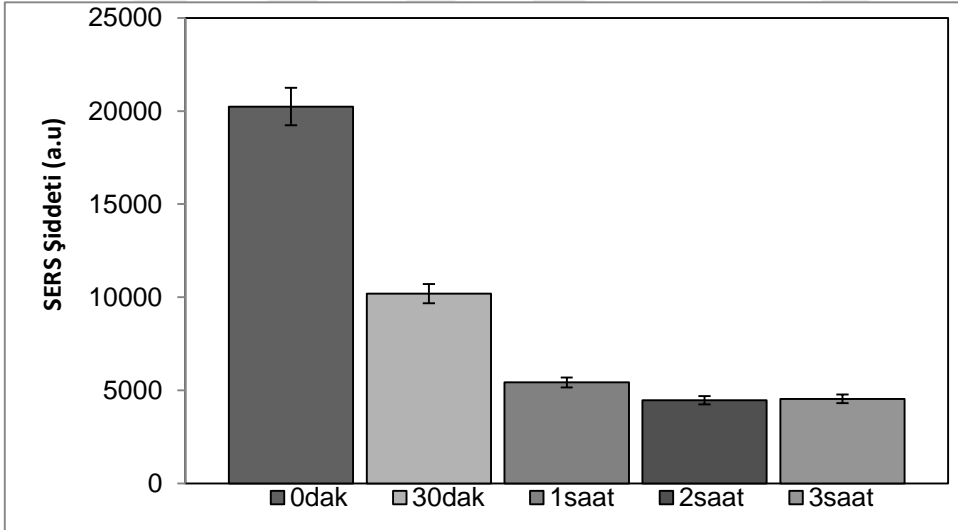
4.2.3.2 Bloklama Süresinin Belirlenmesi

En uygun bloklama süresini belirlemek için yapılan çalışmada, %10 etanolamin -4 mg/mL alanin karışımı farklı sürelerde (0 dk,30 dk,1 saat,2saat ve 3 saat) partikül ve altın plaka yüzeyleri ile etkileştirilmiştir. Daha sonra ortamda kör çözeltisi (hedef analitin bulunmadığı PBS tamponu) kullanılarak iki partikül ve altın yüzey ile altın nanocubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir ve PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmıştır. Tamamlanan sandviç yapı için DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri alınmıştır (şekil 4.11 ve 4.12).



Şekil 4.11. Homojen sandviç sisteminde farklı bloklama sürelerinde elde edilen SERS sinyali

Şekil 4.11 'de SERS sinyalleri izlendiğinde SERS sinyallerinin zamanla azaldığı ve 1 saat sonrasında değişmediği gözlenmiştir. Yöntemin hassasiyeti açısından optimum bloklama zamanı 1 saat olarak seçilmiş ve sonraki deney çalışmaları bu zaman üzerinden gerçekleştirilmiştir.



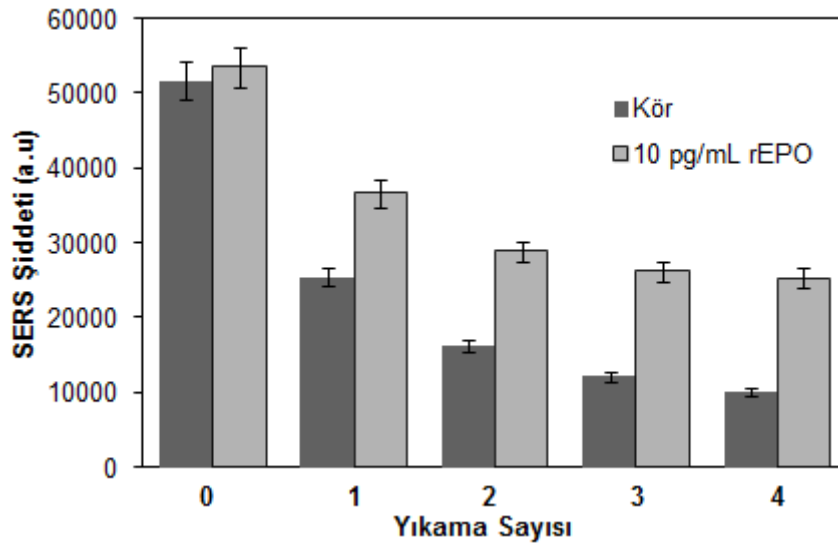
Şekil 4.12. Heterojen sandviç sisteminde farklı bloklama sürelerinde elde edilen SERS sinyali

Şekil 4.12'de SERS sinyallerinin homojen sandviç sistemde elde edilen SERS sinyalleri ile karşılaştırıldığında benzer sonuçlar elde edilmiştir. SERS sinyallerinin zamanla azaldığı ve 1 saat sonrasında değişmediği gözlenmiştir. Yöntemin

hassasiyeti açısından optimum bloklama zamanı 1 saat olarak seçilmiş ve sonraki deney çalışmaları bu zaman üzerinden gerçekleştirilmiştir.

4.2.3.3 Seçici Olmayan Bağlanmaların Yıkama Prosedürleri ile Önlenmesi

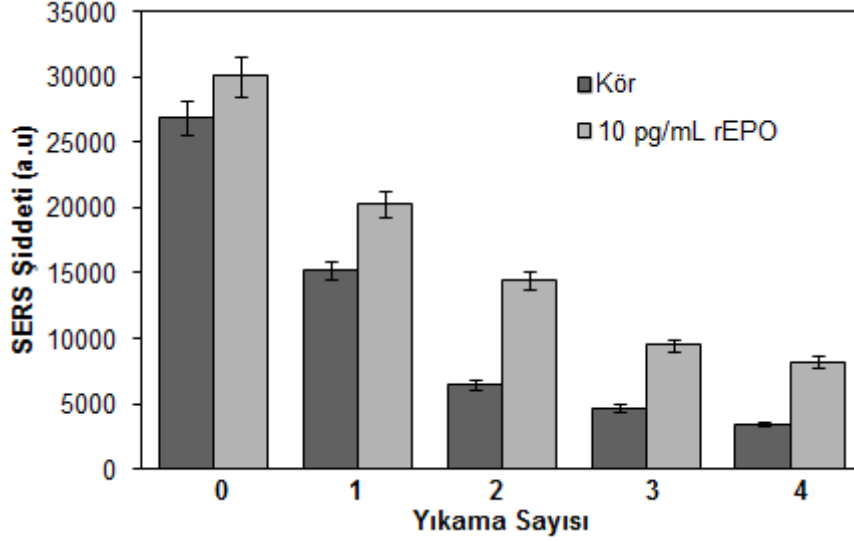
Spesifik olmayan etkileşimleri gidermek amacıyla yüzeyine antikor bağlı antikor nanopartiküller ve altın plaka yüzey ile rEPO etkileşimi sonrasında yüzey aktif maddelerle yıkama işlemi yapılmış ve yıkama sayılarının spesifik olmayan etkileşimler üzerine etkisi incelenmiştir. Bu amaçla yıkama çözeltisi olarak literatür verilerine dayanarak -%0.05'lik Tween 20 içeren PBS (PBST) tamponu hazırlanmıştır. Yıkama tamponlarında Tween 20 kullanılması istenmeyen protein adsorpsiyonunu veya seçici olmayan bağlanmaları engellemektedir [124]. Daha sonra ortamda kör çözeltisi ve 10 pg/mL derişimindeki rEPO çözeltisi kullanılarak antikor bağlı nanopartikül ve altın yüzeyleri ile altın nanocubuklar birbirleriyle etkileştirilmiştir. Farklı sayılarda PBS -%0.05 Tween 20 tamponu ile yıkama yapılmış ve yıkama sayısının etkinliği, DTNB sinyali kullanılarak SERS ölçümleri ile kontrol edilmiştir (şekil 4.13 ve 4.14).



Şekil 4.13. Homojen sandviç sisteminde yıkama sayısının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi

Elde edilen sonuçlara göre hiç yıkama yapılmadığı durumda kör sinyalinin hedef analitin (10 pg/mL rEPO) varlığında alınan sinyallere yakın sinyaller alınmıştır. Yıkama sayısı arttıkça hem kör hem de rEPO 'dan alınan SERS sinyallerinin azaldığı gözlenmiştir. Kör sinyali ile 10 pg/mL rEPO'dan alınan sinyal yıkama sayılarına göre karşılaştırıldığında immunomanyetik ayrımın yüksek seçicilikte

yapılabileceği gösterilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak üçüncü ve dördüncü yıkama arasında çok az bir fark gözleendiğinden dört yıkama sayısının yeterli olduğu gözlenmiştir.

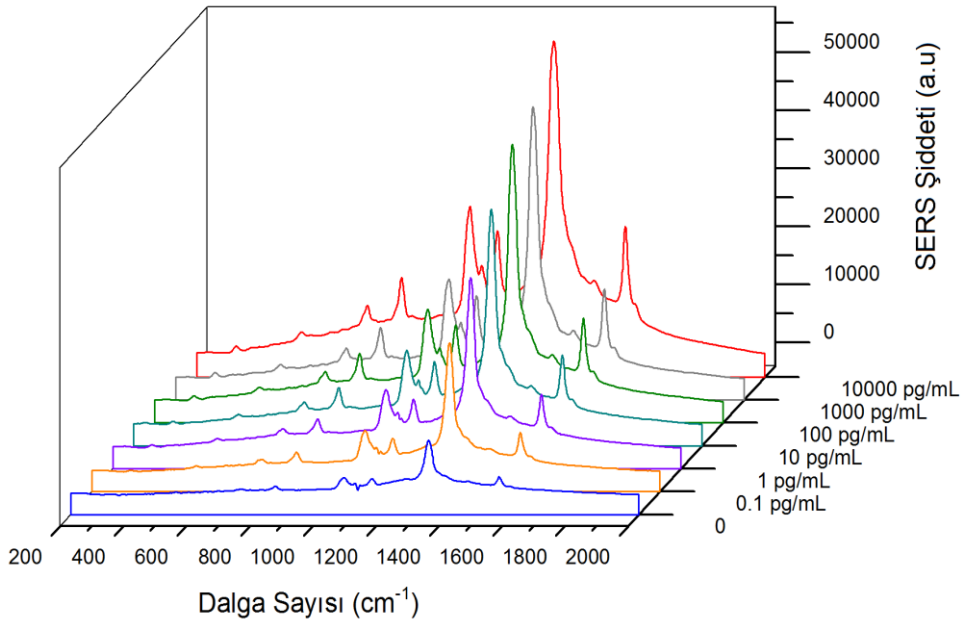


Şekil 4.14. Heterojen sandviç sisteminde yıkama sayısının spesifik olmayan bağlanmalar üzerine etkisinin SERS sinyalleri ile incelenmesi

Heterojen sandviç sisteminde de yıkama sayısı etkinliği SERS sinyalleri takip edilerek izlendiğinde homojen sistemde elde edilen sonuçlara benzer sonuçlar elde edilmiştir. Her iki sistem karşılaştırıldığında körden ve rEPO'dan alınan SERS sinyallerinin heterojen sandviç sistemde daha az olduğu gözlenmiştir. Bunun nedeninin manyetik partiküllerin boyutlarının küçük olması ve yüzey alanlarının daha geniş olması yüzünden daha fazla sayıda hedef analite bağlanabilmesi ve hızlı bağlanma kinetiğine sahip olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

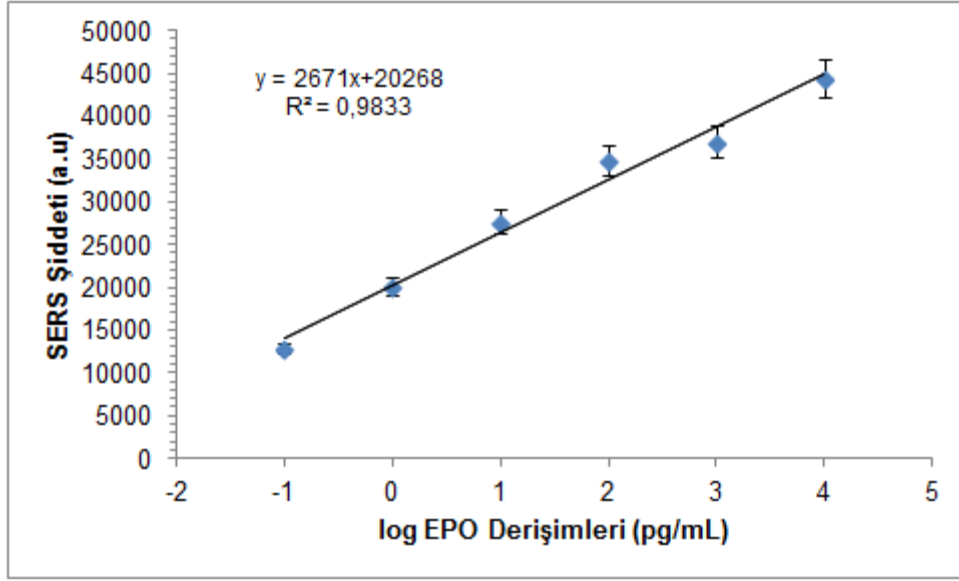
4.3.Homojen Sandviç Sisteminde rEPO Tayini

Homojen sandviç sisteminde rEPO'yu tespit etmek için antikor ile modifiye edilmiş manyetik partiküllerin yüzeyi DTNB ile etiketlenmiş nanoçubuklar ve rEPO standardı ile etkileştirilmiştir. rEPO standart çözeltileri 0-10000 pg/mL arasında değişen derişimlerde pH 7.4 PBS tamponu çözeltisi ile hazırlanmış ve hazırlanan dilusyonlardan SERS spektrumları elde edilmiştir (şekil 4.15)



Şekil 4.15. Homojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu

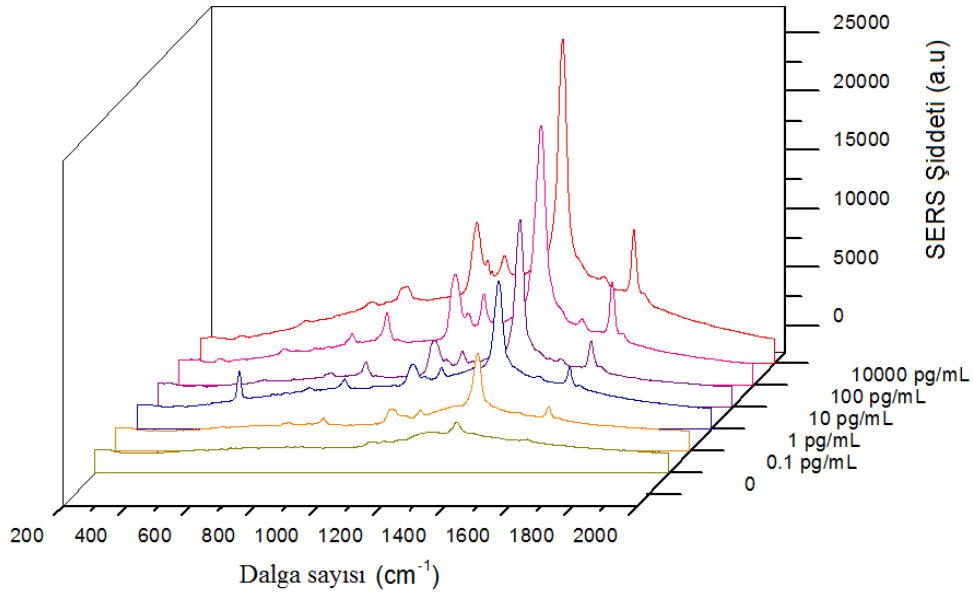
DTNB etiketli nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan homojen sandviç sisteminin analizinin sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait bant şiddetlerinin rEPO derişimlerine karşılık gelen değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı şekil 4.16 'da görülmektedir. Grafik reaksiyona giren 0-10000 pg/mL arasında değışen rEPO derişimleri için hazırlanmış ve bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2=0.9833$) elde edilmiştir.



Şekil 4.16. Homojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği ($R^2=0.9833$, $y=2671x+20268$)

4.4.Heterojen Sandviç Sisteminde rEPO Tayini

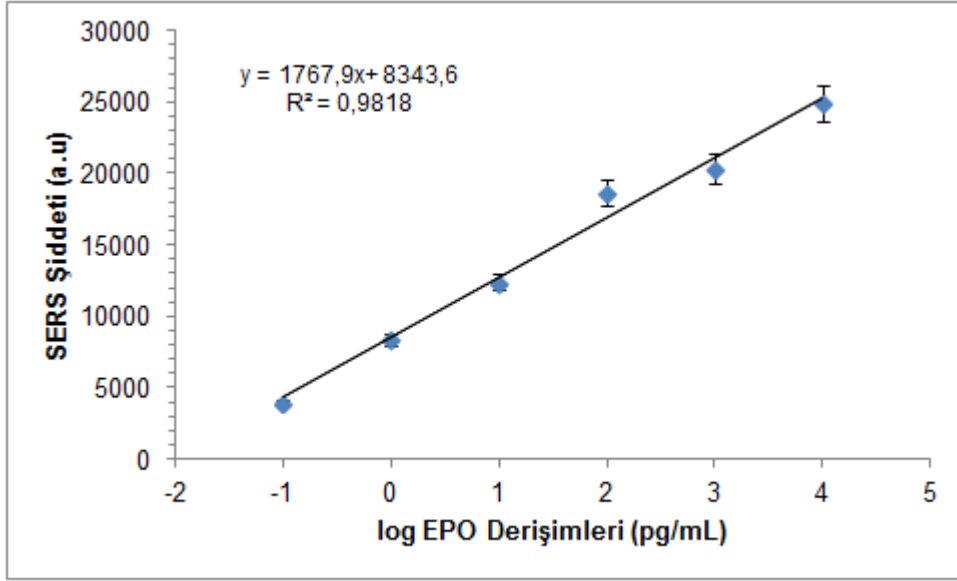
Heterojen sandviç sisteminde rEPO'yu tespit etmek için antikor ile modifiye edilmiş altın plaka yüzeyi DTNB ile etiketlenmiş nanoçubuklar ve rEPO standardı ile etkileştirilmiştir. rEPO standart çözeltileri 0-10000 pg/mL arasında değişen derişimlerde pH 7.4 PBS tamponu çözeltisi ile hazırlanmış ve hazırlanan dilüsyonlardan SERS spektrumları elde edilmiştir (şekil 4.17)



Şekil 4.17. Heterojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen SERS spektrumu

DTNB etiketli nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan homojen sandviç sisteminin analizinin sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait bant şiddetlerinin rEPO derişimlerine karşılık gelen değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı şekil 4.18 'de görölmektedir. Grafik reaksiyona giren 0-10000 pg/mL arasında değışen rEPO derişimleri için hazırlanmış ve bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2=0.9818$) elde edilmiştir.

Tasarlanan her iki yöntemle çok düşük derişimlerde (0.1 pg/mL) rEPO'yu oldukça hassas bir şekilde tespit edilebileceğı SERS spektrumlarında görölmektedir.

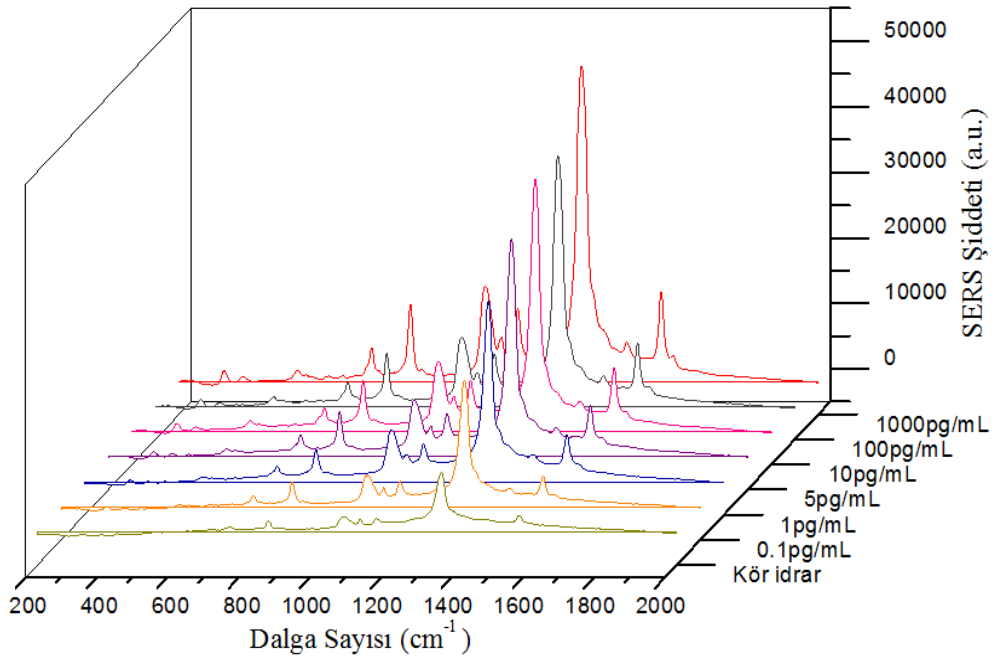


Şekil 4.18. Heterojen sandviç sisteminde farklı rEPO derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiği ($R^2=0.9818$, $y=1767x+7343.6$)

4.5.Yöntemlerin Biorad Orijinli Kontrol İdrar Örneklerine Uygulanması

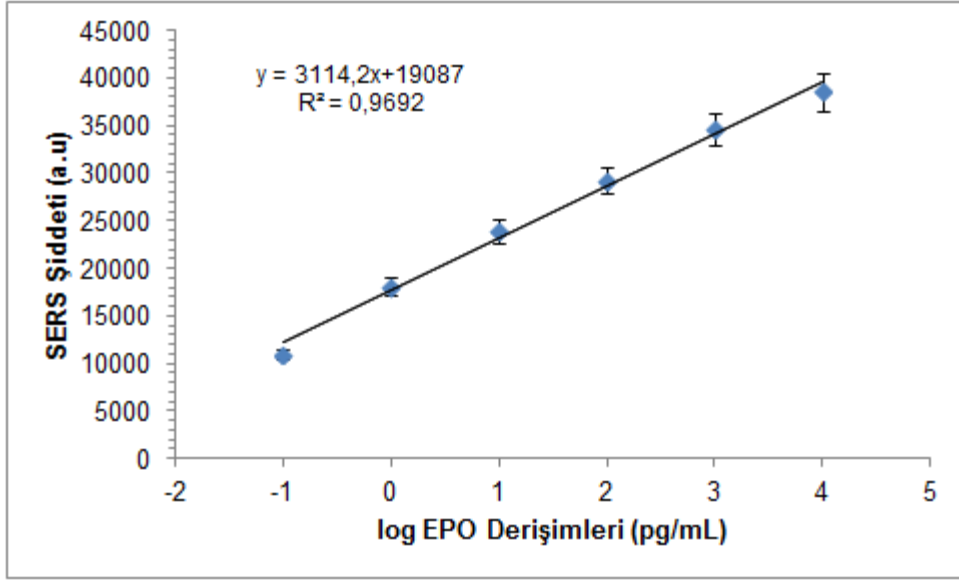
4.5.1.Homojen Sandviç Sisteminde İdrarda rEPO Tayini

Homojen sandviç sisteminde rEPO'yu tespit etmek için antikor ile modifiye edilmiş manyetik partiküllerin yüzeyi DTNB ile etiketlenmiş nanoçubuklar ve farklı derişimlerde rEPO standardı içeren (0.1, 1, 5, 10, 100, 1000 pg/mL) ve uEPO içeren (kör idrar) biorad orijinli kontrol idrar örnekleri ile etkileştirilmiştir. rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneklerinin analizinden elde edilen SERS spektrumları şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen SERS spektrumu

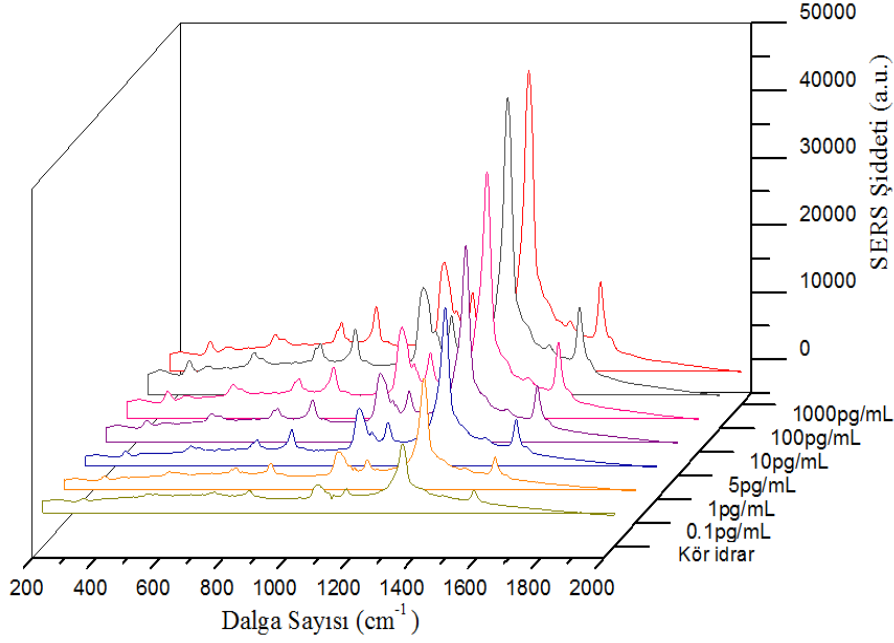
DTNB etiketli nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan homojen sandviç sisteminin analizinin sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait bant şiddetlerinin farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğine karşılık gelen değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı şekil 4.20 'de görölmektedir. Grafik reaksiyona giren 0-1000 pg/mL arasında değışen rEPO derişimleri için hazırlanmış ve bu derişim aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2=0.9692$) elde edilmiştir.



Şekil 4.20. Homojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen kalibrasyon grafiği ($R^2=0.9692$, $y=3114.2x+19087$)

4.5.2. Heterojen Sandviç Sisteminde İdrarda rEPO Tayini

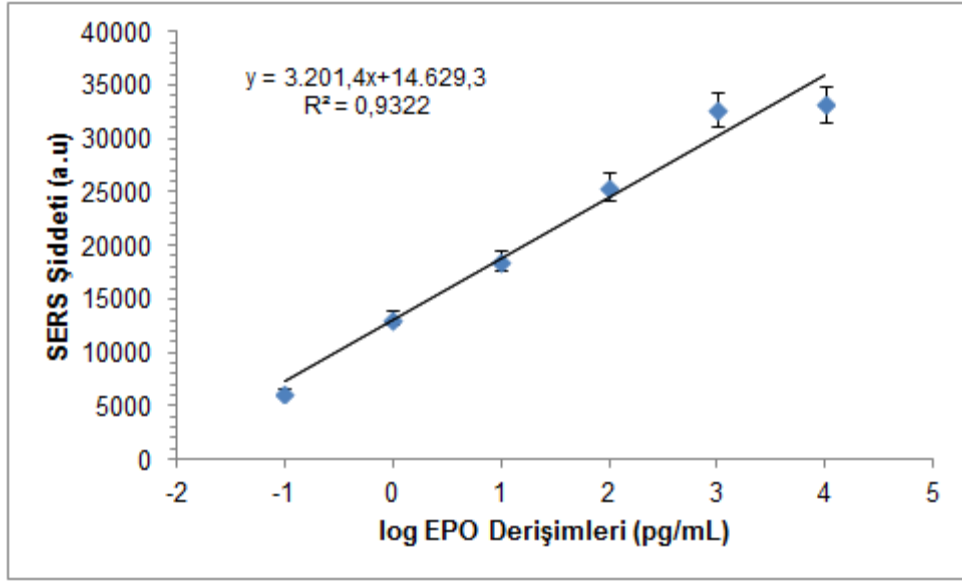
Heterojen sandviç sisteminde rEPO'yu tespit etmek için antikor ile modifiye edilmiş altın plaka yüzeyi DTNB ile etiketlenmiş nanoçubuklar ve farklı derişimlerde rEPO standardı içeren (0.1, 1, 5, 10, 100, 1000 pg/mL) ve uEPO içeren (kör idrar) biorad orijinli kontrol idrar örnekleri ile etkileştirilmiştir. rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneklerinin analizinden elde edilen SERS spektrumları şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Heterojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen SERS spektrumu

DTNB etiketli nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan heterojen sandviç sisteminin analizinin sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait sinyal şiddetlerinin farklı derişimlerde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğine karşılık gelen değerleri kullanılarak hazırlanan kalibrasyon grafiğı şekil 4.22 'de görölmektedir. Grafik reaksiyona giren 0-1000 pg/mL arasında değışen rEPO derişimleri için hazırlanmış ve bu derişim aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafiğı ($R^2=0.9322$) elde edilmiştir.

Geliştirilen homojen ve heterojen sandviç immunoanaliz yöntemlerinde biorad orijinli kontrol idrar örnekleri ile yapılan çalışmada rEPO tayini hassas bir şekilde tespit edilmiştir. Ayrıca biorad orijinli kontrol idrar örneklerden elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak validasyon verileri hesaplanmıştır.



Şekil 4.22. Heterojen sandviç sisteminde farklı derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneğinin analizinden elde edilen kalibrasyon grafiği ($R^2=0.9322$, $y=3201.4x+14629.3$)

4.6. Kontrol Deneyleri

4.6.1. Validasyon Deneyleri

Validasyon çalışmalarında yöntemlerin seçiciliği, tespit limiti (LOD), tayin limiti (LOQ), doğruluğu, ara kesinliği ve geri kazanımı tespit edilmiştir. Bu amaçla biorad orijinli kontrol idrar örneklerine 0-1000 pg/mL arasında rEPO eklenmiştir ve 1335 cm^{-1} deki SERS sinyallerinin şiddetleri arasındaki ilişki kullanılarak yöntemlerin doğrusallığını sağlamak için kullanılmıştır. Tespit limiti (LOD) ve Tayin limiti (LOQ) değerlerini hesaplamak için doğrusallığı gösteren kalibrasyon eğrisinin regresyon eşitliği kullanılmıştır. LOD, yöntemin laboratuvar koşullarında örnekteki varlığını tespit edebildiği ancak kesin miktarını ölçemediği en düşük analit konsantrasyonu; LOQ ise miktarsal olarak tespit edilebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanmıştır [125]. Kalibrasyon doğrusunun eğimi (b) ve regresyon bağımsız teriminin standart sapması (Sb) IUPAC'a göre LOD ve LOQ değerlerini hesaplamada aşağıdaki eşitlikten yararlanılmıştır:

$$\text{LOD} = \frac{k1XSb}{b}, \quad \text{LOQ} = \frac{k2XSb}{b}$$

k1 ve k2 değerleri sırasıyla yaklaşık olarak 3,3 ve 10'dur. Yöntemlerin hesaplanan LOD ve LOQ değerleri izelge 4.1. ve 4.2 'de gösterilmiştir.

Homojen Sandviç Sistemi	
Regresyon Eşitliği	3114x +19087
LOQ (pg/mL)	0,0285
LOD (pg/mL)	0,0085

Çizelge 4.1.Homojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol idrar rneklelerinden elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanan LOQ ve LOD değerleri

Heterojen Sandviç Sistemi	
Regresyon Eşitliği	3201x +14629
LOQ (pg/mL)	0,154
LOD (pg/mL)	0,0463

Çizelge 4.2. Heterojen sandviç sisteminin biorad orijinli kontrol idrar rneklelerinden elde edilen kalibrasyon denkleminde hesaplanan LOQ ve LOD değerleri

Geliştirilen yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla homojen sistem için 0,0085 pg /mL ve 0.0285 pg /mL iken heterojen sistemde 0.0463 pg /mL ve 0.154 pg /mL bulunmuştur. Literatür incelendiğinde SERS temelli analiz sistemlerinde 36.5 pg/mL(1 pM) [24] , 0,4 pg/mL (0.01 fM) [25] gibi gözlenebilme sınırlarına sahip çalışmalar yapılmıştır.

Yöntemlerin doğruluğunu ve kesinliğini hesaplamak için 0.1, 1 and 5 pg /mL rEPO biorad orijinli kontrol idrarına eklenmiştir ve 4 gün aynı koşullarda analiz tekrar edilmiştir. Daha önce biorad orijinli kontrol idrar rneklelerinin analizinden elde edilen şekil 4.20 ve 4.22'de ki kalibrasyon grafiği kullanılarak 0.1, 1 and 5 pg /mL

derişimlerinde rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneklerinin 1335 cm⁻¹ deki SERS sinyallerinin şiddetleri arasındaki ilişki kullanılarak yöntemlerin doğruluğu ve kesinliği (%RSD) hesaplanmıştır (Çizelge 4.3 ve 4.4).

Homojen Sandviç Sistemi				
Konsantrasyon (pg mL ⁻¹)	Bulunan (pg mL ⁻¹)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)	Doğruluk (%)
0.1	0.09	%92	13.8	8
1	0.91	%91	13.9	8.6
5	4.89	%98	9.0	-2.6

RSD: Relative standard deviation

Çizelge 4.3. Homojen sandviç sisteminin doğruluğu ve kesinliği

Heterojen Sandviç Sistemi				
Konsantrasyon (pg mL ⁻¹)	Bulunan (pg mL ⁻¹)	Geri Kazanım (%)	RSD (%)	Doğruluk (%)
0.1	0.09	%92	17.1	8
1	1.01	%93	16.9	7
5	4.70	%94	17.1	6

RSD: Relative standard deviation

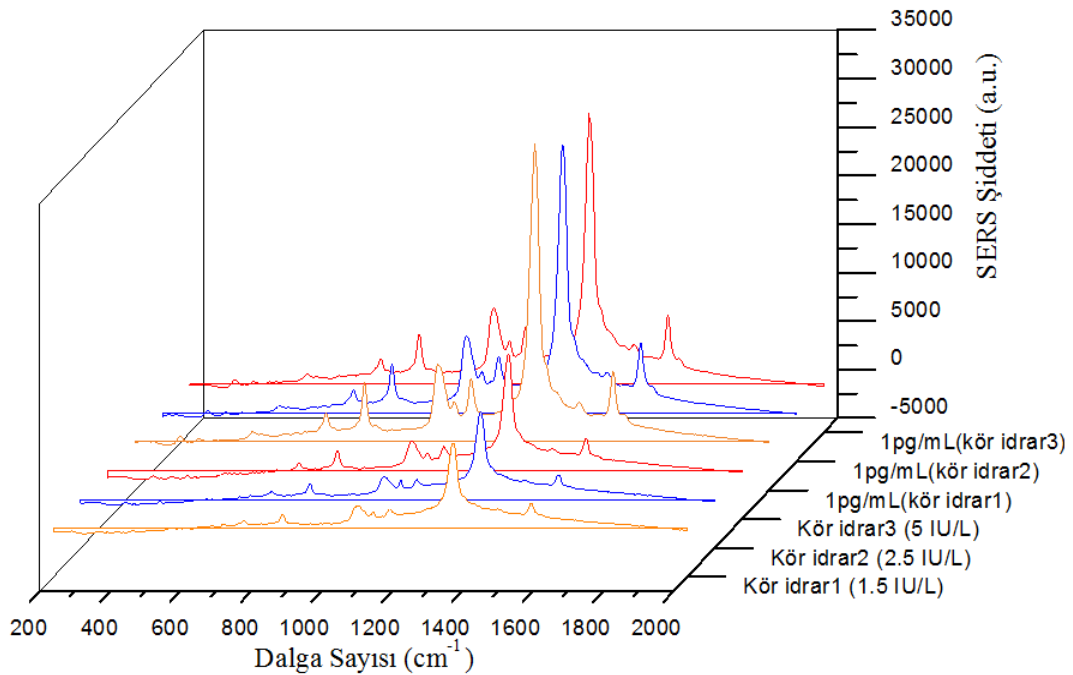
Çizelge 4.4. Heterojen sandviç sisteminin doğruluğu ve kesinliği

Validasyon çalışmalarında sonuçların performans kriterleri ile ilgili mevzuat ya da teknik bir doküman belirtilmediği sürece geri kazanım performans kriterleri %80 ile %110 arasında değişmesi başarılı olarak kabul edilir. Ara kesinliğin performans kriteri % RSD'nin %20'den küçük olması gerekir [126].

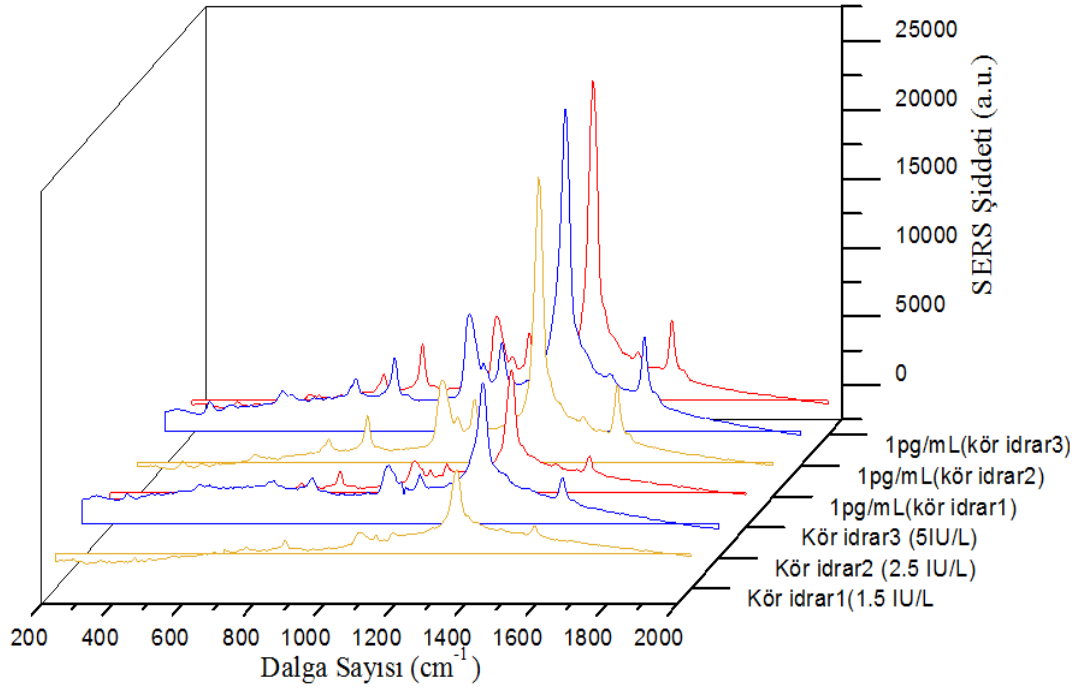
Homojen sandviç sisteminde 0.1, 1 and 5 pg /mL rEPO içeren örnekler için sırasıyla %92, %91 ve %98 geri kazanım ve %RSD değerleri %20'nin altında bulunmuştur.

Heterojen sandviç sisteminde 0.1, 1 and 5 pg /mL rEPO içeren örnekler için sırasıyla %92, %93 ve %94 geri kazanım ve %RSD değerleri %20'nin altında bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde geliştirilen yöntemlerin performans kriterlerini sağladığı görülmüştür.

Ayrıca idrardaki endojen ve rekombinant eritropoetin ayırımı gösterebilmek için pozitif ve negatif idrar örnekleri kullanılmıştır. Üç farklı derişimde uEPO içeren (1.5, 2.5, 5 IU/L) biorad orijinli kontrol idrar örnekleri iki kısma ayrılmıştır ve örneğin ilk kısmı direk olarak analiz edilmiştir. İkinci kısmına ise 1 pg/mL rEPO eklenerek analiz yapılmıştır. Yöntemlerin seçiciliği, idrar örneklerinin analizinden elde edilen SERS spektrumları şekil 4.23 ve 4.24 'te verilmiştir.



Şekil 4.23. Homojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumu

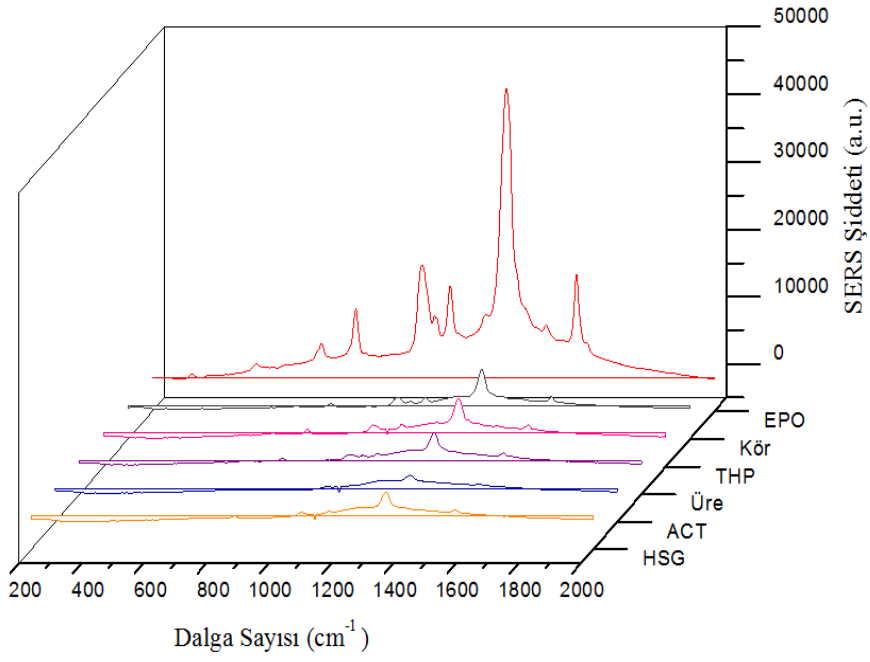


Şekil 4.24. Heterojen sandviç sisteminin seçiciliğini gösteren SERS spektrumu

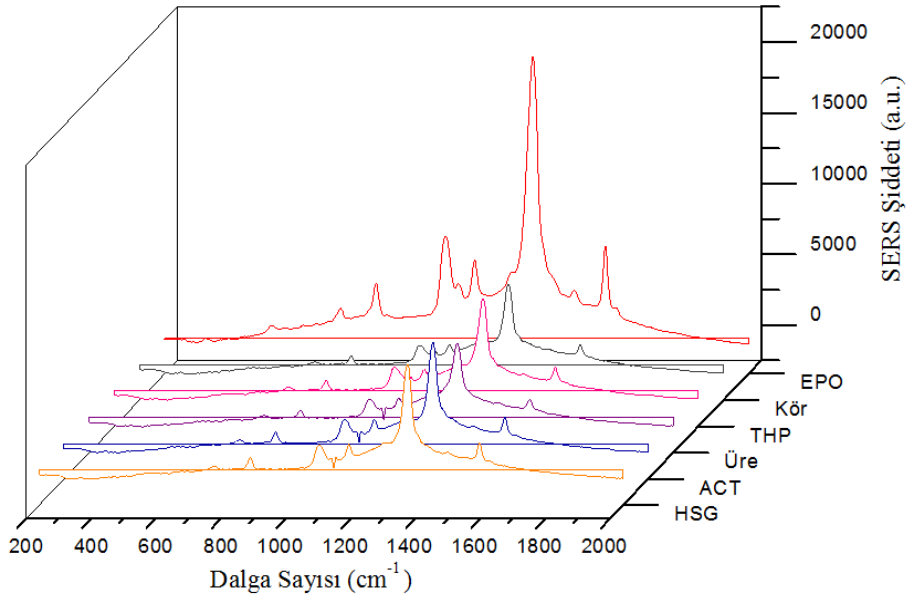
Şekil 4.23 ve 4.24 'teki farklı derişimlerde uEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar matrikslerinin kullanıldığı SERS spektrumları incelendiğinde 1 pg/mL derişiminde rEPO içeren örneklerin bant şiddetinin kör olarak kullanılan idrarlardan alınan bant şiddetinden yüksek olduğu ve bu sayede geliştirilen yöntemin hedef analiti belirlemede seçici ve güvenilir olduğu gösterilmiştir.

4.6.2. Antikor Seçiciliğinin Belirlenmesi

Tasarlanan yöntemlerde antikor seçiciliği belirlemek için PBS tamponu içerisinde hazırlanmış 100 pg /mL derişimindeki ACT, HSG, THP ve üre ile sandviç yapı oluşturulmuştur. Analiz sonucunda elde edilen SERS spektrumu şekil 4.25 ve 4.26'da verilmiştir.



Şekil 4.25. Homojen sandviç sisteminin antikor seçiciliğini gösteren SERS spektrumu

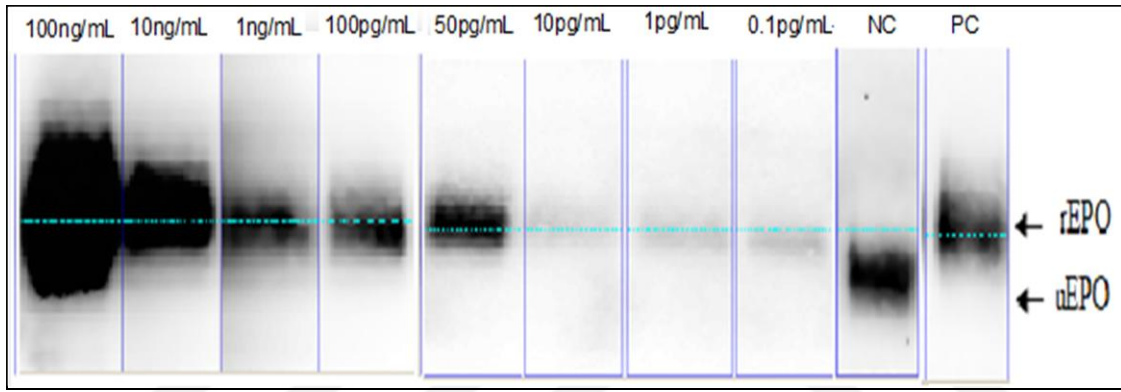


Şekil 4.26. Heterojen sandviç sisteminin antikor seçiciliğini gösteren SERS spektrumu

Elde edilen sonuçlara göre her iki yöntemde de hedef matriksten rEPO'yu yakalamak için seçilen antikorun rEPO'yu spesifik olarak tanıyabildiğini ve endojen proteinlerin ve üre ile herhangi bir çapraz bağlanma göstermediği bulunmuştur.

4.6.3. SDS-PAGE ve Western Blotting Yöntemi Çapraz Validasyon

SDS-PAGE ve Western Blot yöntemleri yardımıyla yüzeyi antikor ile kaplanmış manyetik nanopartiküller farklı derişimlerdeki (0.1, 1, 10, 50 100 pg/mL, 1,10,100 ng/mL) rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örnekleri ile etkileştirilmiştir. Deney sonrasında elde edilen CCD görüntüleri şekil 4.27'de verilmiştir.



Şekil 4.27. Manyetik nanopartikül ile yapılan immunopürifikasyonun CCD kamera görüntüsü

CCD kamera görüntüsü incelendiğinde, sentezlenen manyetik nanopartiküllerin SERS aktif substrat olarak kullanılmasının yanı sıra biorad orijinli kontrol idrar matriksinden eritropoetini düşük miktarlarda dahi yakalayarak manyetik immunopürifikasyon işlemini gerçekleştirmiştir. Literatür çalışmalarında, Jel elektroforezi ve Western Blotting temelli analiz sistemleri kullanılarak ELISA kiti ile manyetik partikül immunopürifikasyon sonuçları karşılaştırılmış ve manyetik partiküllerden elde edilen sonuçları daha iyi olduğu gözlenmiştir ve doping kontrol analizlerinde EPO analizinde manyetik partiküllerin hem pürifikasyon hem de konsantrasyon aşamalarında kullanılmasının faydalı olacağı bildirilmiştir [127] .

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, doping kontrol analizlerinde kompleks idrar matriksinden oldukça düşük miktarlarda bulunan EPO'yu basit ve hızlı bir şekilde tayin edebilmek için antikor ile modifiye edilmiş nanopartikül tabanlı SERS ölçümüne dayanan iki farklı sandviç immunoanaliz yöntemi geliştirilmiştir. Antikor ile modifiye edilmiş nanopartiküllerin sahip olduğu eşsiz özelliklerinden dolayı (hassas, özgün, ucuz ve kolay sentezlenen) birçok biyolojik yapıların analizinde kullanılmaktadır. Bu özelliklerinden yola çıkarak çalışmamızda manyetik özelliğe sahip olan ve olmayan nanopartiküller sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Sentezlenen nanopartiküller hem homojen hem de heterojen sandviç immunoanaliz yöntemlerinde kullanılmıştır.

Geliştirilen homojen sandviç sisteminde öncelikle demir nanopartiküller sentezlenmiştir. Daha sonra sentezlenen demir partiküllerin yüzeyi altın ile kaplanmıştır. Altın kaplı demir nanopartiküllerin yüzeyine antikorun kovalent bir şekilde bağlanabilmesi gerekli modifikasyonlar yapılmıştır. Heterojen sandviç sisteminde ise altın plaka yüzeylerine de antikor bağlayabilmek için aynı modifikasyon işlemleri uygulanmıştır. Sandviç yapıyı tamamlamak için ikinci aşamada manyetik özellik göstermeyen altın nanoçubuklar sentezlenmiştir. Sentezlenen altın nanoçubukların yüzeyi SERS aktif substrat DTNB ile kaplanmıştır. DTNB ile etiketlenen nanopartiküllere daha sonra antikor bağlanmıştır. Her iki analizde de kullanılmak amacıyla seçilen antikor EPO'yu özgün bir şekilde bağlayabilmektedir. Antikor ile modifiye edilen altın plaka ve manyetik nanopartiküller örnek ile karıştırılarak rEPO'nun analiz matriksinden ayrılması sağlanmıştır. Ortama DTNB işaretli nanoçubuklar eklenerek sandviç yapı tamamlanmış SERS sinyalleri takip edilmiştir. Geliştirilen yöntemlerin hassasiyetini artırmak amacıyla antikor derişimi, rEPO etkileşim süresi, spesifik olmayan bağlanmaların önüne geçmek için kullanılan bloklama ajanları, bloklama süresi ve yıkama sayısı gibi çeşitli parametrelerde optimizasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir ve en yüksek bağlanma etkinliğini gösteren değerler analiz yönteminde kullanılmıştır.

Çalışma kapsamında DTNB etiketli nanoçubuklar kullanılarak tamamlanan sistemlerinin analizinin sonucu, etiket olarak kullanılan DTNB'nin 1335 cm⁻¹ deki nitro grubuna ait sinyal şiddetlerinin artan rEPO konsantrasyonlarına karşılık gelen

değerleri kullanılarak kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Grafikler reaksiyona giren 0-10000 pg/mL rEPO konsantrasyonları için hazırlanmış ve bu konsantrasyon aralıklarında doğrusal kalibrasyon grafikleri (homojen sandviç sistemi, $R^2=0.9833$; heterojen sandviç sistemi, $R^2=0.9818$) elde edilmiştir. Yöntemlerin gerçek biyolojik örneklerde uygulanabilirliğini göstermek için biorad orijinli kontrol idrar matriksinde rEPO analizi yapılmıştır. Yöntem geçerlilik çalışmaları için gerekli olan parametreler biorad orijinli kontrol idrar numunelerinde çalışılmıştır.

0 – 1000 pg /mL aralığındaki rEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneklerinin analizinden elde edilen SERS sinyal şiddetleri kullanılarak doğrusal kalibrasyon grafikleri (homojen sandviç sistemi, $R^2=0.9692$; heterojen sandviç sistemi, $R^2=0.9320$) elde edilmiştir. Geliştirilen sistemlerin biorad orijinli kontrol idrar örneklerinden ve standart çözeltilerden elde edilen kalibrasyon grafikleri karşılaştırıldığında idrar örneklerinden elde edilen kalibrasyon grafiğinin regresyon değeri daha düşük bulunmuştur fakat gerçek örneklerle yapılan analizlerde beklenen bir sonuçtur. Literatür çalışmaları ile kıyaslandığında kalibrasyon grafikleri sadece standart analit çözeltileri ile gerçekleştirilmiştir ve hesaplamalar bu grafik üzerinden yapılmıştır [24] .Yaptığımız çalışmalarda biorad orijinli kontrol idrar örneklerinden elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak validasyon verileri hesaplanmıştır. Yöntemlerin LOD ve LOQ değerleri sırasıyla homojen sistem için 0,0085 pg /mL ve 0.0285 pg /mL iken heterojen sistemde 0.0463 pg /mL ve 0.154 pg /mL bulunmuştur. rEPO tayini için geliştirilen homojen ve heterojen sandviç immunoanaliz yöntemlerin literatürdeki çalışmalara ait LOD değerleri incelendiğinde daha düşük LOD değerleri elde edilmiştir (Çizelge 5.1.)

Analitik metot	LOD (pg/mL)
HRMS	25 [128]
Aptamerik Real-time PCR	39 [129]
LC-FAIMS-MS	100 [130]
CE-MS	12.8 (0,35 nM) [131]
Aptamerik MB-based probe	14.6 (0.4 nM) [132]
Apt-AuNPs Fluorescent probe	33.6 (0,92 nM) [133]
LC-MS/MS	100 [11]
Lateral Flow Test (MAIIA diagnostic)	0,035 (1.2 fM) [134]
SERS	36.5 (1 pM) [24]
SERS	0,4 (0.01 fM) [25]
Homojen sandviç immunoanaliz	0.0285
Heterojen sandviç immunoanaliz	0.154

Çizelge 5.1. Geliştirilen yöntemlerin diğer analitik metotlarla karşılaştırılması

Biorad orijinli kontrol idrar örneklerinden elde edilen kalibrasyon grafikleri kullanılarak yöntemlerin geri kazanımı ve ara kesinliği hesaplanmıştır. Homojen sandviç sisteminde 0.1, 1 and 5 pg /mL rEPO içeren örnekler için sırasıyla %92, %91 ve %98 geri kazanım ve ara kesinliği %20'nin altında bulunmuştur. Heterojen sandviç sisteminde ise sırasıyla %92, %93 ve %94 geri kazanım ve ara kesinliği %20'nin altında bulunmuştur. Sonuçlar incelendiğinde geliştirilen yöntemlerin performans kriterlerini sağladığı görülmüştür. Yöntemlerin seçiciliğini belirlemek için kör olarak farklı derişimlerde uEPO içeren biorad orijinli kontrol idrar örneklerinin kullanıldığı SERS spektrumları incelendiğinde 1 pg/mL derişiminde rEPO içeren örneklerin bant şiddetinin kör idrarlardan alınan bant şiddetinden yüksek olduğu ve bu sayede geliştirilen yöntemin hedef analiti belirlemede seçici ve güvenilir olduğu görülmüştür.

Validasyon çalışmalarında kullanılan antikorun seçiciliğini göstermek amacıyla idrar matriksinde bulunan benzer epitoplara sahip proteinler (ACT, HSG, THP) ve protein yapısında olmayan ürenin analizi sonucunda elde edilen SERS sinyali ile

pozitif ve negatif kontrollerinden gelen sinyaller karşılaştırılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre her iki yöntemde de hedef matriksten rEPO'yu yakalamak için seçilen antikorun rEPO'yu spesifik olarak tanıyabildiğini, endojen proteinlerin ve üre ile herhangi bir çapraz bağlanma göstermediği bulunmuştur. Sentezlenen nanopartiküllerin EPO'yu seçici bir şekilde idrar matriksinden izolasyonunu sağlayıp sağlayamadığı kontrol etmek için yapılan çapraz validasyon deneyleri sonucunda çok düşük konsantrasyonlarda (0.1 pg/mL) EPO'yu tespit edebilmiştir.

Günümüzde rekombinant eritropoetin ve analoglarının tespitinde WADA tarafından onaylanan (WADA Technical Document- TD2015EPO) elektroforetik (IEF-PAGE, SDS-PAGE ve SAR-PAGE) ve immunoblotting teknikleri ile yapılmaktadır. Bu tekniklerin uygulanması sırasında çok fazla analitik sürece (örnek hazırlama, immunopürifikasyon, CCD kamerada görüntüleme gibi) ihtiyaç vardır. Örneğin numune hazırlama aşamasında oldukça yüksek miktarda (20 mL) idrar numunesi ile başlanması ve EPO tespitinin yapılabilmesi için idrarın en az 400 kat konsantre edilmesi gerekmektedir. Bu maddelerin tespitinde tarama ve doğrulama analizinde farklı elektroforetik tekniklerin kullanımı zorunlu kılınmaktadır. EPO analizlerinin tespitinde oldukça fazla miktarda yöntem, kimyasala, zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Bu yüzden EPO stimüle edici ajanların tespitine yönelik kullanılan mevcut metotlarda karşılaşılan zorlukların aşılabilmesi ve idrar ya da kan matriksinden çok daha düşük miktarları tespit edebilmek amacıyla daha ucuz, seçici ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Çalışmamızda kullandığımız antikor ile modifiye edilmiş nanopartiküller yüksek seçicilikte hedef analite bağlanarak bir ön zenginleştirme analizine ihtiyaç duymadan tek basamakta rEPO'yu çözültiden uzaklaştırabilmektedir. Kullanılan diğer metotların aksine rEPO'yu büyük örnek hacimlerinden izole ve konsantre etmeye ihtiyaç duyulmayan bir tekniktir. Biorad orijinli kontrol idrar örneklerine uygulandığında, idrarda endojen olarak bulunan diğer proteinler ile çapraz bağlanma olmaksızın hedef analit analizi gerçekleştirilmiştir. EPO, antikor ile modifiye edilmiş nanopartiküllere bağladığında kolay bir şekilde manyetik ayırma ile ayırabilmektedir ve yıkama işlemlerinde sonra direkt SERS tekniği ile analiz edilebilmektedir.

Geliştirdiğimiz analiz yöntemlerin daha hızlı ve düşük maliyetli olduğundan protein analizinde kullanılan LCMS, ELISA ve jel elektroforezi (SDS-PAGE, IEF-PAGE ve

SAR-PAGE gibi) gibi tekniklere alternatif olduğuna inanıyoruz. Doping kontrol analizlerinde yasaklı maddelerin analizi için geliştirilen yöntemlerin kısa sürede tamamlanması, seçici ve yüksek hassasiyete sahip olması gerekmektedir. Geliştirdiğimiz yöntemlerden elde edilen veriler son derece tatmin edici olduğundan dolayı doping analizlerinde kullanılabileceğini düşünmekteyiz.



KAYNAKLAR

- [1] Ergen, E., Sporda ilaç kullanımının medikal ve etik yönleri. *Anti Doping Eğitimi*, (ed: Hıncal A, Daikara) Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 41-49, **1991**.
- [2] World Anti-Doping Code, <https://www.wada-ama.org/en/resources/the-code/world-anti-doping-code> (Ocak , **2015**).
- [3] WADA Prohibited List, <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/prohibited-list> (Eylül,**2015**)
- [4] Krantz, S., Erythropoietin, *Blood*,**77**, 419-434, **1991**
- [5] Lasne, F., J. de Ceaurriz, Recombinant erythropoietin in urine - An artificial hormone taken to boost athletic performance can now be detected, *Nature*, 405,635-635, **2000**.
- [6] Lasne, F., Martin L., Crepin N., de Ceaurriz J., Detection of isoelectric profiles of erythropoietin in urine: differentiation of natural and administered recombinant hormones, *Analytical Biochemistry*, 311, 119-126, **2002**
- [7] Trout, G.J., Emslie ,K.R., Howe, C., Kazlauskas,R., Lasne, F.,An overview of testing for EPO at the Sydney 2000 Olympic Games and beyond. Recent advances in doping analysis, (eds: Schänzer, W., Geyer, H., Gotzmann, A., Mareck- Engelke, U.), *Sport und Buch Strauß*, Köln, 191-200, **2001**
- [8] Reichel, C., Recent developments in doping testing for erythropoietin, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 463-481,**2011**.
- [9] Kay, R.G., Creaser, C.S., Application of mass spectrometry-based proteomics techniques for the detection of protein doping in sports, *Expert Review of Proteomics*, 7,185-8, **2010**.
- [10] Guan, F. , Uboh, C.E., Soma, L.R., Maylin, G., Jiang, Z., Chen ,J., Confirmatory Analysis of Continuous Erythropoietin Receptor Activator and Erythropoietin Analogues in Equine Plasma by LC-MS for Doping Control, *Analytical Chemistry*, 82, 9074-9081, **2010**.
- [11] Guan, F., Uboh, C.E., Soma, L.R., Birks, E., Chen, J., Mitchell, J., You ,Y., Rudy, J., Xu ,F., Li ,X., Mbuy, G., *Analytical Chemistry*, 79,4627-4635, **2007**.
- [12] Ueki, M., Kishikawa, Y., Ohtsuki,T., Novel methods for identification of recombinant glycoprotein hormones, <https://www.wadaama.org/en/resources/research/novel-methods-for-identification-of-recombinant-glycoprotein-hormones-extension> (Kasım, **2015**).
- [13] Boyd, S., Bertino, M.F., Seashols, S.J., Raman spectroscopy of blood samples for forensic applications, *Forensic Science International*, 208, 124–128, **2011**.

- [14] Tripp, R.A., Dluhy, R.A., and Zhao, Y., Novel nanostructures for SERS biosensing, *Nano Today*, 3, 31-37, **2008**
- [15] Zhang, Y., Hong, H., Cai, W., Imaging with Raman Spectroscopy, *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 11, 654–661, **2010**.
- [16] Stiles, P.L., Dieringer, J.A., Shah, N.C., Surface-enhanced Raman Spectroscopy, *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 601-626, **2008**.
- [17] Chang, R.K., Furtak, T.E., *Surface enhanced Raman scattering*. (eds: Chang, R.K., Furtak, T.E.), Plenum, New York, **1982**.
- [18] Shabmukh, S., Jones, L., Driskell, J., Rapid and sensitive detection of respiratory virus molecular signatures using a silver nanorod array SERS substrate, *Nano Letters*, 6, 2630-2636, **2006**.
- [19] Han, X.X., Zhao, B., Ozaki, Y., Surface-enhanced Raman scattering for protein detection, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 1719-1727, **2009**.
- [20] Smith, E., Dent, G., *Modern Raman spectroscopy – A practical approach*. John Wiley & Sons Ltd., England, 225, **2005**.
- [21] McLaughlin, G., Doty, K.C., Lednev, I.K., Discrimination of human and animal blood traces via Raman spectroscopy, *Forensic Science International*, 238, 91–95, **2014**.
- [22] Liu, Y., Chao, K., Nou, X., Feasibility of colloidal silver SERS for rapid bacterial screening, *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety*, 3, 100–107, **2009**.
- [23] Fox, S.A., Shanblatt, A.A., Beckman, H., Raman spectroscopy differentiates squamous cell carcinoma (SCC) from normal skin following treatment with a high-powered CO₂ laser, *Lasers Surgery Medicine*, 46, 757-772, **2014**.
- [24] Agoston, R., Izake, E.L., Sivanesan, A., Lott, W.B., Sillence, M., Steel, R., Rapid isolation and detection of erythropoietin in blood plasma by magnetic core gold nanoparticles and portable Raman spectroscopy, *Nanomedicine*, 12, 633-641, **2016**
- [25] Hughes, J., Izake, E.L., Lott, W.B., Ayoko, G.A., Sillence, M., Ultra sensitive label free surface enhanced Raman spectroscopy method for the detection of biomolecules, *Talanta*, 130, 20-25, **2014**.
- [26] Kurtz, A., Erythropoietin: structure, function, origin, *Advances in Nephrology*, 16, 371-378, **1987**.
- [27] Anagnostov, A., Erythropoietin: a haemopoietic hormone produced by the kidney, *Seminars in Nephrology*, 5, 104-117, **1985**.
- [28] Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D., *Molecular Biology of The Cell*, New York, Garland Publishing, **1994**
- [29] Price, A.H., Erythropoietin: physiology, clinical perspective, disease indications, *Erythropoiesis*, 1, 14-18, **1989**.

- [30] Takeuchi, M., Inoue, N., Strickland, T.W., Relationship between sugar chain structure and biological activity of recombinant human erythropoietin produced in chinese hamster ovary cells, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86,7819-7822, **1989**.
- [31] Choi, D., Kim, M., Park, J., Erythropoietin: physico and biochemical analysis. *Journal of Chromatography*, 687,189-99, **1996**.
- [32] Farell,F., Lee,A., the erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues, *Oncologist*, 5,18-30, **2004**.
- [33] Noguchi, C.T., Asavaritikrai, P., Teng, R., Jia., Y., Role of erythropoietin in the brain, *Critical Reviews In Oncology Hematology*, 64,159-171, **2007**.
- [34] Egrie,J.C., Brown, J.K., Development and charecterization of novel erythropoiesis stimulating protein (NESP), *Nephrology Dialysis Transplantation*, 16, 3-10, **2001**.
- [35] Sytkowski,A.J., Denaturation and renaturation of human erythropoietin, *Biochemical and Biophysical Research Communications*,96,143-149, **1980**.
- [36] Goldwasser, E., Kung, C.K.H., Eliason, J., On the mechanism of erythropoietin-induced differentiation . XIII. The role of sialic acid in erythropoietin action, *The Journal of Biological Chemistry*, 249, 4202-4206, **1974**.
- [37] Lasne, F., Thioulouse, J., Martin, L., de Ceaurriz, J., Detection of recombinant human erythropoietin in urine for doping analysis: Interpretation of isoelectric profiles by discriminant analysis, *Electrophoresis*, 28,12, 1875-1881, **2007**.
- [38] Structure of EPO, <http://www.steroidreport.com/tag/epo>, (Haziran, **2016**).
- [39] Allan, J.E., Erythrokinetics, *Hematology*, (eds: Williams, W.J., Ernest, B., Allan, J.E., Lichman, M.A.), New York, McGraw Hill, 393-397, **1991**.
- [40] Gutmann, F.D., Schwartz, J.C., Pathogenesis of anemia secondary to chronic renal failure, *Erythropoietin in Clinical Applications*, (eds:Garnick, M.B.) , New York, Marcel Dekker, 105-140, **1990**.
- [41] Fandrey,J., Jeclmann, W., Siegers, C.P., Control of the production of erythropoietin in hepatoma cell cultures, *Funktionsanal Biological Systeme*, 13, 157-163, **1993**.
- [42] Wide, L, Bengtsson, C., Birgegard , G., Circadian rythm of erythropoietin in human serum , *British Journal of Haematology*, 72, 85-90, **1989**.
- [43] Spivak, J.L.,Barnes, D.C., Fuchs, E., Quinn, T.C., serum immunoreactive erythropoietin in HIV-infected patients, *The Journal of the American Medical Association*, 261,3104-3107, **1989**.
- [44] Jelkmann, W., Physiology and pharmacology of erythropoietin, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 40, 302-309, **2013**.
- [45] Fisher, J.W., Erythropoietin: physiology and pharmacology update, *Experimental Biology and Medicine*, 228,1-1, **2003**.

- [46] Krantz, S.B., Jacobson, L., Erythropoietin and the regulation of erythropoiesis, *Chicago: University of Press*, **1970**.
- [47] Sytkowski, A.J., *Erythropoietin: Blood, Brain and Beyond*, Wiley –VCH Verlag GmbH co, 73-88, **2006**.
- [48] Skibeli, V., Nielsen-Lie, G., Torjesen, P., Sugar profiling proves that human serum erythropoietin differs from recombinant human erythropoietin, *Blood*, 98,3626-34, **2001**.
- [49] Storrington, P.L., Tiplady, R.J., Gaines, Das R.E., Stenning, B.E., Lamikanra, A., Rafferty, B., Epoetin alfa and beta differ in their erythropoietin isoform compositions and biological properties, *British Journal of Haematology*, 100, 79-89, **1998**.
- [50] Bunn, H.F., Erythropoietin, *Cold Spring Harbor Perspectives Medicine*, 3, 1-26, **2013**.
- [51] Svensson, E.C., Soreghan, B., Paulson, J.C., Organization of the beta-galactoside alpha 2,6-sialyltransferase gene, evidence for the transcriptional regulation of terminal glycosylation, *Journal of Biological Chemistry*, **265**, 20863-8, **1990**.
- [52] Shahrokh, Zç, Royle, L., Saldova, R., Bones, J., Abrahams, J.L., Artemenko, N.V., Flatman, S., Davies, M., Baycroft, A., Sehgal, S., Heartlein, M.W., Harvey, D.J., Rudd, P.M., Erythropoietin produced in a human cell line (Dynepo) has significant differences in glycosylation compared with erythropoietins produced in CHO cell lines, *Molecular Pharmaceutics*, 8, 286-296, **2010**.
- [53] Dehnes, Y., Hemmersbach, P., Effect of single doses of methoxypolyethylene glycol-epoetin beta (CERA, Mircera™) and epoetin delta (Dynepo™) on isoelectric erythropoietin profiles and haematological parameters, *Drug Testing and Analysis*, 3, 291-9, **2011**.
- [54] WADA Technical Document –Harmonization of analysis and reporting of erythropoiesis stimulating agents (esas) by electrophoretic techniques, <https://www.wada-ama.org/en/resources/science-medicine/td2014-epo>, (Eylül, **2014**)
- [55] Guerrero, V.B., Validación y caracterización de un método inmuno-electroforético para la detección de eritropoyetina recombinante y análogos. Tesis Doctoral, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, **2007**.
- [56] De Almeida Bento, R.M., Damasceno, L.M.P., De Aquino Neto, F.R., Recombinant human erythropoietin in sports: a review, *Brasileira de Medicina do Esporte*, 9,181-190, **2003**.
- [57] Lappin, T.R., Maxwell, A.P., Johnston, P.G., EPO's Alter Ego: Erythropoietin Has Multiple Actions, *Stem Cells*, 20,485-492, **2002**.
- [58] Adamson, J.W., Eschbach, J.W., Treatment of the Anemia of Chronic Renal Failure with Recombinant Human Erythropoietin, *Annual*

- Review of Medicine*, 41,349-360, **1990**.
- [59] Vogel, G., A Race to the Starting Line, *Science*, 305, 632-5, **2004**.
- [60] Westermeier, R., *Electrophoresis in Practise*, fourth edition, Wiley –VCH Verlag GmbH co, **2005**.
- [61] Reichel,C.,Abzieher,F.,Geisendorfer, SARCOSYL-PAGE: a new method for the detection of MIRCERA and EPO-doping in blood, *Drug Testing and Analysis*,1,494-504, **2009**.
- [62] Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari, R.R., and Feld, M.S., Surface enhanced non-linear Raman scattering at the single-molecule level, *Chemical Physics*, 247, 155-162, **1999**.
- [63] Venkata, R.C., *The molecular scattering of light*, **1930**.
- [64] Zhu, G., Zhu, X.,Fan, Q., and Wan, X., Raman spectra of amino acids and their aqueous solutions, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 78, 1187-1195, **2011**.
- [65] B. Schrader, Moore, D.S., *Laser-Based Molecular Spectroscopy For Chemical Analysis: Raman Scattering Processes*, **1997**.
- [66] Doğan, Ü., *Preparation And Characterization Of Surface Enhanced Raman Scattering Substrate Through Electro Deposition Of Silver-Pedot Film On Ito Glass Surface*, Orta Doğu Teknik Üniversitesi, **2011**.
- [67] Das, R.S. and Agrawal, Y.K., Raman spectroscopy: Recent advancements, techniques and applications, *Vibrational Spectroscopy*, 57, 163-176, **2011**.
- [68] Pelletier, M.J., Pelletier, C.C., RAMAN SPECTROSCOPY Instrumentation, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. (eds: Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C., Elsevier, Oxford, 94-104, **2005**.
- [69] Kneipp, K., Kneipp, H., Itzkan, I., Dasari , R. R., Feld, M. S., Chemical Analysis by Raman Spectroscopy, *Chemical Reviews*, 99(10), 2957-2976, **1999**.
- [70] Güven, B., *Gıda Uygulamalarına Yönelik Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisini Temel Alan Biyoanaliz Yöntemlerinin Geliştirilmesi*, Hacettepe Üniversitesi, **2011**
- [71] Movasaghi, Z., Rehman, S., Rehman, I.U., Raman Spectroscopy of Biological Tissues, *Applied Spectroscopy Reviews*, 42, 493-541, **2007**.
- [72] Pelletier, M.J., Pelletier, C.C., RAMAN SPECTROSCOPY Instrumentation, *Encyclopedia of Analytical Science (Second Edition)*. (eds: Worsfold, P., Townshend, A., and Poole, C., Elsevier, Oxford, 94-104, **2005**.
- [73] Grasselli, J.G., Bulkin, B.J., *Analytical Raman Spectroscopy; Chemical Analysis*, 114; John Wiley&Sons, New York, **1991**.
- [74] Ferraro, J.R., Nakamoto, K., Brown, C.W., *Introductory Raman Spectroscopy*, 2nd edition, Elsevier, **2003**.

- [75] Zavgorodnev., Y.V., Prokhorov, K.A. , Nikolaeva, G.Y. , Sagitova, E.A. , Pashini, P.P. , Kovalchuk, A.A., Klyamkina, A.N. , Nedorezova, P.M. , Novokshonova, L.A., Ushakova, T.M. , Starchak, E.E., Shklyaruk, B.F., Guseva, M.A., Donfac, P., Materny, A., *Raman structural study of random olefin copolymers*, *Advanced Laser Technologies* 12, Switzerland, **2012**.
- [76] Moldenhauer, J., Yvon, P., *Environmental Monitoring Using Scan RDI Polym'air J. Enviromental Monitoring: A Comprehensive Handbook*, River Grove: IL and Bethesda, MD. 249-260, **2005**.
- [77] Westa, M.J., Wentb, M.J., Detection of drugs of abu-se by Raman spectroscopy, *Drug Testing and Analysis*,3,532–538, **2011**.
- [78] Yolanda Picó, *Chemical Analysis of Food: Techniques and Applications*, Elsevier, USA, **2012**.
- [79] Ersöz, A., *Aletli Analiz*, (A. Ersöz, Ed.), Vol. 1 Anadolu Üniversitesi, Eskişehir, **2010**.
- [80] Ochsenkuhn, M.A., Campbell, C.J., Biomedical SERS Studies Using Nanoshells , *Raman Spectroscopy for Nanomaterials Characterization*, (eds: Challa SSR Kumar), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg,658, **2012**.
- [81] Fleischmann, M., Hendraa, P.J., McQuillana, A.J., Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters* , 26, 163, **1974**.
- [82] Schlucker, S., Surface-enhanced Raman spectroscopy:Concepts and chemical applications, *Angewandte Chemie International Edition*, England , 53, 4756-4795, **2014** .
- [83] Yang,J., Li, J.B., Gong, Q.H., High aspect ratio SiNW arrays with Ag nano particles decoration for strong SERS detection, *Nanotechnology*, 25,465-707, **2014** .
- [84] Maier, S.A., *Plasmonics: Fundamentals and Applications*,Springer,Berlin, **2007**.
- [85] Wilson, A.J., Willets, K.A., Surface-enhanced Raman scattering imaging using noble metal nanoparticles, *Nanomedicine and Nanobiotechnology*,5,180–189, **2013**.
- [86] Sharma, B., Frontiera, R.R., Henry, A.I., Ringe, E., Richard, P.V.D., SERS: Materials, applications, and the future, *Materials Today*, 15,16-25,**2012**.
- [87] Schlucker,S., *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*, Wiley –VCH Verlag GmbH co,Germany, **2011**.
- [88] Westermeier, R., Naven, T., *Proteomics in pratctise: a laboratory manual of proteoma analysis*, Wiley –VCH, Weinheim, **2002**.
- [89] Kneipp, K., Moskovits, M., Kneipp, H., *In: Surface-enhanced Raman Scattring: physics and applications*, Springer, Berlin Heidelberg New York, **2006**.

- [90] Eng, L.H., schlegel, V., Wang, D., Neujahr, H.Y., Stankovich, M.T., Cotton, T., Resonance Raman scattering and surface-enhanced resonance Raman scattering studies of oxido-reduction of cytochrome c3, *Langmuir*, 12, 3055-3059, **1996**.
- [91] Bizzarri, A.R., Cannistraro, S., Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopy Signals from Single Myoglobin Molecules, *Applied Spectroscopy*, 56, 1531-1537, **2002**.
- [92] Cao, Y.C., Jin, R., Nam, J.M., Thaxton, C.S., Mirkin, C.A., Raman Dye-Labeled Nanoparticle Probes for Proteins, *Journal of The American Chemical Society*, 125, 14676-14677, **2003**.
- [93] Gong, J.L., Liang, Y., Huang, Y., Chen, J.W., Jiang, J.H., Shen, G.L., Yu, R.Q., Ag/SiO₂ core-shell nanoparticle-based surface-enhanced Raman probes for immunoassay of cancer marker using silica-coated magnetic nanoparticles as separation tools, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1501-1507, **2007**.
- [94] Güven, B., Başaran-Akgül, N., temur, E., Tamer, U., Boyacı, I.H., Sers-based sandwich immunoassay using antibody coated magnetic nanoparticles for escherichia coli enumeration, *Analyst*, 136, 740-748, **2011**.
- [95] Sebahattin Gürmen and Ebin, B., Nanopartiküller ve Üretim Yöntemleri - 1, *Metalurji Dergisi*, **2008**.
- [96] Aroca, R.F., Alvarez-Puebla, R.A., Pieczonka, N., Sanchez-Cortez, S., Garcia-Ramos, J.V., Surface-enhanced Raman scattering on colloidal nanostructures. *Advances in Colloid and Interface Science*, 116, 45-61, **2005**.
- [97] Vo-Dinh, T., Surface-enhanced Raman spectroscopy using metallic nanostructures. Trends, *Analytical Chemistry*, 17, 557-582, **1998**.
- [98] Zheng, J.W., Zhou, Q., Zhpu., Y.G., Lu., T.H., Cotton., T.M., chumanov, G., surface-enhanced resonance Raman spectroscopic study of yeast iso-1-cytochrome c and its mutant, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 530, 75-81, **2002**.
- [99] Yguerabide, J., Yguerabide, E.E., Light-scattering submicroscopic particles as highly fluorescent analogs and their use as tracer labels in clinical and biological applications-i. Theory, *Analytical Biochemistry*, 262, 137-156, **1998**.
- [100] Jang, S., Park, J.S., Shin, S., Yoon, C., Choi, B.K., Gong, M.S., Joo, S.W., Adsorption of 4-biphenylmethanethiolate on different-sized gold nanoparticle surfaces. *Langmuir*, 20, 1922, **2004**.
- [101] Weaver, G.C., Norrod, K., Surface enhanced Raman spectroscopy: a novel physical chemistry experiment for the undergraduate Laboratory, *Journal of Chemical Education*, 75, 621-624, **1998**.
- [102] Lee, P.C., Meisel, D., Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols. *Journal of Physical Chemistry*, 86, 3391-3395, **1982**.

- [103] Nickel, U., Mansyreff, K., Schneider, S. , Production of monodisperse silver colloids by reduction with hydrazine: the effect of chloride and aggregation on SER(R)S signal intensity, *Journal of Raman Spectroscopy*, 35, 101–110, **2004** .
- [104] Canamares, M.V., Garcia-Ramos, J.V., Gomez-Varga, J.D., Domingo, C., Sanchez-Cortes, S., Comparative study of the morphology, aggregation, adherence to glass, and surface-enhanced Raman scattering activity of silver nanoparticles prepared by chemical reduction of Ag⁺ using citrate and hydroxylamine, *Langmuir*, 21, 8546–8553, **2005**.
- [105] Leopold, N., Lendl, B., A new method for fast preparation of highly surface-enhanced Raman scattering (SERS) active silver colloids at room temperature by reduction of silver nitrate with hydroxylamine hydrochloride, *Journal of Physical Chemistry* , 107, 5723–5727, **2003**.
- [106] Devaux, P.H., Lopez-Montero, I., Bryde, ., Proteins involved in lipid translocation in eukaryotic cells, *Chemistry and Physics of Lipids* ,141 , 119–132, **2006**.
- [107] Frens, G., Controlled nucleation for regulation of particle-size in monodisperse gold suspensions, *Nature Physical Science* , 241, 20–22, **1973** .
- [108] Njoki, P.N., Lim, I.S., Mott, D., Park, H.-Y., Khan, B., Mishra, S., Sujakumar, R., Luo, J., Zhong, C.-J., Size Correlation of optical and spectroscopic properties for gold nanoparticles, *Journal of Physical Chemistry*, 111, 14664–14669, **2007**.
- [109] Saldan, I., Semenyuk, Y., Marchuck, I., Reshetnyak., O.V., Chemical synthesis and application of palladium nanoparticles, *Journal of Materials Science*,50, 2337-2354 ,**2015**.
- [110] Guo, S.J., Dong, S.J., Wang, E.K., Rectangular silver nanorods: controlled preparation, liquid-liquid interface assembly, and application in Surface-enhanced Raman scattering, *Crystal Growth & Design* , 9, 372–377, **2009**.
- [111] Orendorff, C.J., Gole, A., Sau, T.K, Murphy, C.J., Surface-enhanced Raman spectroscopy of self-assembled monolayers: sandwich architecture and nanoparticle shape dependence, *Analytical Chemistry* ,77, 3261–3266, **2005**.
- [112] Jena, B.K., Raj, C.R., Seedless, surfactantless room temperature synthesis of single crystalline fluorescent gold nanoflowers with pronounced SERS and electrocatalytic activity, *Chemistry of Materials* , 20, 3546–3548, **2008**.
- [113] Gole, A, Murphy, C.J., Seed-mediated synthesis of gold nanorods: role of the size and nature of the seed, *Chemistry of Materials* , 16, 3633–3640, **2004**.
- [114] Orendorff, C.J., Gearheart, L.A., Jana, N.R., Murphy, C.J., Aspect ratio dependence on surface enhanced Raman scattering using silver and gold nanorod substrates, *Journal of Physical Chemistry*, 8, 165–170, **2006**.

- [115] Grabbe, E.S., Buck, R.P., Surface-enhanced Raman-spectroscopic investigation of human immunoglobulin-G adsorbed on a silver electrode, *Journal of the American Chemical Society*, 111, 8362-8366, **1989**.
- [116] Murgida, D.H., Hilderbrandt, P., Electron-transfer processes of cytochrome C at interfaces. New insights by surface-enhanced resonance Raman spectroscopy, *Accounts of Chemical Research*, 37, 854-861, **2004**.
- [117] Drachev, V.P., Nashine, V.C., Thoreson, M.D., Ben-Amotz, D., Davisson, V.J., Shalae, V.M., Adaptive silver films for detection of antibody-antigen binding, *Langmuir*, 21, 8368-8373, **2005**.
- [118] Tamer, U., Gündoğdu, Y., Boyacı, İ., Pekmez, K., Synthesis of magnetic core-shell Fe₃O₄-Au nanoparticle for biomolecule immobilization and detection, *Journal of Nanoparticle Research*, 12, 1187-1196, **2010**.
- [119] Tamer, U., Cetin, D., Suludere, Z., Boyacı, İ., Temiz, H., Yegenoglu, H., Daniel, P., Dinçer, İ., Elerman, Y., Gold-Coated Iron Composite Nanospheres Targeted the Detection of Escherichia coli, *International Journal of Molecular Sciences*, 14, 6223-6240, **2013**.
- [120] Temur, E., Boyacı, İ., Tamer, U., Unsal, H., Aydoğan, N., A highly sensitive detection platform based on surface-enhanced Raman scattering for Escherichia coli enumeration, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 397, 1595-1604, **2010**.
- [121] Jana, N.R., Gearheart, L., Murphy, C.J., Seed-mediated growth approach for shape-controlled synthesis of spheroidal and rod-like gold nanoparticles using a surfactant template, *Advanced Materials*, 13, 1389-1393, **2001**.
- [122] Rogue, A.C.A., Bispo, A., Pinheiro, A.R.N., Antunes, J.M.A., Gonçalves, D., Ferreira, H.A., Antibody immobilization on magnetic particles, *Journal of Molecular Recognition*, 22, 77-82, **2009**.
- [123] Büyüköz, G.G., Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi ile DNA Hassas Tayini ve Nanopartiküller Arası Mesafelerin Optimizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, **2014**.
- [124] Huang, T., Geng, T., Sturgis, J., Li, H., Gomez, R., Bashir, R., Bhunia, A.K., Robinson, J.P., Ladisch, M.R., Lysozyme for capture of microorganisms on protein biochips, *Enzyme and Microbial Technology*, 33, 958-966, **2003**.
- [125] Cai, H., Xu, C., He, P., Fang, Y., Electrochemical detection of sequence-specific DNA using a DNA probe labeled with aminoferrrocene and chitosan modified electrode immobilized with ssDNA, *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 510, 78-85, **2001**.

- [126] Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve verifikasyonu, http://turklab.org/tr/TURKLAB_Rehber_01_Rev.2.pdf, (Haziran,**2015**)
- [127] Kang, M.J., Shin, S.M., Yoo, H.H Kwon, O.S., Jin,C., Characteristics of IEF Patterns and SDS-PAGE Results of Korean EPO Biosimilars, *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 31,2493-2496, **2010**.
- [128] Dauly,C., Garcia, P., Louette, J., Cormant, F., Oppermann, M., Popot, M-A., Bonnaire,Y.,Bailly-Chouriberry,L., Detection of rHuEPOs in Horse Plasma Samples at Low pg/mL Levels Employing High-Resolution MS Strategies,http://apps.thermoscientific.com/media/SID/LSMS/PDF/ASMS/ASMS12/ASMS12_M121_CDauly-sm.pdf, **2015**.
- [129] Tang, J., Guo, L., Shen, R., Yu,T., Xu, H., Liu,H, Ma, X., Xie, J., A Conjugated Aptamer-Gold Nanoparticle Fluorescent Probe for Highly Sensitive Detection of rHuEPO, *Analyst*, ,135,2924-2929, **2010**.
- [130] Bailly-Chouriberry, L., Cormant,F., Garcia, P., Lönnberg, M., Szwandt, S., Bondesson. U., Popot. M.A., Bonnaire, Y., A new analytical method based on anti-EPO monolith column and LC-FAIMS-MS/MS for the detection of rHuEPOs in horse plasma and urine samples, *Analyst*, 21, 2445-53, **2012** .
- [131] Haselberg, R., de Jong, G.J., Somsen, G.W., Low-flow sheathless capillary electrophoresis-mass spectrometry for sensitive glycoform profiling of intact pharmaceutical proteins, *Analytical Chemistry* , 85, 2289-96, **2013** .
- [132] Zhang, Z., Guo, L., Tang, J., Guo ,X., Xie, J., An aptameric molecular beacon-based "Signal-on" approach for rapid determination of rHuEPO-alpha, *Talanta* ,80, 985-90, **2009** .
- [133] Sun J, Guo A, Zhang Z, Guo L, Xie J., A conjugated aptamer-gold nanoparticle fluorescent probe for highly sensitive detection of rHuEPO- α , *Sensors (Basel)* ,11,10490-501, **2011**.
- [134] Lönnberg, M., Drevin, M., Carlsson, J., Ultra-sensitive immunochromatographic assay for quantitative determination of erythropoietin , *Journal of Immunological Methods*. 339, 236-44, **2008**.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Yeşim SOMAY SELBES
Doğum Yeri : Ankara
Medeni Hali : Evli
E-posta : yesimsomay@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Türkiye Doping Kontrol Merkezi
Sıhhiye/ANKARA

Eğitim

Lise : M. R. UZEL Anadolu Kimya Teknik Lisesi
Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya AD.
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp AD.

Yabancı Dil ve Düzeyi

İngilizce (İyi Seviyede)

İş Deneyimi

2003-2009 :Özel Tıp Laboratuvarı
2009-2013 :Hacettepe Üniversitesi Merkez Laboratuvarı Mikrobiyoloji Bölümü
2013-Devam Ediyor :Hacettepe Üniversitesi Türkiye Doping Kontrol Merkezi

Deneyim Alanları

Kimya, Biyokimya, Mikrobiyoloji, Moleküler Biyoloji, Adli Biyoloji ve Biyoteknoloji,
Nanoteknoloji

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

-

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Surface enhanced Raman Probe for Rapid Detection of Erythropoietin in Urine
(2016 – Yayına Gönderildi)

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar

-



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 27/06/2016

Tez Başlığı / Konusu: DOPING KONTROL ANALİZLERİNDE ERITROPOETİN TESPİTİNE
YÖNELİK SPECTROSKOPİK METOTLARIN GELİŞTİRİLMESİ

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler ve d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 68 sayfalık kısmına ilişkin, 27/06/2016 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından İZMİRİN adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7 tür.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~değil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: YESİM SOMAY SELBES
Öğrenci No: 1112145228
Anabilim Dalı: NANOTEKNOLOJİ VE NANOTİP
Programı:
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

27/06/2016

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Necdet Şenol
(Unvan, Ad Soyad, İmza)