

Gold Nano-Particle Based Localized Plasmon Resonance Biosensors

Saime Cigdem Yorulmaz
Department of Biotechnology, Selçuk University
42250 Selcuklu, Konya, Turkey
E-mail: cigdem.yorulmaz@selcuk.edu.tr

Abstract

Noble metal nanoparticles exhibit localized surface plasmon resonances (LSPR) as a result of excitation by light, are used for label-free biosensing applications and bioimaging. Particularly, due to the high sensitivity of the nanoparticles to the change in local refractive index as a result of the interaction of the nanoparticles with biomolecules, molecular interactions that can be spectrally measured allow numerous studies on this subject. LSPR, used as an optical-based transducer in biosensors, depends on the size, shape and material properties of the metal nanoparticles. Single metal nanoparticles with large surface area and strong optical properties have unique chemical and physical properties compared to bulk metals. Nanoparticles can be synthesized in different forms such as nano-sphere, nano-rod, nano-wire, nano-cube with noble metals such as silver, copper and gold. Silver and gold are more preferred than copper because they are less reactive and more stable. Especially gold nanoparticles (AuNP) with higher conductivity and chemical stability are widely used in biotechnology. This review includes optical properties, synthesis techniques, plasmonic sensing methods and biosensor applications of commonly used nanosphere and nanorod AuNPs.

Keywords: Localized surface plasmon resonance, gold nanoparticles, biosensors, affinity, conjugation, microscopy, spectroscopy, bioreceptor

DOI: 10.7176/JSTR/5-12-21

Altın Nano-Parçacık Esaslı Lokalize Plazmon Rezonans Biyosensörleri

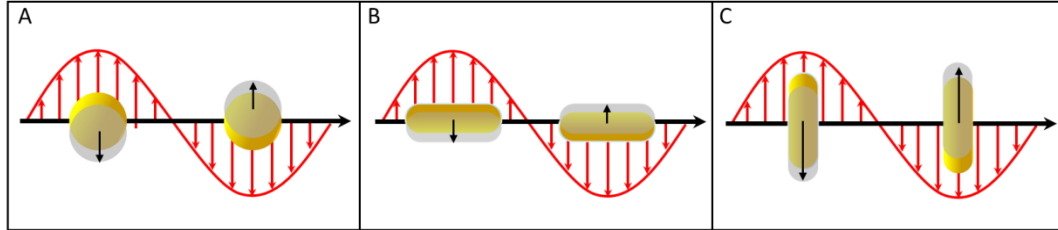
Özet

Asal metal nanoparçacıkların ışık ile uyarılmaları sonucu gösterdikleri lokalize yüzey plazmon rezonansları (LYPR) etiketsiz biyosensör uygulamalarında ve biyo-görüntüleme kullanılmaktadır. Özellikle nanoparçacıkların biyomoleküller ile etkileşimi sonucu değişen lokal kırılma indisine karşı yüksek hassasiyet göstermesi sonucu moleküler etkileşimlerin spektral olarak ölçülebilir olması bu konuda sayısız çalışma yapılmasına imkan sağlamaktadır. Biyosensörlerde optik tabanlı dönüştürücü olarak kullanılan LYPR, metal nanoparçacıkların boyutu, şekli ve malzeme özelliklerine bağlıdır. Geniş yüzey alanı ve güçlü optik özellikleri olan tek metal nanoparçacıklar, yığın (bulk) metaller göre özgün kimyasal ve fiziksel özelliklere sahiptirler. Gümüş, bakır ve altın gibi asal metaller ile nano-küre, nano-çubuk, nano-tel, nano-küp gibi farklı şekillerde nanoparçacıklar sentezlenebilir. Daha az reaktif ve daha kararlı olan gümüş ve altın, bakıra göre daha fazla tercih edilir. Özellikle altın nanoparçacıklar (AuNP) yüksek iletkenliği ve kimyasal kararlılığı ile biyoteknolojide yaygın olarak kullanılırlar. Bu derlemede, sıklıkla kullanılan nano-küre ve nano-çubuk AuNPların optik özellikleri, üretim teknikleri, plazmonik sinyal algılama yöntemleri ve biyosensör uygulamalarına yer verilecektir.

Anahtar Kelimeler: Lokalize yüzey plazmon rezonans, altın nanoparçacık, biyosensör, afinite, konjügasyon, mikroskop, spektroskop, biyoreseptör

1. Giriş

Metalik yüzeylerdeki serbest elektronların elektromanyetik dalgalarla uyarılması sonucu oluşan kolektif salınımlarına yüzey plazmonları denir. Metal nanoparçacıkların (NP) yüzeyindeki elektronlar, boyutlarından daha büyük dalgaboyu ile uyarıldıklarında salınım yaparlar ve NPların yüzeyinde lokalize olmuş elektromanyetik alan oluşur. Gelen elektromanyetik dalganın salınımları, NPların elektromanyetik salınımları ile rezonansa girince rezonans salınım frekansı ile karakterize edilen lokalize yüzey plazmon rezonansları (LYPR) oluşur.



Şekil 1 A) Nano-küre ve B-C) Nano-çubuğun ışık ile uyarılması, iletken bandındaki elektronların salınımına (lokalize yüzey plazmonları) sebep olur. Küresel nanoparçacıkta electron salınımı tek yönlü olurken, çubuk şeklinli nanoparçacıklarda elektron salınımları enlemsel ve boylamsal yönlerde olur.

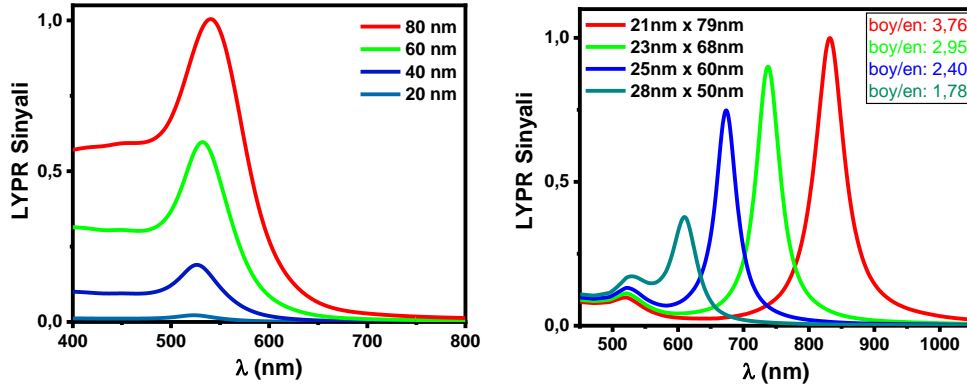
LYPR sayesinde parçacığın yüzeyindeki lokal elektrik alan uyarı elektrik alanına göre oldukça artar. Bu durum metal nanoparçacıklarda güçlü optik sönmülme ve saçılma sinyali olarak ortaya çıkarlar. Plazmon sinyali plazmon rezonans frekansında maksimumdur ve belirli dalgaboylarında yüksek kontrast ile arkaplan sinyalinden ayrılarak ölçülebilirler. Altın, gümüş gibi asal metal nanoparçacıklarda rezonans görünür dalgaboylarında oluşurken, yarı-iletken nanoparçacıklarda maksimum absorpsiyon kızılötesine yakın ve orta kızılötesinde oluşur (Toshiharu Teranishi ve ark. 2011). Biyoloji, tıp ve biyokimya alanlarındaki biyosensör uygulamalarında sıklıkla kullanılan bu özellik, metalik NPların şekil, boyut, homojenlik ve yüzey kaplamalarının kontrolü ile optimize edilebilir (Luis M. Liz-Marzán ve ark. 2006).

2. Lokalize Yüzey Plazmon Rezonansı (LYPR)

LYPR altın, gümüş gibi asal metallerden sentezlenmiş nanoparçacıkların koloidal süspansiyonlarının parlak renklerinden sorumlu özgün bir optik özelliktir. Plazmonik çalışmalarda özellikle altının tercih edilmesi ışığı yüksek verimlilikte soğurması ve saçmasından kaynaklanmaktadır. Altın nanoparçacık (AuNP) LYPRlarının sağladığı UV-VIS spektroskopisi ile ölçülebilen görünür bölgedeki (500-600 nm) güçlü absorpsiyon ve saçılma bantları, biyomoleküllerin LYPR bandında yaptığı değişikliklerin gözle görünür kolorimetrik algılanmasına olanak sağlar (Keke Chang ve ark. 2017, Boshi Liu ve ark. 2018, Yasaman-Sadat Borghei ve ark. 2019). LYPR bantlarının yeri AuNPların boyutları, homojenlikleri, şekilleri, boyut dağılımları, ve ayrıca ortamın dielektrik sabitine bağlıdır (Luis M. Liz-Marzán ve ark. 2006). Yani, bu parametrelerden herhangi birini modifiye etmek absorpsiyon dalgaboyunda kaymalara neden olacaktır. Örneğin, AuNP boyutunun büyümesi veya AuNPların kümelenmesi LYPR bandını yüksek dalgaboylarına kaydırır (kırmızıya kayma).

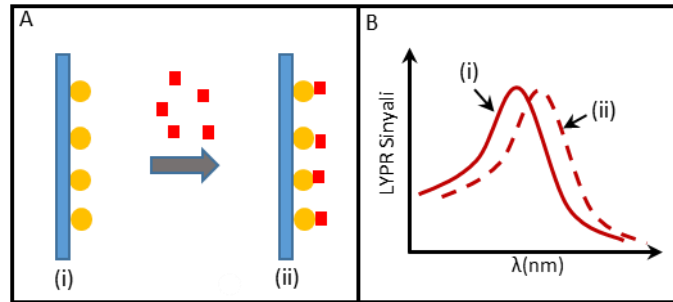
Sentezi ve analitik çözümü diğerlerine göre kolay olan küresel altın nanoparçacıkların plazmon spektrumuna bakıldığında görünür bölgede tek pike sahip oldukları gözlenir (Şekil 2). Bu parçacıkların optik özellikleri büyük ölçüde nanoparçacığın çapına bağlıdır. Çap büyüdükçe, bu küreler daha fazla ışık saçar. Bu yüzden, çapı 40-50 nm den büyük olan altın nanoküreler sıklıkla karanlık alan mikroskopisi tekniğinde biyogörüntüleme etiketi olarak kullanılırlar (Artur, C. G. et al. 2018).

Altın nano-çubuklar (AuNÇ) diğer altın nanoparçacıklar ile kıyaslandığında hacmine göre ışık ile etkileşecek geniş yüzeyleri olmasından dolayı araştırmacılar tarafından özel ilgi görür. Çubuk şeklinden dolayı iki LYPR bandı gözlemlenir (Şekil 2). İlk LYPR bandı, çap enindeki elektronların ışık ile etkileşiminden, ikinci LYPR bandı (red-shifted) nano-çubukların uzunluk enindeki elektronların ışık ile etkileşiminden oluşur. Genellikle AuNÇler görünür ışığa göre dokulara daha fazla girebilen yakın kızılötesi bandında absorpsiyon yapacak şekilde dizayn edilirler (Jackson, J. ve ark. 2018).



Şekil 2. Farklı boyutlarda küresel (sol) ve çubuk (sağ) şekilli nanoparçacıkların absorpsiyon spektrumlarının sırasıyla Mie teorisine ve Gans teorisine göre analitik çözüm sonuçları gösterilmektedir (D. R. Huffman 1998, Johnson, P. B. 1972, R. Gans, 1912). Nano-kürelerin absorpsiyon spektrumlarında tek pik görülürken, nanoçubukların absorpsiyon spektrumlarında en ve boy oranına bağlı olarak enlemsel ve boylamsal modlar oluşur; nano-çubukların spektrumlarında iki pik görülür.

Plazmon rezonans frekansı ortamın kırılma indisi değişimlerine de hassastır. Şekil 3'teki şematik gösterimde görüldüğü gibi, çözücü veya havaya göre yüksek kırılma indisine sahip organik moleküller AuNPlara bağlandığında, absorpsiyon bandında kaymalar görülür (Weihong Shi ve ark. 2012).



Şekil 3. Kırılma indisindeki değişime dayalı LYPR biyosensörlerin şematik gösterimi. A) Hedeflenen biyomolekülün nanoparçacığa bağlanması B) Bağlanma sonucu kırılma indisinin değişimiyle LYPR sinyalinin kayması.

3. Altın Nano-Parçacıklar

LYPR temelli biyosensörlerin geliştirilmesi ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalar incelendiğinde en çok tekli nanoparçacıkların kullanıldığı ve nanoparçacıkların dizi halinde sıralandıkları uygulamalar gözlemlenir. Tek nanoparçacık çalışmaları için çekirdekten başlatılan kimyasal sentez yöntemi ile üretilen parçacıkların kullanıldığı, dizi halinde nanoparçacıkların kullanılması ile yapılan çalışmalarda ise ağırlıklı olarak litografi yöntemi kullanıldığı gözlemlenmektedir. Tekli nanoparçacık çalışmaları için ağırlıklı olarak karanlık alan (dark field) görüntüleme yöntemi öne çıkarken, plazmonik dizi çalışmaları için spektroskopik yöntemler kullanılmıştır.

Plazmonik nanoparçacıkların görüntülenmeleri veya buldukları ortamda gerçekleşen değişimlerin LYPR özelliklerinde gösterdikleri değişimlerin algılanması ile sensör uygulamaları yapılmaktadır. Direkt görüntüleme uygulamalarında nanoparçacıklar bir etiket olarak immunoassay çalışmalarında kullanılırlar. Yüzeğe bağlı bir biyolojik moleküle spesifik antikorların yardımıyla ikili inkübasyon aşamasında altın bağlı antikorların yakalanması ve görüntülenmesi ile tanı ve tespit uygulamaları yapılabilir. Bunun ötesinde altın nanoparçacıklar spesifik antikor ile fonksiyonlandırılabilirler. Tanısı yapılması istenen molekül nanoparçacığa bağlı antikor ile yakalandığında nanoparçacığın lokal ortamındaki fiziksel ve kimyasal özelliklerin değişmesi, nanoparçacığın LYPR özelliklerini değiştirir. Bu değişimlerin ölçümü ile sensör uygulamaları yapılmaktadır. Sensör uygulamaları detaylarına girmeden önce küre ve çubuk şeklindeki nanoparçacıkların üretim yöntemlerini incelemek ve üretilen

nanoparçacıkların görüntülenmesi için kullanılan yöntemlerin çalışma prensibini anlamak faydalı olacaktır.

3.1 Küre ve Çubuk Şekilli Altın Nano-parçacıkların Üretim Yöntemleri

Altın nanoparçacıkların Romalılar zamanında bile camları renklendirmek için kullanıldıkları bilinmektedir. Nanoparçacıkların sentezine dair bilinen ilk bilimsel çalışma 1857 yılında Michael Faraday tarafından yapılmıştır (Faraday M 1857). Bu çalışmada altın kolloid üretiminin altın klorit sıvı solüsyonunun fosfor ile indirgenmesi sayesinde yapıldığı görülmüştür. Yakın dönemde, şekil ve boyut kontrolü sağlamak ve kaliteli nanoparçacık üretimini gerçekleştirebilmek için yeni parçacık sentezi çalışmaları yapılmıştır.

Küre şeklinde nanoparçacık üretimi için en kabul görmüş ıslak-kimya sentez yöntemlerinden biri suda kaynayan HAuCl_4 'ün sitrat indirgenmesine dayanır (Turkevich J ve ark. 1951). Sitrat burada hem indirgeme aracı olarak hem de parçacıkların topaklanmasını önlemek için kullanılır. 10 nm ve 100 nm çapları arasında altın nano-küre üretimi bu yöntem ile yapılabilir ancak çekirdeklenme ve büyütme adımları her zaman istenildiği şekilde kontrol edilemeyebilir. Bu yüzden süspansiyon içerisinde parçacık boyutu dağılımı iyi kontrol edilemez. Bu sorunu ortadan kaldırmak için çekirdek-aracılı büyütme yöntemleri üzerine çalışılmıştır. Bu yöntemde önce küçük metal parçacık çekirdekleri hazırlanır. Daha sonra büyütme solüsyonu içerisine konularak çekirdek ikincil çekirdeklenme ihtimalleri engellenerek büyütülür ve üretilen boyut daha hassas şekilde kontrol edilir. Bu yöntem altın (Yazhuo Shang ve ark. 2013, Marina Sokolsky-Papkov ve ark. 2019), gümüş (Mikac, L. ve ark. 2014, Dao Tri Thuc ve ark. 2016), platin (Matthias M. Koebel ve ark. 2008, Teranishi T ve ark. 1999) ve paladyum (Ying Wang ve ark. 2008) gibi metal NPLarın boyutunun başarılı bir şekilde kontrol edilmesini sağlar. Bu yöntem ile tek kristal yapısında nano-küreler üretmek mümkündür. Litografi yöntemi ile de parçacık üretimi yapılabilmektedir ancak kristal oryantasyonu belirli değildir ve morfolojik açıdan ıslak-kimya yöntemine göre daha dağınık yapıdadırlar.

Kolloid olarak çubuk şeklinde altın nanoçubuk üretimi ilk defa 1997'de HAuCl_4 'ün yüzeye etkin tanecikler ve farklı katkı maddeleri altında elektrokimyasal indirgeme sayesinde oluşturulmuştur (Yu, Y. Y. ve ark. 1997, Chang, S. S. ve ark. 1999). Bu yöntem ile boy-en oranı 1 ile 7 arasında olan nanoçubuklar üretilmiştir. Tamamiyle ıslak-kimya yöntemiyle altın (Jana, N. R. ve ark. 2001) ve gümüş (Jana, N. R. 2001) nano-çubuk sentezi ilk defa yapılmıştır. Çoklu ikizlenmiş sitrat ile stabilize edilmiş çekirdeğin üzerinde metal tuzunun indirgenmesi ile boy-en oranları 4 ile 18 arasında değişen çok iyi boyut kontrollü altın ve gümüş nanoparçacıkları üretmişlerdir. Büyütme yüzeye etkin CTAB malzemesi varlığında gerçekleştirilmiştir ve yüzey üzerinde ikili tabaka oluşumu dolayısıyla close-packed (111) yüzey üzerinde uzatılmış şekilli parçacık oluşumu tetiklenmiştir. Normalde verim miktarı düşük olmasına rağmen pH kontrolü ile artırılabilir (Busbee, B. D. ve ark. 2003). El-sayed grubu tarafından sentez verimini artırmak için büyütme solüsyonuna AgNO_3 eklenmiş ve sentez verimi boy-en oranı 2-5 olan nanoçubuklar için %100'e yakın değerlere çıkarılmıştır (El-Sayed, M. A. et al. 2003). El-sayed yöntemiyle üretilen parçacıklar tek-kristal halinde (100) büyüme yönünde üretilmiştir. Elde edilen verim dolayısıyla en çok tercih edilen ıslak-kimya nanoçubuk sentez yöntemidir. Küresel nanoparçacıklarda olduğu gibi litografi yöntemi ile de üretilebilirler ancak kristal yönleri ve morfolojileri ıslak kimyasal yöntemde erişilebilen kalite olamamaktadırlar.

Spektroskopik yöntemlerinin kullanılması ile nanoparçacıkların belirli dizilerde oluşturdukları spektral değerlerde değişimlerin izlenmesi için çip üretimi ihtiyacı olduğunda ıslak-kimyasal sentez yöntemi ile üretilen nanoparçacıkların kullanımı mümkün olamamaktadır. Özellikle belirli bir örüntüde ve sayıda nanoparçacığın istenildiği durumlarda litografi yöntemi gereklidir. Litografi yöntemi ile substrat üzerinde oluşturulması istenilen şekiller için bir maske oluşturulur. Substrat üzerine fotoresist kaplanır. Maske üzerindeki şekiller fotoresiste yazılarak yıkanır. Çıkan boşlukların metal tozu ile kaplanması sonrasında fotoresistin kaldırılması ile yüzey üzerinden istenilen örüntüde küresel veya çubuk şeklindeki nanoparçacık dizileri oluşturulur (Haynes, C. L. 2001). Her ne kadar kristal büyüme yönü kontrol edilemese de kolektif spektral özellikleri biyosensör uygulamalarında yer bulur.

3.2 Plazmonik Sinyal Algılama Yöntemleri

Görüntüleme sistemleri düşünüldüğünde ışık mikroskopları kullanılarak çok hassas ölçümler yapılabildiği literatürde gösterilmiştir (Yurt, A., ve ark. 2012, Olson, J. ve ark. 2015). Işık mikroskopu yeni gelişen yöntemler sayesinde çözünürlük limitini (resolution limit) aşarak ~10 nm hassaslığında ölçümler yapmaya izin verir hale gelmiştir (Backer, A.S. ve ark. 2014, Betzig, E. ve ark. 2006, Göttfert, F. ve ark. 2013).

Optik tabanlı görüntüleme sistemleri içerisinde floresan, saçılma ve absorpsiyon mikroskopisi ilk aklara gelen teknikler arasındadır. Bu yöntemlerle kullanıcı-dostu bir görüntüleme tekniği yüksek hassasiyet

sağlayacak şekilde geliştirilebilir. Son on yıl içerisinde cep telefonu kullanılarak bile lenssiz görüntüleme, kağıt tabanlı görüntüleme sistemleri gibi portatif sistemlerin kullanımı sayesinde 50 nm çapında polyester nanoparçacıklar gibi küçük nanoparçacıklar görüntülenebilmiştir (McLeod, E. ve ark. 2015). Nanoparçacıkların optik yöntemler ile görüntüleme çalışmaları düşünüldüğünde bir ışık ile örneğin uyarılması ve uyarı sonucu ortaya çıkan sinyallerin bir dedektörde toplanarak işlenmesi gerekir. Bu durum aşağıdaki denklem ile açıklanabilir.

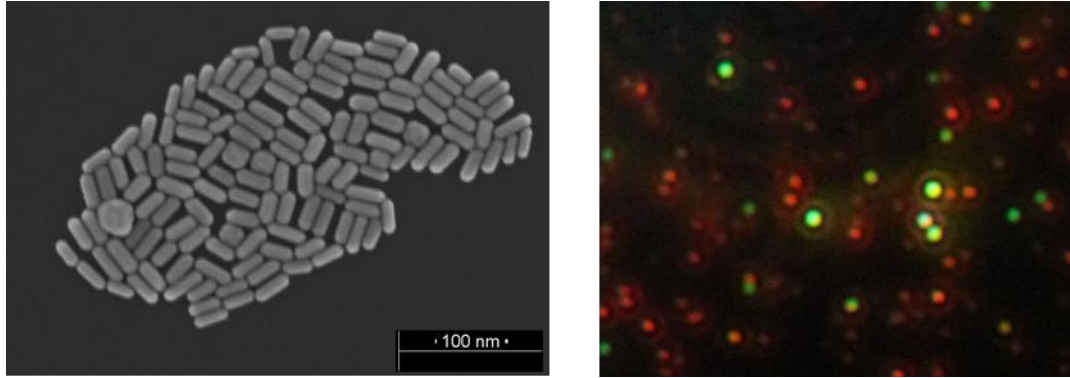
$$I \propto |E_s + E_r|^2 = |E_r|^2 + |E_s|^2 + 2Re(E_r E_s) = E_i(r^2 + |s|^2 - 2r|s| \cos \theta) \quad (1)$$

Denklem 1'de E_s referans elektrik alanı ve E_r saçılma elektrik alanıdır. Algılayıcıda ölçülen sinyal I , referans ve saçılma elektrik alanlarının toplamının mutlak karesi ile ifade edilir. $|E_r|^2$ algılayıcıda ölçülen sinyalde arka-plan ışığı olarak etki yapar ve kaydedilen görüntüden çıkarılabilir. Nanoparçacıklardan saçılan ışık sinyali $|E_s|^2$ nanoparçacığın yarıçapının altıncı kuvvetiyle doğru orantılıdır. Bu sinyal direkt saçılma mikroskopisi ile ölçülen sinyaldir. 30 nm'den büyük nanoparçacıklar için $|E_s|^2$ kuvvetli bir ölçülebilir saçılma sinyali oluşturur. Daha küçük nanoparçacıklar için $|E_s|^2$ zayıflarken uygun şartlar sağlanırsa girişim kısmıyla ilgili olan ve nanoparçacığın üçüncü kuvvetiyle doğru orantılı $2Re(E_r E_s)$ sinyali ölçülebilir sinyal oluşturmaktadır.

Saçılma mikroskopisi boyutları 30 nm'den büyük olan nanoparçacıklar için kontrastı yüksek görüntüler elde etme amacıyla kullanılabilir. Burada ölçülen sinyal (Denklem 1'deki $|E_s|^2$) nanoparçacıktan saçılan ışık olduğu için sinyal parçacık boyutunun karesi ile orantılıdır. Bu teknikte optik uyarım için lazer kullanımına ihtiyaç bulunmamaktadır ve koherent olmayan ışık kaynaklarıyla örneği uyarım yeterlidir. Bu tekniği kullanarak büyük alanlarda ($\sim 1000-10000 \mu\text{m}^2$) görüntüleme yapmak mümkündür (Sönnichsen, C. ve ark. 2002). Her ne kadar bu teknikte lazer kullanımı gerekmesede, literatürde direkt saçılma tekniği bilgisi ve lazer uyarımının bir arada kullanılmasıyla hassas ölçümler yapılabildiği gösterilmiştir (Zijlstra, P. ve ark. 2012). Plazmonik nanoparçacıklardan ölçülen saçılma sinyalindeki basamak şeklinde meydana gelen değişiklikler ile proteinlerin nanoparçacık üzerine bağlanması ve kaç tane olduğunun ölçülmesi gösterilmiştir (Sannomiya, T. ve ark. 2008). Burada protein bağlanma ve ayrılması sonucu nanoparçacığın hissettiği ortamdaki kırılma indisinde olan değişiklikler saçılan ışığın şiddetini değiştirir ve hassas ölçüm olanağı sağlar (Ament, I. ve ark. 2012).

Işığın girişimi (optical interference) prensibinin ve ışığın saçılması ile oluşan sinyalin kullanılmasıyla hassas ölçüm yapabilen bir mikroskop tekniği literatürde çalışılmıştır (Lindfors, K. ve ark. 2004). 5 nm'lik ideal sayılabilecek altın nanoparçacıklarının görüntülenmesi ve spektroskopisi gösterilmiştir. Bu teknik 60 nm boyutundaki polyester parçacıklarının ölçümünü de mümkün kılmış ve bu tekniği kullanarak metal olmayan parçacıklar için de hassas ölçüm yapılabileceği tarafından gösterilmiştir (Daaboul, G.G. ve ark. 2010). Aynı büyüklükteki altın nanoparçacığı polystyrene parçacığına göre yaklaşık 20 kat daha kuvvetli ışık saçabilir (Demetriadou, A. ve ark. 2015). Bu durum girişim yansıma mikroskop sisteminin dielektrik özellik gösteren viral yapılar gibi biyolojik moleküllerin görüntülenmesinde de hassas sonuçlar verebileceğini göstermektedir. Bunlara ek olarak, daha önce literatürde protein-protein, DNA-DNA ve protein-DNA etkileşimlerini incelemek için yukarıda bahsedilen girişim mikroskop tekniği kullanılmıştır (Monroe, M.R. ve ark. 2013). Bu hassaslık seviyesi tek virüs parçacıklarının yüksek sinyal/gürültü oranlarında ölçümlerine imkân verir.

Işığın soğurulması sayesinde nanoparçacıkların görüntülenmesi için çalışılmış ve çok hassas seviyelere inilmiştir. 1.5 nm çapındaki altın nanoparçacıkların ölçümüne izin veren bu sistem organik tek moleküllerin yaydıkları ısı ölçülerek görüntülenmelerini mümkün kılmıştır (Gaiduk, A. ve ark. 2010). Bu sistemde Denklem 1'de gösterilen saçılma sinyali ve referans sinyali pump-probe yöntemi ile iki ayrı lazer kullanılması sayesinde oluşturulur. Bir ısıtma lazerinin belirli bir periyotta nanoparçacığı uyarması ile nanoparçacık etrafında termal lens oluşturulur. İkinci sonda lazeri oluşan termal lensten saçılır ve bu lazerin bir kısmı substrattan geri yansır. Saçılan ve geri yansıyan sinyal girişim sinyali oluşturur. Bir lock-in yükseltici sayesinde ısıtma lazerinin uyarı periyodunda oluşan girişim sinyali kiplenerek analiz edilir ve analiz edilebilir bir sinyale dönüştürülür. Bu yöntemde ölçülen sinyal parçacığın etrafında oluşan termal lensten saçılan ve substrattan geri yansıyan sinyalin girişimi ile olduğu için, aynen girişim yansıma saçılma mikroskopunda olduğu gibi uyarılan parçacığın hacmi ile doğru orantılıdır.



Şekil 4. (Sol) Altın nanoparçacıkların SEM görüntüsü. (Sağ) Altın nanoparçacıkların beyaz ışık ile uyarılmaları sonucu elde edilen karanlık alan saçılma sinyalinin renkli kamera ile çekilmiş görüntüsü.

Arka plan ışığının minimize edilerek nanoparçacıklardan gelen direkt saçılma sinyalinin görüntülediği teknik olan karanlık-alan saçılma mikroskopisinin en önemli avantajı yarıçapları 30 nm'den daha büyük olan nanoparçacıkların kolay bir şekilde geniş alanda optik görüntülerinin yüksek kontrast ile kaydedilmesinin sağlanmasıdır. Bu yöntem ile şekilleri, malzemeleri ve boyutları farklı olan nanoparçacıkların optik görüntülenmesi gerçekleştirilebilir. Şekil 4'te görüldüğü gibi optik görüntüde her bir renkli parlak nokta tek bir nanoparçacığa karşılık gelmektedir. Farklı renkler malzeme, boyut ve şekil farklılıklarından meydana gelmektedir. Örneğin yeşil renkli saçılma sinyali küre şeklindeki altın nanoparçacıklardan; kırmızı renkli sinyaller ise çubuk şeklindeki nanoparçacıklardan elde edilmektedir. Elde edilen saçılma sinyali kamera yerine spektrometreye gönderildiğinde malzeme, parçacık boyutu ve şekline bağlı olarak değişen plazmonik spektrumlar elde edilir. Plazmonik nanoparçacıklarının algılama deneylerinde kullanılması lokal kırınım indisine bağlı olarak plazmon spektrumlarında değişikliğin gözlenmesine bağlıdır. Tek bir proteinin bağlanması bile plazmonik nanoparçacığın spektrumundaki değişikliğin takip edilmesi ile ölçülebilir. Benzer şekilde belirli bir dalga boyunda uyarı ışığı kullanıldığı durumda ise, spektrum değiştiği için zamana bağlı sinyal değişimi grafiklerinde adım şeklinde sinyal değişimleri gözlenir ve bağlanmalar ölçülebilir.

4. Altın Nano-küre ve Nano-çubukların LYPR Biyosensörlerde Uygulamaları

Optik spektroskopi metal nanoparçacıklardaki LYPRyi absorpsiyon ve saçılma ölçümleriyle algılayan en kolay yöntemdir. Kantitatif immuno reaksiyon sonuçları almak için lokal ortamdaki değişimlerin LYPR spektrumuna etkisine bakılır. Düşük nanoparçacık konsantrasyonları ile hazırlanan örneklerden alınan saçılma veya absorpsiyon ölçümlerinin biyosensör uygulamalarına literatürde rastlanır. Örneğin, Lee ve arkadaşları, human immunodeficiency virus (HIV-1) tespiti için LYPR mekanizmasının kullanıldığı biyosensör önermişlerdir (Lee, J.H. ve ark. 2013). Bu çalışmada, transparan indium tin oksit substrat üzerine elektrokimyasal deposition tekniği ile küresel altın nanoparçacıkların (10-20 nm) fabrikasyonu sağlanmıştır. Altın nanoparçacıkların yüzeyi HIV-1'i nötralize eden gp120 ile fonksiyonlu hale getirilmiştir. Etiket materyali kullanmadan biyomoleküllerin immunoreaksiyon ile altın nanoparçacıkların yüzeyine bağlanması altın nanoparçacık yüzeyindeki kırılma indisi değişimi ile sonuçlanmış, UV-Vis spektrumunda değişimlerin ölçülmesi ile kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bu yöntem ile 200fg/mL ölçüm hassasiyeti yakalanmıştır.

Lokal değişimlerin spektral kaymadaki etkisi LYPR bazlı biyosensör platformlarını kullanarak yapılan ölçümlerin hassasiyetini belirlemektedir. Van Duyne ve arkadaşları immunoassay sinyalini arttırmak için küresel altın nanoparçacıklarının kullanılabilirliğini deneysel olarak göstermişlerdir (Hall, W.P. ve ark. 2011). Anti-biyotin antikörleri 20 nm çapındaki altın nano-kürelerle işaretlenmiştir, Kolloidal nanokürelerin UV-vis spektrumunda LYPR piki bağlı olmayan ve olan durumda sırasıyla 521.1 nm ve 534.2 nm olarak ölçülmüştür. Ayrıca biotin-fonksiyonlu gümüş nano-prizma dizileri oluşturulmuştur LYPR ölçümleri yapılarak yalnızca anti-biyotin bağlandığı ve altın küre ile işaretli antibiyotin bağlandığı durumlar incelenmiştir. Sonuç olarak, işaretlenmemiş anti-biyotin (100 nM konsantrasyon), gümüş parçacık yüzeyinin kolektif LYPR pikinde 11 nm kırmızı dalgaboyuna kaymaya neden olurken, gümüş nanoprizmalara altın ile işaretlenmiş anti-biyotin bağlanması LYPR pikinde 42.7 nm lik kaymaya neden olmuştur. Yazarlar bu iyileştirme sayesinde ölçüm hassasiyetlerinde bin kat iyileştirme elde ettiklerini göstermişlerdir.

Birçok nanoparçacığın substrat üzerinde veya solüsyon içerisinde kullanılması ile yapılan sensör

uygulamaları dışında, her bir nanoparçacığın kendisinin sensör olarak kullanılabileceğini gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur. Zijlstra ve arkadaşları çalışmalarında tek altın nanoçubuklardan ölçtükları absorpsiyon sinyalindeki değişimi gözleyerek streptavidin, anti-biyotin, streptavidin-RPE gibi floresan veya saçılma sinyali göstermeyen moleküllerin ölçümünün mümkün olduğunu göstermişlerdir (Zijlstra, P. ve ark. 2012). Yapılan deney sırasında yazarlar, tek nanoçubuğun absorpsiyon sinyalini konfokal geometride fototermal mikroskopi uygulaması yaparak ölçmüşlerdir. Tek nanoçubuk parçacıklarının geniş alan görüntüleme sistemleri yardımıyla sensör uygulamalarında kullanılması ile istatistiksel dağılım çalışmaları kolaylaşmıştır (Michael A. Beuwer ve ark. 2015). Boy ve en boyutları ortalama 40 nm ve 10 nm olan nanoçubukların superlüminesan diyot ışığı ile tam yansıma saçılma görüntüleme sistemi kullanılarak antikör-antijen etkileşimi çalışılmıştır ve 7 basamak hassasiyet farkında ölçüm aralığına erişildiği gösterilmiştir (Michael A. Beuwer ve ark. 2015).

Biyomoleküllerin tespit ve teşhisi uygulamaları dışında uçucu organik bileşiklerin ölçümü ile akciğer kanseri teşhisi uygulamalarında da altın nanoparçacıkların kullanımına rastlamak mümkündür (Peng, G. ve ark. 2009). Peng ve arkadaşları sağlık durumu ve akciğer hastalıkları ile ilgili 33 adet uçucu organik bileşik belirlemişlerdir. Yazarların altın elektrod ve altın nanoparçacıklar kullanılarak geliştirdikleri sensör ile yaptıkları ölçümlerde organik bileşenlerin etkileşimi sonucu direnç değişimi gözlenmiştir ve bu değişim kanserli ve sağlıklı hastalarda farklıdır. Yazarlar bu şekilde sağlıklı olan ve akciğer kanseri olan kişileri ayırt edebilmişlerdir. Geliştirilen yöntemde altın nanoparçacıkların kullanılması daha önce karbon nanotüpler ile yapılan deneylere göre ölçüm hassasiyetini artırmıştır ve 11-mercapto-1-undecanol veya acetaldehyde gibi bileşikler 1-10 ppm seviyelerinde ölçüm yapılabilmektedir. Farklı uygulamalara için verilebilecek örneklere Alzheimer ve Parkinson hastalığı tespiti eklenebilir. Tish ve arkadaşları geliştirdikleri nanomalzeme tabanlı sensör ile verilen nefesten yaptıkları hastalıkla ilintili biyobelirteçlerin ölçümü ile %80 doğruluk oranında hastalıklı kişileri ayırt edebilmişlerdir (Tisch, U. ve ark. 2013).

5. Sonuç ve Gelecek Beklentileri

Nanoparçacıkların kullanımı ile bilim insanların sadece hayal güçleri ile sınırlı araştırma alanı ortaya çıktığı değerlendirilebilir. Nanoparçacıkların istenilen malzemeden belirlenen şekil ve boyutta kontrollü bir şekilde homojen büyüklük dağılımı ile üretilebilmesi, kimyasal ve optiksel özelliklerinin titiz bir şekilde araştırılmasına imkan tanımıştır. Aynı zamanda algılama tekniklerindeki süregelen teknolojik gelişmeler, plazmonik alanda yapılan araştırmalar için yeni yaklaşımlara olanak sağlamıştır. Yapılan fizikokimya ve fotokimya tabanlı araştırmaların sonucunda nanoparçacıkların optik özelliklerinin istenilen şekilde modifiye edilebildiği görülmüştür. Aynı zamanda nanoparçacıkların yüzeyinde veya çevrelerinde nanoboyutta gerçekleşen olaylar karşısında ölçülebilir optiksel veya spektroskopik değişimlerin olduğu gözlenmiştir. Bu deneysel çalışmaların karakterize edilmeleri ile nanoparçacıkların biyosensör alanında yapılan tanı uygulamaları için son derece umut vadeci nitelikte oldukları görülmüştür.

Plazmonik biyosensör alanında yapılacak çalışmaların artarak devam edeceği, plazmon tabanlı tespit ve teşhis uygulamalarının mobil platformlarda yapılabileceği, uygun maliyetli çözümler üretilebileceği, hızlı ve hassas sonuç veren sistemlerin kurulabileceği öngörülebilir. Bu beklentilerin gerçekleşmesi için özellikle erken tanı uygulamalarına imkan tanınması amacıyla ulaşılan tespit hassasiyet seviyelerinin artırılmasının; tespitten daha ileri seviyede teşhis uygulamaları için atomic spektroskopisi ve görüntüleme sistemlerinin birleştirildiği yenilikçi yaklaşımlar bulunmasının; plazmonik sistemlerin çoklu ölçüme imkan verecek yönde geliştirilebilmesi için araştırma çalışmalarının artmasının ve son aşamada elde edilen sonuçların düzenli bir şekilde takip edilebilmesi ve sonuçlar ile bölgesel istatistik bilgilerinin oluşturulabilmesi için bulut sistemine aktarılacak entegre bir yöntemin geliştirilmesinin faydalı olacağı değerlendirilebilir.

6. Referanslar

- Jackson, J. et al. (2018). Design and Near-Infrared Actuation of a Gold Nanorod–Polymer Microelectromechanical Device for On-Demand Drug Delivery. *Micromachines*, 9, 28
- Toshiharu Teranishi et al. (2011). Controlled localized surface plasmon resonance wavelength for conductive nanoparticles over the ultraviolet to near-infrared region, *J. Mater. Chem*, 21, 10238-10242
- Luis M. Liz-Marzán (2006). Tailoring Surface Plasmons through the Morphology and Assembly of Metal Nanoparticles, *Langmuir*, 22, 1, 32-41

- Keke Chang et al. (2017). Colorimetric detection of melamine in milk by using gold nanoparticles-based LSPR via optical fibers, *Plos One*, 12(5): e0177131
- Boshi Liu et al. (2018). Gold Nanoparticle-Aptamer-Based LSPR Sensing of Ochratoxin A at a Widened Detection Range by Double Calibration Curve Method, *Front. Chem.*, 6,94
- Yasaman-Sadat Borghei et al. (2019). A New Eye Dual-readout Method for MiRNA Detection based on Dissolution of Gold nanoparticles via LSPR by CdTe QDs Photoinduction, *Sci. Rep.*, 9, 5453
- Weihong Shi et al. (2012). Synthesis and Characterization of Gold Nanoparticles with Plasmon Absorbance Wavelength Tunable from Visible to Near Infrared Region, *ISRN Nanomaterials*, 659043
- Artur, C. G. et al. (2018). Plasmonic nanoparticle-based expansion microscopy with surface-enhanced Raman and dark-field spectroscopic imaging. *Biomedical Optics Express*, Vol. 9, Issue 2, pp. 603-615
- Faraday M (1857). The Bakerian Lecture: Experimental Relations of Gold (and Other Metals) to Light, *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 147: 145–181.
- Yazhuo Shang et al. (2013). Synthesis of gold nanoparticles by reduction of HAuCl₄ under UV irradiation, *Solid State Sciences*, 15, 17-23
- Marina Sokolsky-Papkov et al. (2019). Synthesis of Well-Defined Gold Nanoparticles Using Pluronic: The Role of Radicals and Surfactants in Nanoparticles Formation, *Polymers*, 11,1553
- Turkevich J. (1951). A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold Discuss, *Faraday Soc.*, 11 55–75
- L. Mikac et al. (2014). Synthesis and characterization of silver colloidal nanoparticles with different coatings for SERS application, *Journal of Nanoparticle Research*, 16:2748
- Dao Tri Thuc et al. (2016). Green synthesis of colloidal silver nanoparticles through electrochemical method and their antibacterial activity, *Materials Letters*, 173-177
- Matthias M. Koebel et al. (2008). Preparation of size-tunable, highly monodisperse PVP-protected Pt-nanoparticles by seed-mediated growth, *Journal of Nanoparticle Research*, 10: 1063
- Teranishi T. et al. (1999). Size control of monodispersed Pt nanoparticles and their 2D organization by electrophoretic deposition, *J. Phys. Chem. B* 103 3818–27
- Ying Wang et al. (2008). Size-Controlled Synthesis of Palladium Nanoparticles, *Journal of Dispersion Science and Technology*, 29:6, 891-894
- Yu, Y. Y. et al. (1997). Gold nanorods: electrochemical synthesis and optical properties, *J. Phys. Chem. B*, 101 6661–4
- Chang, S. S. et al. (1999). The shape transition of gold nanorods, *Langmuir*, 15 701–9
- Jana, N. R. et al. (2001). Wet chemical synthesis of high aspect ratio cylindrical gold nanorods, *J. Phys. Chem. B*, 105 4065–67
- Jana, N. R. et al. (2001). Wet chemical synthesis of silver nanorods and nanowires of controllable aspect ratio, *Chem. Commun.*, 617–18
- Busbee, B D. et al. (2003). An improved synthesis of high-aspect-ratio gold nanorods, *Adv. Mater.* 15 414–7

- Yurt, A. et al. (2012). Single nanoparticle detectors for biological applications, *Nanoscale*, 4(3): p. 715-726.
- Olson, J. et al. (2015). Optical characterization of single plasmonic nanoparticles. *Chemical Society Reviews*, 44(1): p. 40-57.
- Backer, A.S. et al. (2014). A bisected pupil for studying single-molecule orientational dynamics and its application to three-dimensional super-resolution microscopy. *Applied Physics Letters*, 104(19): p. 193701.
- Betzig, E. et al. (2006). Imaging Intracellular Fluorescent Proteins at Nanometer Resolution. *Science*, 313(5793): p. 1642-1645.
- Göttfert, F. et al. (2013). Coaligned Dual-Channel STED Nanoscopy and Molecular Diffusion Analysis at 20 nm Resolution. *Biophysical Journal*, 105(1): p. L01-L03.
- McLeod, E. et al. (2015). High-Throughput and Label-Free Single Nanoparticle Sizing Based on Time-Resolved On-Chip Microscopy. *ACS Nano*, 9(3): p. 3265-3273.
- Sönnichsen, C. et al. (2002). Drastic Reduction of Plasmon Damping in Gold Nanorods. *Physical Review Letters*, 88(7): p. 077402.
- Zijlstra, P. et al. (2012). Optical detection of single non-absorbing molecules using the surface plasmon resonance of a gold nanorod. *Nat Nano*, 7(6): p. 379-382.
- Sannomiya, T., C. Hafner, and J. Voros, (2008). In situ Sensing of Single Binding Events by Localized Surface Plasmon Resonance. *Nano Letters*, 8(10): p. 3450-3455.
- Ament, I. et al., (2012). Single Unlabeled Protein Detection on Individual Plasmonic Nanoparticles. *Nano Letters*, 12(2): p. 1092-1095.
- Gaiduk, A. et al. (2010). Room-Temperature Detection of a Single Molecule's Absorption by Photothermal Contrast. *Science*, 330(6002): p. 353-356.
- Lindfors, K. et al. (2004). Detection and Spectroscopy of Gold Nanoparticles Using Supercontinuum White Light Confocal Microscopy. *Physical Review Letters*, 93(3): p. 037401.
- Daaboul, G.G. et al. (2010). High-Throughput Detection and Sizing of Individual Low-Index Nanoparticles and Viruses for Pathogen Identification. *Nano Letters*, 10(11): p. 4727-4731.
- Demetriadou, A. (2015). The impact of natural modes in plasmonic imaging. *Scientific Reports*, 5: p. 18247.
- Monroe, M.R. et al. (2013). Single Nanoparticle Detection for Multiplexed Protein Diagnostics with Attomolar Sensitivity in Serum and Unprocessed Whole Blood. *Analytical Chemistry*, 85(7): p. 3698-3706.
- Lee, J.H. et al. (2013). Highly sensitive localized surface plasmon resonance immunosensor for label-free detection of HIV-1. *Nanomedicine*, 9, 1018–1026.
- Hall, W.P. et al. (2011). LSPR Biosensor Signal Enhancement Using Nanoparticle-Antibody Conjugates. *J. Phys. Chem. C Nanomater. Interfaces*, 115, 1410–1414.
- Michael A. Beuwer et al. (2015). Stochastic Protein Interactions Monitored by Hundreds of Single-Molecule Plasmonic Biosensors. *Nano Letters*, 15, 5, 3507-3511

- Peng, G. et al. (2009). Diagnosing lung cancer in exhaled breath using gold nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, 4, 669-673
- Tisch, U. et al. (2013). Detection of Alzheimer's and Parkinson's disease from exhaled breath using nano-material-based sensors. *Nanomedicine*, 8, 43-56
- El-Sayed, M. A. et al. (2003). Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method. *Chem. Mater.*, 15 1957–62
- Haynes, C. L. (2001). Nanosphere lithography: a versatile nanofabrication tool for studies of size-dependent nanoparticle optics. *J. Phys. Chem. B*, 105 5599–611
- C. F. Bohren and D. R. Huffman (1998). *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley, New York, 1998).
- Johnson, P. B. (1972). Optical constants of the noble metals. *Phys. Rev. B*, 6, 4370–7379
- R. Gans, (1912). Uber die Form ultramikroskopischer Goldteilchen. *Ann. Phys.* 342, 881–900