



**APTAMERLE FONKSİYONLANDIRILMIŞ ÇEKİRDEK-KABUK TİPİ
MANYETİK AYRIMLA BİRLEŞTİRİLMİŞ KUARTZ KRİSTAL
MİKROTARTI SENSÖRÜ İLE KOMPLEKS ÖRNEKLERDE PATOJEN
TESPİTİ**

Zehra ERDEM AYDIN

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

ŞUBAT 2018

Zehra ERDEM AYDIN tarafından hazırlanan “APTAMERLE FONKSİYONLANDIRILMIŞ ÇEKİRDEK-KABUK TİPİ MANYETİK AYIRIMLA BİRLEŞTİRİLMİŞ KUARTZ KRİSTAL MİKROTARTI SENSÖRÜ İLE KOMPLEKS ÖRNEKLERDE PATOJEN TESPİTİ” adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ ile Gazi Üniversitesi, Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

İkinci Danışman: Prof. Dr. Mehmet Yakup ARICA

Biyoloji Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Başkan: Prof. Dr. Mehlika PULAT

Kimya Anabilim Dalı, Gazi Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Aydın AKBULUT

Biyoloji Eğitimi, Hacettepe Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Üye: Prof. Dr. Meral KARAKIŞLA ŞAHİN

Kimya Anabilim Dalı, Ankara Üniversitesi

Bu tezin, kapsam ve kalite olarak Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum.

.....

Tez Savunma Tarihi: 22/02/2018

Jüri tarafından kabul edilen bu tezin Yüksek Lisans Tezi olması için gerekli şartları yerine getirdiğini onaylıyorum.

.....

Prof. Dr. Sena YAŞYERLİ

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu,

bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Zehra ERDEM AYDIN

22/02/2018

APTAMERLE FONKSİYONLANDIRILMIŞ ÇEKİRDEK-KABUK TİPİ MANYETİK
AYRIMLA BİRLEŞTİRİLMİŞ KUARTZ KRİSTAL MİKROTARTI SENSÖRÜ İLE
KOMPLEKS ÖRNEKLERDE PATOJEN TESPİTİ
(Yüksek Lisans Tezi)

Zehra ERDEM AYDIN

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Şubat 2018

ÖZET

Tez çalışmasında, çekirdek-kabuk manyetik mikroküreler üzerinde hedef patojene spesifik aptamerin immobilizasyonu yolu ile yeni bir manyetik ayırma sistemi hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda, manyetik poli(hidroksipropil metakrilat/etilen glikol dimetakrilat) (p(HPMA/EGDMA)) mikroküreleri süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi. Daha sonra, manyetik mikroküreler, yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu (SI-ATRP) kullanılarak glisidil metakrilat (GMA) ile aşılandı. Manyetik mikroküreler üzerine *Salmonella*'ya spesifik olarak affinite gösteren aptamerler ile fonksiyonlandırıldı ve ön-zenginleştirme işleminde kullanıldı. Gıda örneklerinden *Salmonella* bakterilerinin seçici ve spesifik tayini için geliştirilen kuartz kristal mikrodenge (QCM) sensörü, manyetik mikrokürelerin kullanıldığı ayırma işlemi ile entegre edildi. Hedef bakteri hücrelerine duyarlı ve spesifik tespiti için biyoafinite ajanlarına dayanan birçok sensör geliştirilmiş olsa da, gıda numuneleri için sensör uygulamalarının geliştirilmesi oldukça zordur. Bu çalışmada, hedef patojenin hızla zenginleştirilmesi için aptamer temelli manyetik ayırma sistemini ve spesifik ve gerçek zamanlı izleme için QCM analizini birleştiren yeni ve duyarlı bir strateji sunuldu. Bu manyetik ayırma sistemi, hücreleri kısa sürede (10 dakikadan daha kısa bir sürede) etkili bir şekilde yakalayabildiğinden, yakalanan bakterilerin bir QCM akış hücresi sistemine beslenmesi, örnek gıda numunesinden 100 CFU/ml'de *Salmonella* hücrelerinin spesifik olarak tespit edildiğini gösterdi (örn. süt).

Bilim Kodu : 20107
Anahtar Kelimeler : Manyetik küre, Biyosensor, Aptamer, Kuartz Kristal Mikrotartı
Sayfa Adedi : 77
Danışman : Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU
İkinci Danışman : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

PATHOGEN DETECTION IN COMPLEX SAMPLES BY QUARTZ CRYSTAL
MICROBALANCE SENSOR COUPLED TO APTAMER FUNCTIONALIZED CORE–
SHELL TYPE MAGNETIC SEPARATION

(M.Sc. Thesis)

Zehra ERDEM AYDIN

GAZİ UNIVERSITY

GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES

February 2018

ABSTRACT

A magnetic separation system developed by the immobilization of a target pathogen-specific aptamer on the core-shell magnetic microbeads was reported. For this purpose, the magnetic poly (hydroxypropyl methacrylate)/ethyleneglycole dimethacrylate), p(HPMA/EGDMA) beads were synthesized by suspension polymerization. The magnetic microbeads were grafted with glycidylmethacrylate (GMA) using surface- initiated atom transfer radical polymerization (SI-ATRP). A quartz crystal microbalance sensor (QCM) was developed for sensitive and specific detection of Salmonella cells in food samples by integrating a magnetic bead purification system. Although many sensor formats based on bioaffinity agents have been developed for sensitive and specific detection of bacterial cells, the development of robust sensor applications for food samples remained a challenging issue. A novel and sensitive high throughput strategy that combines an aptamer based magnetic separation system for rapid enrichment of target pathogens and a QCM analysis for specific and real-time monitoring was reported in this research. Since this magnetic separation system can efficiently capture cells in a relatively short processing time (less than 10 min), feeding captured bacteria to a QCM flow cell system showed specific detection of Salmonella cells at 100 CFU/ml from model food sample (i.e., milk).

Science Code : 20107

Key Words : Magnetic beads, Biosensor, Aptamer, Quartz crystal microbalance

Page Number : 77

Supervisor : Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU

Co-Supervisor : Prof. Dr. M. Yakup ARICA

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde, değerli bilgilerini benimle paylaşan, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenden fazlasını sunan, güler yüzünü ve samimiyetini benden esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Gülay BAYRAMOĞLU'na teşekkürü bir borç bilir ve şükranlarımı sunarım. Yine çalışmamda konu, kaynak ve yöntem açısından yardımda bulunarak yol gösteren,engin bilgisiyle her konuda danışabildiğim değerli hocam Prof. Dr. M. Yakup ARICA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Tez çalışmasında, aptamer ligandının temini, immobilizasyonu QCM sensör kristaline aptamer ligandının immobilizasyonu bu kapsamdaki deneylerin belirli bölümü İstanbul Kemerburgaz Üniversitesinde, Sayın Doç. Dr. V. Cengiz ÖZALP'ın laboratuvarı'nda yürütüldüğünden teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	x
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	xi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. KURAMSAL BİLGİLER	5
2.1. Polimer ve Sentezi.....	5
2.1.1. Polimerlerin sınıflandırılması	5
2.2. Polimerlerin Sentezi ve Elde Ediliş Yöntemleri	7
2.2.1. Serbest radikal polimerleşmesi	7
2.2.2. İyonik polimerizasyon.....	8
2.2.3. Kondenzasyon polimerizasyonu	9
2.2.4. Kütle (yığın) polimerizasyonu	9
2.2.5. Dispersiyon polimerizasyonu.....	10
2.2.6. Emülsiyon polimerizasyonu.....	10
2.2.7. Süspansiyon polimerizasyonu.....	10
2.3. Çalışmada Kullanılan Monomerler	11
2.4. Manyetik Özellik Kazandırılmış Polimerler	14
2.4.1. Manyetik partiküller.....	14
2.5. Polimerlerin Modifikasyonu	16
2.5.1. Aşılama	16

	Sayfa
2.5.2. Ligand bağlanması	17
2.6. Aptamerler.....	17
2.7. Biyolojik Makromoleküllerin Katı Destek Üzerine İmmobilizasyonu	20
2.7.1. İmmobilizasyon.....	20
2.8. Patojen Mikroorganizmalar.....	21
2.8.1. Salmonella.....	21
2.8.2. Patojen tayin yöntemleri	22
2.9. Sensör.....	25
2.9.1. Biyosensörler	25
2.9.2. Elektrokimyasal sensörler	28
2.9.3. Optik biyosensörler	28
2.9.4. Termal sensörler.....	28
2.9.5. Piezoelektrik biyosensörler	28
2.10. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM).....	29
2.11. Denge İzotermi Parametreleri	30
3. METARYAL VE METOT	31
3.1. Materyaller	31
3.1.1. Kimyasal malzemeler.....	31
3.1.2. Cihazlar	31
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin hazırlanması.....	33
3.2.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin hazırlanması	34
3.2.3. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin yüzeylerinin Br- uçlu fonksiyonlandırılması	34
3.2.4. p(GMA) fırçalarının Br-ile fonksiyonlandırılan manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerine ATRP ile Aşılması.....	35

Sayfa

3.3.5. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine aptamer ligandının bağlanması	35
3.4.6. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin karakterizasyonu	36
3.5. QCM Sensör Kristali Üzerine Salmonella'ya Özgün Aptamerlerin İmmobilizasyonu	39
3.5.1. QCM sensör kristalinin modifikasyonu	40
3.5.2. Aktive edilen QCM sensör kristaline aptamer ligandının immobilizasyonu	40
3.6. Bakteri Kültürlerinin Hazırlanması	41
3.6.1. Bakteriyel hücrelerin manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA)-aptamer mikroküreleri kullanılarak ön-deriştirilmesi	41
3.6.2. Instrümantasyon ve ölçüm	42
3.6.3. Denge izoterm parametrelerinin belirlenmesi	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	45
4.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin hazırlanması ve karakterizasyonu	46
4.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine <i>Salmonella</i> bakterisi için spesifik aptamer ligandının immobilizasyonu	54
4.3. <i>Salmonella</i> bakterisi için spesifik QCM çiplerinin hazırlanması	55
4.4. Denge izotermi parametreleri	56
4.5. <i>Salmonella</i> bakterilerinin sulu ortamlardan manyetik olarak spesifik yakalanması	59
4.6. QCM Sensörünün Sütte <i>Salmonella</i> 'nın Tayininde Kullanımı	60
4.7. <i>Salmonella</i> hücreleri için QCM kristalinin rejenerasyonu ve tekrar kullanılabilirliği	64
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	77

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.1. Salmonella'ya spesifik aptamer ligandı bağlı QCM kristali için belirlenen izoterm model sabitleri ve korelasyon katsayıları	59



ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. HPMA ve pHPMA'nın kimyasal yapısı	11
Şekil 2.2. GMA'nın kimyasal yapısı	12
Şekil 2.3. EGDMA'nın kimyasal yapısı.....	13
Şekil 2.4. Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) prosesinin şematik gösterimi.....	19
Şekil 2.5. Biyosensör sistemlerinin genel gösterimi	26
Şekil 4.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin sentezinin şematik gösterimi.....	46
Şekil 4.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin sentezinin şematik gösterimi	47
Şekil 4.3. Br-uçlu fonksiyonel manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin yüzeyine p(GMA) aşılama veriminin reaksiyon süresine göre değişimi.....	48
Şekil 4.4. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin VSM eğrileri	50
Şekil 4.5. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin SEM mikrofotografı	51
Şekil 4.6. Manyetik p(HPMA/EGDMA) (a) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) (b) mikrokürelerinin DSC ve TGA eğrileri.....	52
Şekil 4.7. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu.....	53
Şekil 4.8. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu.....	54
Şekil 4.9. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine <i>Salmonella</i> 'ya spesifik aptamer ligandın bağlanması işleminin şematik gösterimi.....	55
Şekil 4.10. QCM kristalinin yüzeyinin fonksiyonlandırılmasının şematik gösterimi....	56
Şekil 4.11. <i>Salmonella</i> bakterisine karşı QCM de frekans değişimi (CFU/ml)	57
Şekil 4.12. <i>Salmonella</i> 'ya yanıt olarak frekans değişiklikleri (CFU/mL): Değişen <i>Salmonella</i> hücre sayılarına karşı aptamer ligandı bağlı QCM çip yüzeyi için belirlenen frekans değişimi	58
Şekil 4.13. Aptamer ligandı bağlı QCM çip yüzeyi ve salmonella hücreleri arasındaki bağlanma için elde edilen deneysel, Langmuir ve Freundlich izoterm eğrisi.....	59

Şekil	Sayfa
Şekil 4.14. Salmonella'ya yanıt olarak belirlenen frekans değişimi (CFU/ml).....	61
Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda süt örneklerinin frekans değişimleri (örneğin doğrudan enjeksiyonu).....	62
Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda süt örneklerinin frekans değişimleri (manyetik kürlerle ön saflaştırma işleminden sonra enjeksiyon) (Kontrol <i>E. coli</i> hücrelerini ifade etmektedir. Bakteri örnekleri 10^4 CFU/ml sabit konsantrasyonunda enjekte edildi).....	63



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklamalar

g	Gram
ml	Mililitre
mg	Miligram
mm	Milimetre
μM	Milimol
ng	Nanogram
cfu	Koloni hücre sayısı
rpm	Dakika devir sayısı
dak	Dakika
F_b	Sonuç frekansı
F_a	Başlangıç frekansı
μm	Mikrometre
m²	Metrekare
Hz	Hertz
cm²	Santimetrekare
K_a	İleri bağlanma sabiti
K_d	Geri bağlanma sabiti

Kısaltmalar

Açıklamalar

Aam	Akrilamid
ATRP	Atom transfer radikal polimerizasyonu
BET	Brunauer-Emmett-Teller methodu
BMP	2-bromo-2-etilpropionil bromür
BP	Benzoil peroksit
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DMAEMA	N-dimetilaminoetil metakrilat

Kısaltmalar**Açıklamalar**

DNA	Deoksiriboznükleik asit
DTA	Diferensiyel termal analiz
E.COLİ	Escherichia coli
EGDMA	Etilen glikol dimetakrilat
FTIR	Fourier dönüşümlü infraret spektrofotometre
GMA	Glisidil metakrilat
HCV	Hepatit C virüsünün
HEMA	2-hidroksietil metakrilat
HPMA	Hidroksipropil metakrilat
MA	Maleik asid
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu
PHEMA	Poli hidroksipropil metakrilat
PVA	Polivinil alkol
QCM	Quartz kristal mikrobals
RNA	Ribonükleik asit
SELEX	Üssel zenginleştirme yolu ile ligantların sistematik evrimi
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
TEGDMA	Tetraetilenglikol dimetakrilat
TEGDMA	Tetraetilenglikol dimetakrilat
TGA	Termogravimetrik analiz
UV-VIS	Ultraviyole visible-spektrofotometre

1. GİRİŞ

Fakültatif bir bakteri olan *Salmonella*, insanlarda ve diğer memelilerde gastroenteriteye sebep olabilen bir patojendir. Bu bakteriler, bağırsak iç yüzeyindeki epitel hücrelerine girdiğinde, konak hücrelerin yüzeyindeki mikrovilluslarda hasara neden olur [1]. *Salmonella* enfeksiyonları genel olarak, kontamine olmuş gıdanın tüketilmesinden kaynaklanmaktadır [1-3]. *Salmonella* ile gıdaların kontamine olması hala en önemli sorunlardan başında gelmektedir. Bu nedenle, hassas ve doğru tayin sistemleri, bulaşma olmayan yiyecek ve su kaynaklarını güvenceye altına alınmasında önemli bir yer tutmaktadır. Bu doğrultuda, koloni sayımı, niceleyici PCR, elektrokimya ve optik yöntemler gibi çok sayıda farklı yöntemler *Salmonella* nın varlığını tayin için kullanılmıştır [4-7]. Yüzey plazmon tınlaşım (SPR) ve kuvars kristal mikroterazi (QCM) gıda ürünlerinde *Salmonella*’nın doğrudan ölçümü için kullanılabilecek, ayrıca reaktif kullanımını gerektirmeyen oldukça önemli yeni tekniklerdir. Bu sistemlerde, antikor ve / veya aptamerler gibi özgün biyo-afinite molekülleri, gerçek zamanlı, kovalent olmayan etkileşimler yoluyla hedef moleküllere seçici bağlama için kullanılmaktadır [8]. Çok sayıda QCM ve SPR sensörleri, gıda ve çevresel örneklerde hedef patojenlerin niceleyici tayini için kullanılmış ve erişilen sonuçları literatürde rapor edilmiştir [9-10].

Biyosensör, canlı sisteminin bulunduğu çevresindeki değişiklikleri algılayabilen ve bu biyolojik yanıtı optik, termal veya elektrik sinyaline çevirebilen analitik bir cihazdır. Bu amaçla enzimler veya tüm hücre metabolizması, ligand bağlama ve antikor-antijen reaksiyonu gibi biyolojik sistemlerde, biyolojik olarak tepki veren materyaller reseptör yani algılayıcı olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada, gıda örneklerinden *Salmonella* tayini için QCM tabanlı sensör sistemi geliştirilmesi hedeflendi. Hedef bakteriye özgün aptamer biyobileşen olarak kullanıldı ve *salmonella* tayini için QCM tabanlı bir sensör geliştirildi.

QCM tabanlı sensör uygulamaları, küçük moleküllerin veya bakteriyel ve ökaryotik hücrelerin sulu ortamlardan tayinlerini kapsamaktadır [1]. QCM sistemindeki tayin prensibi, Sauberry ilişkisi olarak bilinen, kristal üzerine eklenen kütleyle doğrusal orantılı frekans azalmasına dayalıdır [2]. Bu yöntemlerde, özel tanımlayıcı moleküller (örneğin, aptamer ya da antikor gibi), hedef bakteri ile özgül etkileşim için sensör yüzeyi üzerine tutuklanır. Bu yolla hazırlanan, spesifik fonksiyonel QCM yüzey çipleri ile hedef organizma arasındaki kovalent olmayan etkileşim, düşük konsantrasyonlarda bile tayin edilmesine olanak

sağlayan bir frekans değişimine neden olur. Bu yolla, basit ve özel moleküler etkileşimler, gıda ürünlerinde patojenlerin hızlı olarak belirlenmesi için oldukça önemli bir potansiyele sahiptir.

Birçok hassas algılama sistemleri, mikroorganizmaların tespiti için geliştirilmiş olmasına rağmen, karmaşık örneklerden kaynaklanan girişim, gerçek örnek uygulamalarında göz önüne alınmasında gerekli en önemli problemlerden biridir. Son yıllarda, manyetik ayırma teknolojileri, enzim immobilizasyonu [11-12], biyolojik makromoleküllerin ayrımları (örneğin, protein ve hücreler gibi) [13-14] ve kompleks bir karışımdan hedef moleküllerin ön deriştirilmesi için, sensör sistemlerine entegre edilmiştir. Manyetik taşıyıcı malzemelerin eşsiz ve cazip bir özelliği, örnek solüsyonlardan hedef bakteri hücrelerinin, bir dış manyetik alanın uygulanmasıyla, kolayca izole edilebilir olmasıdır [15]. Paramanyetik malzemeler, dışarıdan uygulanan manyetik alanın uzaklaştırılmasından sonra, aglomerat oluşturmadığından, yeniden kullanılabilir veya sulu ortam içerisinde tekrar kolaylıkla dağıtılabilirler. QCM ile manyetik ön deriştirme sistemleri birleştirilerek, gıda ürünlerinde patojen tespiti için geliştirilen birkaç çalışma literatürde rapor edilmiştir. Örnek olarak, manyetik ayırma ve PCR analizi ile patojen tayini için birkaç metot rapor edilmiştir [5,6,16].

Aptamerler, SELEX olarak bilinen, bir metod ile, kompleks nükleik asit kütüphanelerinden seçilen, özgül biyo-tanım molekülleridir [3]. DNA aptamerleri, antikora kıyasla, çeşitli avantajlara sahiptir. Aptamerler, daha yüksek bir kararlılığa sahip olmasının yanında daha küçük boyut ve kolay kimyasal modifiye edilmeleri gibi bazı avantajlara sahiptir. DNA aptamerleri, sensör uygulamalarında hedef analit ile özgül etkileşime giren bir algılama molekülü olarak çok sayıda araştırmada kullanılmıştır. Mikroorganizmalar için birçok hassas algılama sistemi geliştirilmiş olmasına rağmen, karmaşık örneklerinde meydana gelen girişim, bu tür uygulamaların başarısını engelleyen büyük bir dezavantajdır [17-18]. Önceki çalışmalarda, kompleks örneklerden hızlı bakteri saflaştırılması için çekirdek-kabuk tipi manyetik ayırma sistemi geliştirilmiş ve gerçek zamanlı PCR ile entegre edilerek yeni bir tayin yöntemi geliştirilmiştir [5,6]. Sunulan tez çalışmamızda ise, hassas ve gerçek zamanlı QCM sistemi, benzer bir aptamer-manyetik aşağı çekme sistemi ile kombine edilerek, hedef bakteri hücrelerin saptanması için kullanılması planlanmıştır[19]. Aptamer moleküllerinin laboratuvar koşulları altında kolaylıkla elde edilmesi, dış etkenlerden etkilenmemesi ve hedef mikroorganizmaya kaşı seçici olarak bağlanabilmesi gibi nedenlerden dolayı afinite ligandı olarak kullanılması tasarlandı. Aptamer ligandının tekrar

kullanımını sağlamak amacıyla, manyetik özellik kazandırılmış manyetik polimerik mikroküreler üzerine tutuklanması glutaraldehit ile aktive edildikten sonra kürelerin yüzeyine kovalent yolla immobilize edilmesi sağlandı. Bu yolla, immobilize edilen aptamer ligandı, çözelti ortamından hedef mikroorganizma *Salmonella*'nın ön zenginleştirme işlemine tekrar, tekrar kullanılmasına olanak sağladı. Ayrıca, aptamer ligandı QCM sensörü oluşturmak üzere kristal çip yüzeyine de immobilize edilerek, biyolojik örneklerdeki patojen organizmanın varlığının ve miktarının belirlenmesi için de kullanıldı. *Salmonella* ile kontamine edilmiş süt örneklerinden hedef bakterinin ön zenginleştirilmesi için aptamer immobilize edilmiş manyetik mikroküreler kullanıldı. Daha sonra bu yolla yakalanan hücreler, elüe edilerek, *Salmonella* hücrelerinin varlığının izlenmesi için, aptamer bazlı QCM sensörü ile etkileştirildi. Elde edilen sonuçlar, süt örneklerinden, hedef bakteri hücrelerinin yakalanabileceğini ve hücrelerin sayısının, QCM sistemi ile belirlenebileceğini gösterildi.

2. KURAMSAL BİLGİLER

2.1. Polimer ve Sentezi

Küçük molekülü monomerlerin kimyasal bağlarla bir araya gelerek büyük mol kütesine sahip makromolekülleri oluşturmaya polimerleşme, oluşan ürüne ise polimer adı verilmektedir. 'Poli' Latince bir sözcük olup çok sayıda anlamına gelmektedir. Polimer zincirinin uzunluğu, zincir boyunca tekrarlanan birimlerin sayısına bağlıdır ve bu sayıya polimerizasyon derecesi denir. Çoğu monomer, karbon, hidrojen, oksijen ve azottan meydana gelmektedir. Flor, klor, sülfür gibi bazı diğer elementler de monomerlerin yapısında isteğe bağlı olarak bulunabilir. Isı ve basınç uygulaması ile kalıplar veya polimerizasyon reaktörleri içerisinde yürütülür ve küçük monomerik birimler birbirlerine kovalent bağlarla bağlanması ile polimerler sentezlenir. Polimerlerin sentezinde kullanılan yöntem ise polimerizasyon işlemi olarak adlandırılır. Proteinler, selüloz ve ipek gibi bazı polimerler doğada bulunurken, polistiren, polietilen ve naylon gibi diğer polimerler sadece sentetik yollarla üretilmektedir. Bazı doğal polimerler sentetik olarak da üretilmektedir. Bunun önemli bir örneği, sentetik olarak üretilen poliizopren olarak bilinen doğal (Hevea) kauçuktur.

20. Yüzyılın ikinci yarısıyla birlikte daha önceleri fazlasıyla kullanılan madenlerin yerini almaya başlayan polimerler, metallere göre daha hafif ve ucuz olması, kolay işlenebilmesi gibi bazı avantajları nedeniyle günümüzde hemen hemen her yerde karşılaştığımız ürünler haline gelmiştir.

Bazı tropikal bitkilerin özsuyundan (lateks) veya petrol ve doğal gazdan elde edilebilen kağıtın tarihi 5000 yıl öncesine dayanmaktadır ve yaygın bir kullanım alanına sahiptir. 1031'de ilk sentetik kauçuk üretilmiş, 1927'de selüloz asetat ve polivinil klorür, 1928 yılında poli(metil metakrilat) ve 1929'da üretilen formaldehit reçineleri üretilmiştir [20].

2.1.1. Polimerlerin sınıflandırılması

Küçük başlangıç moleküllerine sahip olan ve bir zincir boyunca tekrar eden birimlere monomer adı verilir. Genel olarak, polimer zincirleri birkaç bin kere tekrar birimlere sahiptir. Çok sayıda monomerin kovalent bağlarla bağlanarak oluşturduğu polimerler elde

ediliş yöntemlerine, kimyasal yapılarına, fiziksel özelliklerine, kaynaklarına ve moleköl yapılarına göre sınıflandırılmaktadırlar. Günümüzde binlerce farklı polimer sentezlenmiş ve gelecekte daha fazla sayıda üretileceğı öngörülmektedir. Polimer yapısı dikkate alınarak yapılan spesifik sınıflandırmalar, elde edilecek nihai ürünlerin özelliklerinin değeriendirilmesi ve tartışılmasını kolaylaştırması bakımından önemlidir.

Bütün polimerler termal davranışlarına göre, termoplastik ve termosetler olmak üzere iki ana gruba ayrılabilir. Isı veya basınç uygulayarak yeniden şekil verilebilen polimerlere termoplastik denir. Polistiren, poliolefinler (polietilen ve polipropilen) ve poli(vinil klorür) termoplastiklere örnek olarak verilebilir. Termosetler ise uygulanan ısıl işleme, mekanik deformasyona ve çözücü etkisine karşı direnç gösterir ancak ısı ile yeniden işlenemez. Kompozitler, kaplamalar ve yapışkan uygulamalar için uygun materyaller olan termosetlere, epoksi, fenol-formaldehit reçineleri ve fiberglas gibi cam takviyeli kompozitlerin imalatında kullanılan doymamış poliesterler örnek olarak verilebilir [21].

Polimerler ayrıca zincir yapılarının kimyasal yapısına göre de gruplanabilirler. Örneğın, polimer zinciri boyunca karbon atomlarına sahip olan polimerler homozincirli polimerler olarak sınıflandırılırlar. Polimer zinciri boyunca sadece tekli bağa sahip polimerlere polialkilenler, Dien elastomerleri (poliizopren ve polibutadien gibi) gibi zincir boyunca çift bağ içeren polimerlere, polialkenilenler denilmektedir. İskelet yapılarında birden fazla atom tipi içeren heterologlu polimerler, zincir boyunca konumlandırılan atomların ve kimyasal grupların (karbonil, amid veya ester gibi) türlerine göre gruplandırılır.

Polimerlerin özellikleri, zincir yapısına bağlı olarak önemli derecede değışmektedir. Aynı cins monomerlerin kimyasal bağlarla bağlanarak oluşturdukları polimerler homopolimer olarak sınıflandırılırken, genellikle, polimerizasyon sırasında iki veya üç farklı monomeri veya tekrar eden birimi bağlayarak yeni ve istenen özelliklere sahip polimerleri kopolimerler olarak sınıflandırılmaktadır. Ticari olarak, en önemli kopolimerler stiren, etilen, akrilonitril ve vinil klorür gibi vinil monomerlerden üretilmektedir [21].

Benzer şekilde, zincir boyunca monomer birimlerinin dizilimi, kopolimerizasyon işlemi sırasında her bir monomerin göreceli reaktivitesine bağlı olarak büyük ölçüde değışiklik göstermektedir. Polimer zinciri içerisinde, monomer yerleşimi tamamen rasgele olabilir veya mükemmel şekilde değışebilir ve buna bağlı olarak da rastgele kopolimer, alternatif

kopolimer, diblok kopolimer, triblok kopolimer olarak isimlendirilebilir. Bu kopolimer yapılara ek olarak, aşı kopolimerleri, bir polimer zincirinin üzerinde oluşturulan dallanmış polimeri ifade etmektedir.

Polimerler dallanma türüne göre de; doğrusal, dallanmış ve ağ yapılı polimerler olarak da sınıflandırılabilir. Polimerler kaynaklarına göre de; doğal, yarı sentetik ve sentetik polimerler olarak da gruplandırılmaktadırlar [22-23].

2.2. Polimerlerin Sentezi ve Elde Ediliş Yöntemleri

Polimerlerin ısıtma işlem özelliklerine, zincir tipine, dallanmasına ve içerdiği monomer sayısına ve polimerleşme tipine veya kaynağına göre sınıflandırılmasına ilaveten, polimerler polimerizasyon mekanizmalarına göre de sınıflandırılmaktadırlar. Genel olarak, polimerler sentez yöntemlerine göre de basamaklı polimerizasyon (kondensasyon polimerizasyonu) ve katılma polimerizasyonu (zincir polimerizasyonu) olmak üzere iki şekilde elde edilebilmektedirler.

Kondensasyon polimerleri, iki molekülün rasgele tepkimesiyle elde edilir. Bir polikondensasyon tepkimesine katılan bir molekül, her biri, karboksilik asit veya hidroksil grupları gibi tamamlayıcı işlevsel uç birimlere sahip olan bir monomer, oligomer veya daha yüksek molekül ağırlıklı bir ara madde olabilir. Genellikle su molekülleri bir bir yapıdan ayrılırken esterifikasyon veya amidasyon gibi herhangi bir yüksek verimli yoğunlaşma reaksiyonu ile yüksek molekül ağırlıklı bir polimer elde edilir. Bir yoğunlaştırma polimerizasyonuna, adipik asit ve heksametilendiamin'in polikondensasyonu ile naylon-6,6 sentezi veya bisfenol-A ve fosjenden polikarbonat sentezi örnek olarak verilebilir.

2.2.1. Serbest radikal polimerleşmesi

Katılma polimerizasyonu radikalik ve iyonik polimerizasyon olmak üzere iki şekilde ilerleyebilir. Zincir büyümesini sağlayan aktif merkezler radikalik karakterde ise radikalik zincir polimerizasyonu (radikalik polimerizasyon), iyonik karakterde ise iyonik zincir polimerizasyonu (iyonik polimerizasyon) tanımlanabilir.

Serbest radikal polimerleşmesi üç aşamada gerçekleşmektedir. Başlangıçta monomer molekülleri çeşitli yöntemler kullanılarak radikal haline dönüştürülür. Radikal oluşumu, ısı,

fotokimyasal, radyasyon veya çeşitli başlatıcılar tarafından sağlanır. Bu amaçla ortamda radikal oluşturmak için en yaygın yöntem ortama dışarıdan bir başlatıcı eklemektir. Başlatıcı, radikal oluşturarak vinil grubundaki çift bağa atak yaparak polimerizasyon işlemini başlatmış olur. Başlatıcı olarak çeşitli peroksitler, diazo bileşikleri ve redoks çiftleri kullanılır.

Peroksit başlatıcılardan en yaygın kullanılanı benzil peroksittir. Bu başlatıcı ısı ile kolaylıkla parçalanarak serbest radikal oluşturmaktadır. Daha sonra başlama aşamasında oluşan radikaller monomer molekülündeki çift bağı kırarak polimerizasyonu başlatırlar. Oluşan yeni radikaller ortamda bulunan monomerler ile reaksiyona girerek polimer zincirinin büyümesine neden olurlar. Polimerizasyon ilerledikçe polimer zinciri büyür ve molekül ağırlığı artar. Ortamdaki radikaller çeşitli yollar ile (dallanma yeni çift bağ oluşturma veya bir başka radikal ile reaksiyona girerek) sönmülenir ve polimerizasyon işlemi tamamlanır.

2.2.2. İyonik polimerizasyon

İyonik zincir polimerizasyonu, aktif merkezin karakterine bağlı olarak katyonik zincir polimerizasyonu (katyonik polimerizasyon) ve anyonik zincir polimerizasyonu (anyonik polimerizasyon) şeklinde iki ayrı başlık altında incelenir. Katyonik polimerizasyonda zincir büyümesi katyonik merkezler, anyonik polimerizasyon da ise anyonik merkezler üzerinden sağlanır. Monomer molekülleri bu aktif merkezlere ardarda katılarak aşağıda şematik olarak gösterilen aktif polimer zincirlerine dönüşürler (Saçak 2006).

Zincir polimerizasyonu serbest radikaller üzerinden olduğu kadar iyonlar ve koordinasyon kompleks yapıcı ajanlar üzerinden de yürüyebilir. Bir vinil monomerinin hangi mekanizma üzerinden polimerleştirileceği, sübstüye gruplara bağlıdır. Örneğin halojenlenmiş viniller (vinilklorür, vb. gibi) ve vinil esterler yalnızca radikallerle polimerleştirilirler. İyonik polimerizasyon genellikle katalizörlerin ayrı bir fazda bulunduğu heterojen sistemleri içerir. Reaksiyon hızı radikal polimerizasyonuna göre çok hızlıdır. Bazı durumlarda reaksiyon hızını kontrol etmek için polimerizasyon işlemi çok düşük sıcaklıklarda gerçekleştirmek gereklidir.

2.2.3. Kondenzasyon polimerizasyonu

Kondenzasyon polimerleri benzer veya farklı yapıdaki poli-fonksiyonel monomerlerin, genellikle küçük bir molekül çıkararak reaksiyona girmesiyle elde edilir. Burada en önemli koşul monomerlerin poli-fonksiyonel oluşudur. Hidroksil, karboksil ve amin gibi fonksiyonel gruplardan en az iki tane taşıyan monomerler esterleşme, amidleşme, vb. gibi reaksiyonlarla, küçük moleküller çıkararak, kondenzasyon polimerlerini oluştururlar. Poliüretanların elde edildiği üretan oluşumu ve naylon 6'nın elde edildiği kaprolaktam halka açılması gibi, küçük molekül çıkışı olmadan doğrudan monomerlerin katılması şeklinde yürüyen polimerizasyon reaksiyonları da genellikle bu grup içinde değerlendirilmektedir [24].

2.2.4. Kütle (yığın) polimerizasyonu

Kütle polimerizasyonu ve çözelti polimerizasyonu homojen polimerizasyon, süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonları da heterojen polimerizasyon teknikleridir. Bu tekniklerden süspansiyon ve emülsiyon polimerizasyonu mikroküre üretiminde kullanılmaktadır [25]. Bu tür polimerizasyonda monomer, içine uygun bir başlatıcı ilave edildikten sonra, belli sıcaklık ve basınçta doğrudan polimerleştirilir. Bu yöntemin en önemli özelliği ve kullanım nedeni oldukça saf polimerlerin üretilmesidir. Proses, polimerizasyon sonucu oluşan ürün, üretim sonrası ayırma, saflaştırma, vb. gibi bir çok işlemi gerektirmez.

Bu yöntemin en önemli dezavantajı ise ortaya çıkan ısıнын ortamdan kolay kolay uzaklaştırılamayışı, dolayısıyla sıcaklık kontrolünün güç olmasıdır. Bu hususa özellikle radikal polimerizasyonunda dikkat edilmelidir. Bu tür polimerizasyonlar şiddetli ekzotermiktir. Bu nedenden dolayı yüksek molekül ağırlıklı polimer moleküllerinin hemen oluşmasına ve ortam viskozitesinin hızla artmasına sebep olur. Sıcaklık kontrolü son derece zorlaşır. Yerel sıcaklık artışları, polimerin bozunmasına ve monomerin kaynaması sonucu gaz oluşumuna, hatta şiddetli patlamalara neden olabilir. Sıvı, katı, gaz halindeki monomerler bu yolla polimerleştirilebilir. Ancak daha çok sıvı monomerlerin polimerleştirilmesi için tercih edilir.

Ancak polimerizasyon sırasında artan ortam viskozitesi, ısı aktarımını ve karıştırmayı zorlaştırır. Ayrıca tepkimeye girmeyen monomerlerin temizlenmesi gerekir. Bu

dezavantajlar büyük ölçeklerde üretim yapılmasını sınırlar. Özellikle laboratuvar çalışmalarında kullanılan bir polimerizasyon yöntemidir.

2.2.5. Dispersiyon polimerizasyonu

Bu polimerizasyon tekniği ile 1-10 mikrometre arasında monodispers polimerik partiküller elde edilir. Dispersiyon polimerizasyonunun özelliği monomer fazı, dağıtma fazında çözünmektedir ama polimerizasyon işleme sonunda oluşan polimer dağıtma fazında çözünmemektedir.

2.2.6. Emülsiyon polimerizasyonu

Emülsiyon polimerizasyonunda birbiri ile karışmayan iki faz söz konusudur. Monomer fazı dağıtma fazı içinde emüsyon halinde dağıtılmıştır. Süspansiyon polimerizasyonundan farklı olarak burada başlatıcı dağıtma fazında çözünmüştür. Çeşitli emülsiyon yapıcı maddeler kullanılarak monomer fazı dağıtma fazı içinde kararlı olarak tutulmasını sağlarlar. Bunlardan en yaygın kullanılan sodyumdodesilsülfattır. Bu polimerizasyon tekniği ile 1.0 mikrometre civarında tek düze küresel partiküller elde etmek için kullanılmaktadır.

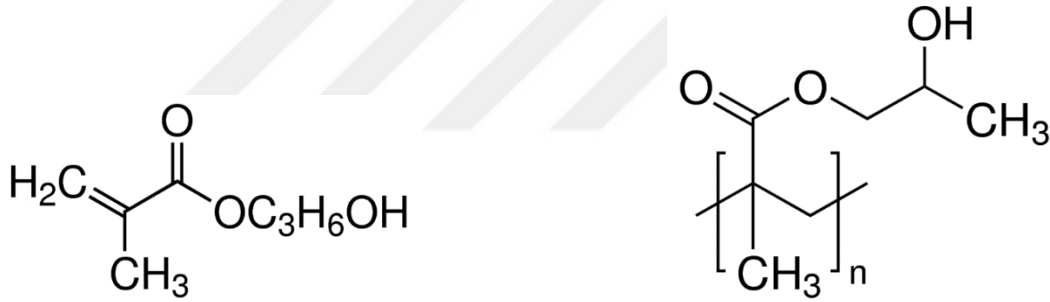
2.2.7. Süspansiyon polimerizasyonu

Süspansiyon polimerizasyonu ilk defa 1909 yılında Holfman ve Delbruch tarafından geliştirilmiştir. Endüstride büyük ölçekli polimer üretiminde kullanılan bu polimerizasyon tekniği ile reaktör işletim koşullarına bağlı olarak 50-1000 mikrometre çapında, gözenekli veya gözeneksiz partiküller elde edilebilmektedir. Bu teknikte, polimerizasyon sistemi monomer ve dağıtıcı fazdan oluşmaktadır. Monomerin dağıtıcı fazdaki çözünürlüğünün çok düşük olması beklenir. Bu amaçla, hidrofilik monomerler için yağ ve petrol eteri gibi hidrofobik sıvılar kullanılırken, hidrofobik monomerler için ise dağıtma fazı olarak genellikle su kullanılmaktadır. Monomer damlacıkları yapısında çözünmüş olarak başlatıcıyı içerir. Isı gibi etkiler ile polimerizasyon reaksiyonu başlatılır ve reaksiyon sonucunda her monomer damlası bir polimer partikülüne dönüşür. Süspansiyon polimerizasyonunda karşılaşılabilecek en büyük sorun partiküllerin birbirlerine yapışarak yığın faza dönüşme eğilimidir. Bunu önlemek için stabilizör maddelerin polimerizasyon sistemine ilave edilmesi gerekmektedir. Nihai olarak elde edilecek polimer partikülünün

çapının ve dağılımının, kullanılan stabilizatöre ve ortamın karıştırılma hızına bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir [26].

2.3. Çalışmada Kullanılan Monomerler

Hidroksipropil metakrilat (HPMA) temelli malzemeler, baskı mürekkepleri, reaktif yapıştırıcılar ve kaplamalar, tekstil liflerinin yüzey modifikasyonu, termal olarak çapraz bağlanabilir boya formülasyonları, fotorezistler ve radyasyonla sertleştirme, metal uygulamaları için yaygın şekilde kullanılmaktadır. HPMA'nın çapraz bağlama alanlarına dahil edilmesi, yüzeylere yapışmayı artırır ve aşınma direnci kazandırır. HPMA, yapısında hidroksil gruplarının bulunması nedeniyle, yumuşak kontak lenslerdeki 2-hidroksietil metakrilat (HEMA) yerine kullanılabilir. HPMA monomeri daha iyi bir su direnci direnci gerektiği zaman HEMA ile birlikte kullanılabilir. Daha iyi büzülme direnci için de tercih edilir.

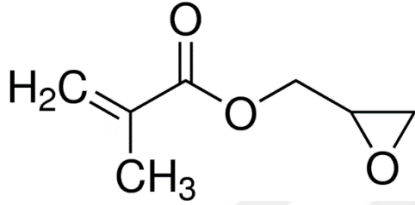


Şekil 2.1. HPMA ve pHPMA'nın kimyasal yapısı

HPMA monomeri, bazı komonomerler kullanılarak küre veya film yapıda hazırlanabilen polimerinin, mekanik dayanımının yüksek olması, kimyasal ve mikrobiyal degradasyona karşı dayanıklı olması, bu destek materyalini farklı alanlarda kullanılır hale getirmektedir. HPMA ve pHPMA'nın kimyasal yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. pHPMA'nın yüzey yapısı, gözenekli hazırlanmaya uygun olduğundan, geniş bir yüzey alanı elde etmek ve yüksek oranda ligand bağlamak mümkündür. Ek olarak, yüzeyinde hidroksil gruplarının bulunması, ligandların bağlanmasına olanak tanımaktadır.

Glisidil metakrilat (GMA), diğer akrilik monomerlere kıyasla düşük toksisiteye ve maliyete sahip hidrofilik bir vinil monomerdir. Yapısında epoksi ve akrilik olmak üzere iki önemli fonksiyonel grup bulundurur [27]. GMA'da bulunan epoksi grupları (Şekil 2.2), amin, tiyol

ve fenolik gruplarla kolayca reaksiyona girerek kararlı kovalent bağlar oluşturur. Epoksi grubuna sahip glisidil metakrilatın (GMA) geniş bir aralıktaki nükleofil ile reaksiyona girme kabiliyeti nedeniyle GMA, protein ayırımında kullanılmak üzere gözenekli polimerlerin hazırlanmasında önemli bir monomerdur. Epoksi fonksiyonel gruplar içeren alkil(met)akrilat polimer esaslı çapraz bağlı malzemeler, kaplamalar, kalıplama ve biyolojik olarak aktif maddeler için taşıyıcı olarak uygulamaları önem kazanmaktadır [28-29]. Özellikle, hidroksi fonksiyonel metakrilatlar ve glisidil metakrilat (GMA) komonomerlerinden oluşan kopolimerleri daha iyi mekanik özelliklere sahip oldukları rapor edilmiştir [30]. Örneğin, serbest radikal polimerizasyonu ile, GMA ile işlevselleştirilen selüloz nanokristallerinin varlığında hazırlanan akrilamit esaslı ağ yapılı nanokompozit hidrojellerin hazırlanması ile polimerin modul, kuvvet ve tokluğunda keskin bir artışın elde edildiği belirtilmiştir [31].



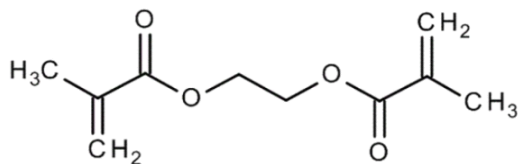
Şekil 2.2. GMA'nın kimyasal yapısı

Özellikle enzim moleküllerinin immobilizasyonu işlemlerinde ve depolamaya karşı kararlılığı arttırmak için, epoksi grupları içeren GMA'nın kullanımı önem kazanmaktadır [32]. Metakrilat esaslı hidrojellerin, bazı biyomedikal uygulamalarda yüzeylerde hücre bağlanmasına ve büyümesine direnç gösterdiği bilinmektedir. Santander-Borrego ve arkadaşları, epoksi grupları ile türevlendirilen hidrojellerin üretimi için, fonksiyonelite derecesinin ayarlanabilir hidroksietil metakrilata (HEMA) ve GMA'nın kopolimerini basit bir teknikle hazırlamışlardır [33]. Ek olarak, glisidil metakrilat monomeri, poliolefinlere ve diğer akrilatlarla epoksi işlevselleştirme sağlamak için de kullanılmıştır.

HPMA ve GMA kullanarak hidroksil fonksiyonel metakrilat esaslı çapraz bağlanmış materyallerin hazırlanmasına ve bu yolla hidrofobik yapıdaki GMA komonomerinin, hidroksipropil metakrilat temelli polimer yapısına katılarak mekanik özelliklerin gelişmesine katkı sağladığı rapor edilmiştir [34]. HPMA monomeri farklı birçok monomer kullanılarak kopolimerleştirilebilmektedir. Duyarlı materyallerin üretimi için polimerlerin GMA ile fonksiyonlandırılması veya aşılması üzerine yoğun çalışmalar yapılmış olsa da, hidroksi fonksiyonel metakrilatlara dayanan polimerlerin hazırlanmasına yönelik çalışmalar

sınırlı sayıdadır. Hidroksipropil metakrilat (HPMA) esaslı kopolimer polimer yapılarının tasarlanması, işlevsel komonomerlerin kullanılması ile başarılmıştır. Radikalik polimerizasyon ile elde edilen termal duyarlı p(NIPA-ko-HPMA) hidrojellerinde intramoleküler hidrojen bağlarının potansiyel oluşumu, Ilic-Stojanovic ve arkadaşları tarafından OH- gruplarına sahip HPMA'nın termal kararlılık ve kristalinite üzerine etkisini açıklamak için çalışılmıştır [35]. NIPA-HPMA'nın ısıya duyarlı kopolimer hidrojelleri gama ışınlanması ile de sentezlenmiş ve jel fraksiyonunun ilk solüsyonda HPMA oranını arttırarak hafifçe arttığı bulunmuştur. Ayrıca, glukozaya yanıt olarak insülinin geçirgenliği, membrandan insülinin geçirgenlik katsayısının pH ile değiştiği N, N-dietilaminoetil metakrilat ve HPMA kopolimer polimeri kullanılarak araştırılmış ve pH 6,8'in altında geçirgenlik katsayısında büyük bir artış gözlemlenmiştir [36]. Radyasyonla hazırlanan Akrilamid / hidroksipropil metakrilat / maleik asidin (AAM / HPMA / MA) terpolimer hidrojellerinin şişme çalışmaları, HPMA'nın AAM ve MA'dan daha az hidrofilik olduğundan, HPMA'nın AAM'ye dahil edilmesi ile şişme derecesini düşürdüğünü göstermiştir [37]. Birçok sensör sisteminin geliştirilmesinde, metakrilata dayalı akıllı hidrojellerin, implante edilebilir biyomedikal sensörler ve ilaç salım sistemlerine son derece uygun olduğu gösterilmiştir [38-39]. Lin ve arkadaşları belirli mol oranında tetraetilenglikol dimetakrilat (TEGDMA) ile çapraz bağlanmış HPMA ve N, N-dimetilaminoetil metakrilatı (DMAEMA) kullanarak $\approx 400 \mu\text{m}$ kalınlığında akıllı polimerik ince filmler hazırlamışlar ve kemo-mekanik sensör olarak kullanılmıştır [40].

Tez çalışması kapsamında çapraz bağlayıcı olarak etilen glikol dimetakrilat (EGDMA), bir eşdeğer etilen glikol ve 2 eşdeğer metilakrilik asit yoğunlaşmasıyla oluşan bir diesterdir. EGDMA monomerinin kimyasal yapısı Şekil 2.3'de gösterilmiştir.



Şekil 2.3. EGDMA'nın kimyasal yapısı

EGDMA monomeri kullanılarak homopolimer ve kopolimer hazırlanabilir. EGDMA'nın kopolimerleri; akrilik asit ve tuzları, amidleri ve esterleri ile; ve ayrıca metilakrilat, akrilonitril, maleik asit esterleri, vinil asetat, vinil klorid, viniliden klorid, stiren, bütadien, doymamış poliestерler ve kuruyan yağlar vb. ile hazırlanabilir. Etilenglikol dimetakrilat

monomerinin farklı organik ve inorganik bileşiklerle reaksiyona girmeye yatkın olması ve düşük viskozite, adezyon, esneklik, ve yüksek çapraz bağ yoğunluğu sunan bir hidrofilik disfonksiyonel metilakrilat olması nedeni ile geniş bir kullanım alanına sahiptir. Polimerik sistemlere çapraz bağlayıcı olarak EGDMA ilave edilmesi, materyallerin etkinliğinin ve mekanik özelliklerinin artırılmasına neden olmaktadır.

2.4. Manyetik Özellik Kazandırılmış Polimerler

2.4.1. Manyetik partiküller

Manyetik alandan etkilenen maddeler paramanyetik olarak adlandırılırken, manyetik alan varlığında tepki göstermeyen maddeler ise diamanyetik olarak adlandırılmaktadır. Hava, alüminyum ve silisyum paramanyetik gruba giren maddeler olarak örneklendirilebilir. Ferromanyetik maddeler ise, manyetik alan varlığında kalıcı olarak kuvvetlice etkilenen maddelerdir. Belirli bir büyüklükteki nanopartiküllerden oluşan demir, nikel, kobalt ve alaşımlarını içeren maddeler bu gruba dahildir. Tez çalışmasında kullanılan, kimyasal formülü Fe_3O_4 olan ve $\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$ şeklinde de gösterilebilen magnetit doğal mıknatıs özelliği sürekli olan demir oksit mineralidir. Magnetitde demirin iki farklı yükseltgenme basamağını içerdiğinden ($2+$ ve $3+$) bu materyalin iletkenliği Fe_2O_3 'e kıyasla daha fazladır. Manyetik mikroküreler genellikle Fe, Co, Cu, Mn tuzlarının çöktürülmesiyle elde edilen ferritler veya Fe_3O_4 (magnetit), Fe_2O_3 (maghemit) gibi demir oksitler kullanılarak sentezlenebilmektedir [41]. Manyetik özellik kazandırılmış inorganik veya organik temelli materyaller ayırma teknolojilerinde yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Ferromanyetik manyetik özelliğe sahip Fe_3O_4 partiküllerin işlemsel, kimyasal ve mekanik kararlılığını arttırmak için inorganik veya sentetik ve/veya doğal polimerik malzemelerle kaplanması sıklıkla başvurulan yöntemler arasındadır. Bu amaçla inorganik malzemelerin kullanılması; yüksek mekanik direnç kazandırılması ve sulu ortamında çözülmez olmaları ve çok uzun raf ömürleri sağlamaları nedeni ile önemli avantajlar sağlamaktadır. Ancak, Fe_3O_4 nanopartiküllerinin inorganik malzemelerle kaplanırken yüzey modifikasyonlarına yeterince olanak tanınamaması önemli bir dezavantaj oluşturmaktadır.

Fe_3O_4 nanopartiküllerinin kararlılığını arttırmak için kullanılan bir diğer yöntem ise organik kökenli doğal veya sentetik polimerik materyallerle manyetitin kaplanmasıdır. İnorganik temelli materyallere kıyasla polimerik materyallerin kullanımı, farklı uygulamalara cevap

vermek üzere istenen şekilde tasarlanarak sentezlenebilmeleri, farklı geometrik yapılarda ve gözenkli veya gözeneksiz olarak hazırlanabilmeleri ve yüzeylerindeki fonksiyonel gruplar sayesinde işlevsellendirilebilmelerini sağlar. Bu sayısız avantajları nedeni ile sentezlenen manyetik Fe₃O₄ nanopartiküllerinin organik temelli polimerik materyallerle kaplanması tercih edilmektedir. Manyetik partiküllerin kullanıldığı ayırma teknikleri sunduğu birçok avantaj ile laboratuvar ve endüstriyel ölçekli uygulamalarda tercih edilmektedir. Manyetik ayırma tekniğinin kullanımı ile santrifügasyon veya filtrasyon gibi ekip veya sistemlere gerek duymadan karışımındaki hedef analitin doğrudan ayrıştırılması ve saflaştırılması işlemlerinde kullanılması; sunduğu işlemsel kolaylık, düşük maliyet ve etkin verim nedeni ile biyoteknoloji uygulamalarında oldukça ilgi uyandırmıştır.

Günümüzde farklı geometrilerde üretilen polimerlerin birçok kullanım alanı bulunmaktadır. Geometrik olarak küre, çubuk veya membran yapılara sahip polimerik destek materyallerinin kullanılabildiği uygulamalarda, özellikle küre yapıdaki taşıyıcı destekler sağladığı avantajlardan dolayı tercih edilmektedir [42].

Manyetik özellik kazandırılmış polimerik materyaller, biyolojik karışımlardan protein veya enzimlerin ayrıştırılması ve saflaştırılması işleminde, enzim immobilizasyonunda, adsorpsiyon işlemlerinde kullanılmaktadır. Ayrıca medikal alanda, ilaç hedeflemede ve hipertermia işleminde, kontrollü ilaç salımında, hedef proteinlere seçici yüzeylerin hazırlanmasında, kromatografik destek materyallerinin sentezinde, sensör sistemleri veya önzenginleştirme sistemleri hazırlanmasında, yapay kas uygulamalarında, immünolojik test ve tanı kitlerinde ve moleküler biyoloji alanındaki araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır [43].

Manyetik alana duyarlı polimerler, genellikle polimer ağına içine demir oksit “Fe₃O₄” (magnetit) veya “Fe₂O₃” (hematit) gibi manyetik özelliğe sahip nanopartiküllerin immobilizasyonu ile hazırlanmaktadır. Ek olarak, kobalt (Co) ve nikel (Ni) gibi elementlerin polimerin içine yerleştirilerek ve ayrıca demir karmaşık bileşiklerini kullanılarak manyetik özelliğe sahip destek materyalleri hazırlanabilmektedir [44-45-46]. Günümüzde, özellikle biyoteknoloji ve tıp alanında çeşitli hücre, virüs ve virüs benzeri yapıların ayrımı, protein, DNA, RNA saflaştırma veya işaretleme, gıda analizleri, ilaç taşınımı, biyokataliz ve teşhis amaçlı çalışmalarda manyetik ayırma yöntemlerinden faydalanılmaktadır [47-48]. Yapılan bir çalışmada tirozinaz enzimini magnetit (Fe₃O₄) üzerine tutuklamış ve serbest enzime

kıyasla işlemsel ve ısısal kararlılığının artırıldığı ve katı desteğe tutturulan enzimin aktivitesinde sadece %5 değerinde bir kayıp olduğu bildirilmiştir [49]. Horak ve diğerleri tarafından, polimeraz zincir reaksiyonlarında (PCR), immünomanyetik ayırmalarda, Salmonella hücrelerinin saptanmasında, DNA diyagnostiklerinde ve genomik DNA izolasyonunda kullanılmak üzere dispersiyon polimerizasyonu ile manyetik poliglisidil metakrilat mikroküreleri hazırlanmıştır [50]. Manyetik polimerlerin genellikle iyi kütle aktarımı ve seçici ayırma gibi başlıca iki özellikten dolayı tercih edildiği literatürde rapor edilmiştir [51]. Manyetik özellik kazandırılmış polimerlere, ilgili reseptöre karşı protein veya monoklonal antibodi ile kaplayarak DNA fragmentlerini, hedef enzimleri, özellikli kanser hücrelerini, T- ve B- lenfositleri, granülositleri, lökositleri, monositleri, dendritik hücreleri, vücut sıvılarındaki (kemik iliği, dalak ve idrar) doğal koruyucu yapıları tutma ya da ayırma özellikleri kazandırılabilirdiği belirtilmektedir [52-53].

2.5. Polimerlerin Modifikasyonu

2.5.1. Aşılama

Atom transfer radikal polimerizasyonu, (ATRP), polimerlerin modifikasyonu için kullanılan yeni bir yöntemdir. Bu teknik, monomerden polimer ve kopolimer elde etmek amacıyla kullanılan bir sentez yöntemi olan serbest radikal polimerizasyon tekniğine dayalı bir polimerizasyon yöntemidir. Bu yöntemle, zincir uçlarında fonksiyonel gruplar bulunan, mol kütlesi kontrol edilebilen ve dar mol kütlesi dağılımlı polimerler hazırlanabilir. Son grupların fonksiyonel olması polimer zincir geometrisinin kontrolüne olanak sağlar ve yıldız, tarak veya aşı türü (ko)polimerler hazırlanır. ATRP yöntemi kullanılarak çok zengin geometrilere sahip blok kopolimerler, dendrimerler, hiper dallanmış zincirler ve ağsı kopolimerler elde edilmektedir.

ATRP tekniğinin mekanizması, yığın halde, çözeltide, ya da mikroemülsiyon, miniemülsiyon, emülsiyon, süspansiyon, dispersiyon ve ters miniemülsiyon gibi heterojen ortamlarda polimerleşme için kullanılabilir.

2.5.2. Ligand bağlanması

Hedef moleküle seçici olarak bağlanma yeteneği olan moleküller ligand olarak tanımlanmaktadır. Polimerik destek materyaline kovalent olarak bağlanan ligand molekülleri ile hedef molekül arasında genellikle, iyonik etkileşim, hidrojen bağları veya zayıf ve uzun mesafeli van der Waals etkileşimleri gibi zayıf etkileşimler gerçekleşmektedir [54].

Enzimler, koenzimler, kofaktörler, antikorlar, amino asitler, oligopeptidler, aptamerler, proteinler, nükleik asitler ve oligonükleotidler gibi çeşitli fonksiyonel moleküller, yeni desteklerin tasarımında ligand olarak kullanılabilir. Ligand olarak kullanılabilen aptamerler hem ucuz hem de hedef analite yüksek bağlanma afinitesi sergilemesi nedeni ile hali hazırda araştırmacıların dikkatini çeken bir makromolekül olmuştur.

2.6. Aptamerler

Aptamerler; peptidler, vitaminler, ilaçlar, mikroorganizmalar, bakteri sporları gibi çok çeşitli moleküllere yüksek affinite ve özgüllükte bağlanabilen oligonükleotidlerdir ve 1990'lı yılında SELEX (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) yöntemi olarak bilinen, in vitro seleksiyon ve amplifikasyon tekniği ile keşfedilmişlerdir. Geliştirilen bir yöntem sayesinde tek zincirli DNA, RNA oligonükleotitleri istenen dizilime göre sentezlenip saflaştırılabilir. Bu yöntem bir dizi tekrarlanan işlemde oluşur. İlk olarak tüm nükleik asitler hedef molekül ile inkübe edilir. Hedef ile sıkı bağlanan nükleik asitler, bağlanmayanlardan ayrılarak PCR ile çoğaltılır. Çoğaltılan bağlanma dizileri, hedef ile tekrar inkübe edilir. Her hedef için bu işlem 6-12 kere tekrarlanarak hedef moleküle en sıkı bağlanan nükleik asit seçilmiş olur. Seçilen nükleik asit klonlandıktan sonra sekanslanır [55]. Böylece hedefe en sıkı bağlanan aptamerin nükleik asit dizisi belirlenmiş olur. Son zamanlarda, aptamerler, yani diziliş havuzlarından rastgele seçilen belirli nükleik asitler biyosensörlerde biyolojik materyali olarak kullanılmıştır. Aptamerler, yüksek afiniteye sahip küçük moleküller ve proteinler gibi nükleik olmayan asit hedeflerini bağlama kabiliyetine sahiptir [56]. DNA, RNA ve aptamer problemleri, biyosensörlerde tipik olarak elektrokimyasal, optik, piezoelektrik ve manyetik transdüserler ile entegre edilebilir. Yapılan bir çalışmada, hazırlanan aptamer esaslı biyosensör sistemi kullanılarak karmaşık biyolojik karışımlardan, proteinlerin eş zamanlı olarak tespiti ve miktarsal tayini yapılmıştır [57].

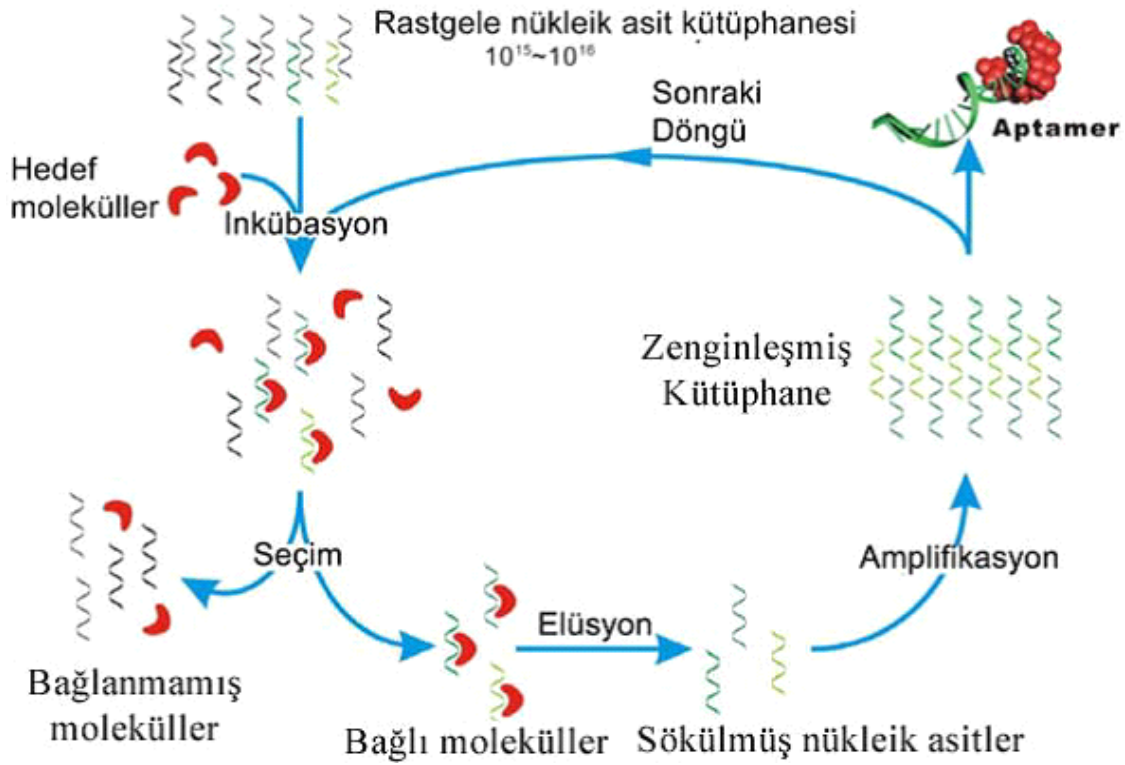
Biyosensörlerdeki hem birincil, hem de ikincil antikorlar genel olarak elektrokimyasal, optik ve piezoelektrik transdüserler aracılığı ile birleşirler. Sığır sütlerindeki progesteronun doğrudan ölçümünü yapmak için geliştirilmiş antikor esaslı optik biyosensör [58-59] gıda numunelerinde *E. coli* O157:H7 ve *Salmonella typhimurium*'un hızlı tespiti için üzerinde çalışılmış etiketsiz QCM imünosensör [60] ve sudaki antibiyotik ve pestisit kalıntılarını tespit için sunulmuş bir optik imünosensör [61] örnekler arasında sayılabilir.

Aptamerlerin, moleküler tanıda kullanılan yöntemler içindeki rolü ve önemi giderek artmaktadır. Aptamer temelli biyosensörler, antikor ve enzim temelli olanlarla karşılaştırıldıklarında sahip oldukları avantajlar şu şekilde sıralanabilir.

- Yüksek afinitedeki aptamerler, in vitro koşullarda herhangi bir hedefe karşı seçilebilirler. Bu yolla, birçok farklı aptamer tabanlı biyosensörlerin geliştirilmesini mümkün kılmaktadır.
- Hedef moleküle karşı seçilmiş olan aptamerlerin sekans dizileri kolayca belirlenebileceğinden, yüksek miktarda ve saflıkta sentezlenebilir. Bununla birlikte protein tabanlı antikor ve enzimlerden farklı olarak, DNA aptamerleri çoğunlukla yüksek düzeyde kararlıdır. Aptamer molekülleri, oda sıcaklığında saklanabilirler.
- Aptamerler hedefe bağlandıklarında, belirgin konformasyonel değişikliklere uğrarlar. Bu özellikleri yüksek özgüllükte ve seçicilikteki yeni biyosensörlerin tasarlanmasında esneklik sağlar [62-63].

Zelada-Guillen ve diğerleri biyoreseptör olarak aptamer ve iletken olarak karbon nanotüp kullandıkları, *Salmonella Typhi*'yi tespit edebilecek bir biyosensör geliştirmişlerdir. Araştırmacılar geliştirdikleri biyosensör ile 5 ml'lik sıvı içerisindeki tek bir bakteriyi %100 duyarlılıkta ve özgüllükte tayin edebilmişlerdir. Kantitatif ölçüm de yapabilme kapasitesine sahip bu biyosensör; aptamer ve bakteri arasındaki bağlanmayı 60 saniyeden kısa sürede göstermiştir. Diğer bir çalışmada; serumda Hepatit C virüsünün (HCV) NS5 kor antijeni, RNA aptameri ile yüksek özgüllükte tespit edilebilmiştir [64]. Aptamer biyosensörler ile bakterilerin tespiti virüslere göre daha yeni bir alandır. *Bacillus anthracis*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Escherichia coli* ve *Bacillus thuringiensis* gibi bakterilerin doğrudan tayininde kullanılmıştır. Aynı zamanda *Bacillus thuringiensis* sporlarının, kolera toksini, shiga toksin, stafilokokal enterotoksin B gibi mikroorganizma ürünlerinin aptamer biyosensörler ile gösteriliği çalışmalar literatürde mevcuttur [65]. DNA ve RNA'nın yapı taşı olan nükleik

asit molekülleri de oldukça hassas biyobileşenlerdir. Her hücrenin kendine has bir genetik yapısı olduğundan nükleik asit dizilimleri de kendilerine özgüdür. Aptamer kullanılarak geliştirilen bir biyosensör sayesinde 5 mililitrelik bir sıvı içindeki tek bir Salmonella bakterisini 60 saniyeden kısa sürede tespit etmek mümkün olmuş.



Şekil 2.4. Üssel zenginleştirme yolu ile Ligandların Sistemik Evrimi (SELEX) prosesinin şematik gösterimi

Aptamer sentezi için Selex yöntemi öncelikle nükleik asit havuzunun oluşturulması sonrasında inkübasyon ve amplifikasyon ile devam edip ızalasyon ile tamamlanır. Bu yöntemin başlangıç noktası rasgele DNA kütüphanesinin kimyasal olarak sentezlenmesidir [105].

Aptamerler yüksek ligand yoğunlukları ve kimyasal olarak kolay modifiye edilebilmeleri sayesinde özgün hedefler için biyosensörlerde bir bileşen olarak kullanılmaktadırlar. Problar; akustik algılama [66] optik algılama [67-68-69] etiketleme yapılmadan tayini sağlayıcı biyosensörler, [70] ve floresan sinyal algılama [71] gibi sensörlerde bir bileşen olarak kullanıldıkları rapor edilmiştir.

2.7. Biyolojik Makromoleküllerin Katı Destek Üzerine İmmobilizasyonu

2.7.1. İmmobilizasyon

Enzimler protein yapıda biyolojik katalizör molekülleridir. Enzimler reaksiyonlar sonunda reaksiyon ortamından değişmeden çıkarlar. Bu nedenle biyokatalizörler birçok kereden fazla kullanılabilir, ancak enzimin reaksiyon ortamında çözünür halde bulunması, enzimin çözeltiden ayrılmasını zorlaştırmaktadır. Böyle durumlarda enzim destek bir katı yüzeye tutuklanarak reaksiyon ortamında uzaklaştırılarak tekrar tekrar kullanılmaktadır. Enzim immobilizasyonu, enzimin sulu ortamlarda serbest çözünürlüğünü engelleyen bir yöntemdir. Kısaca, biyolojik olarak aktif bir katalizörün aktivitesini kaybetmeden bir destek üzerine tutturulması veya hapsedilmesine immobilizasyon denir. Biyolojik kararlılığını arttırmak, verimini yükseltmek, seçiciliğini ve dayanımını arttırmak gibi avantajları olan immobilizasyon enzimlere, hücresel organellere, mikrobiyal hücrelere uygulanabilmektedir.

Genel olarak immobilize biyokatalizörler kararlıdır ve kesikli tip reaksiyonlarda tekrarlı olarak ya da akışkan sistemlerde sürekli olarak kullanılmaktadır [72].

Başlıca immobilizasyon yöntemleri

Adsorpsiyon

Adsorpsiyon, bir maddenin bir matriks yüzeyine tutunması olayıdır. Adsorpsiyon yönteminin bazı avantajları vardır. Bu yöntem daha basit, ucuz ve tutuklanan enzimde yüksek katalitik aktivite korunduğu için diğer metotlardan daha yüksek bir ticari potansiyele sahiptir. Biyokomponent matriks yüzeyine kovalent olmayan etkileşimler hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ile tutturularak gerçekleştirilir.

Kovalent bağlama

Kovalent bağlama, bağlanma yüzeyindeki veya biyomakromolekül üzerindeki tiyol (-SH), hidroksil (-OH), amin (-NH₂), karbonil (-C=O), karboksil (-COOH) gibi fonksiyonel grupları arasında meydana gelen kovalent bağlarla gerçekleşmektedir. Kovalent olarak enzim tutuklanması için çeşitli destek materyalleri mevcuttur. Hidrofilik özellikli

taşıyıcıların genel olarak başarılı olarak uygulamalarda kullanıldıkları rapor edilmiştir. Örnek olarak, enzim immobilizasyonunda taşıyıcı olarak çeşitli karbohidrat polimerleri sıklıkla kullanılmaktadır (seluloz, dekstran, nisasta ve agaroz gibi). Bunların yanında akrilat kökenli polimerler ve ayrıca ak gözenekli silika partiküllerde kullanılmaktadır, ancak bunların hidrofilik özelliği karbohidrat polimerlerinden daha düşüktür.

Çapraz bağlama

Çapraz bağlama metodunda taşıyıcı bir materyal olmaksızın enzimlerin çeşitli çapraz bağlayıcılar kullanılarak birbirine bağlanması ile gerçekleştirilen bir immobilizasyon yöntemidir. Örnek olarak, glüteraldehit gibi reaktif bi-fonksiyonel malzemeler kullanılmaktadır. Çapraz bağlama ile elde edilen immobilizasyon ürünlerinde suda çözünmemektedir.

Matriks içi tutuklama yöntemi

Bu yöntemde enzim bir polimer ağ yapısının içerisine tutuklanmaktadır. Bu tutuklama yönteminde, substratın matriksin ağ yapısından içeri girmesine izin verilirken, protein de dışarı çıkmasına izin verilmemektedir. Bu yöntemin kovalent bağlanma ve çapraz bağlanmadan farkı enzimin matriks içerisinde serbest olmasıdır.

2.8. Patojen Mikroorganizmalar

Patojen kelimesi, eski Yunanca'daki "pathos" (acı) ve "genesis" (oluşma) kelimelerinin birleşimidir. Hastalığa sebebiyet veren her türlü organizmalara patojen denilmektedir. Bakteriler, virüsler, funguslar ve mantarlar patojen gruplarda içerirler. Genel olarak, infeksiyonlara ve gıdasal zehirlenmelere yol açarlar.

2.8.1. Salmonella

Genel olarak Salmonella türleri 2,0-5,0 µm boyunda çubuk şeklinde peritrik ayakları aracılığı ile hareketli, sporsuz, kapsülsüz, gram negatif ve fakültatif bir anaerobik bakteridir. Salmonella bakterilerinin üreme sıcaklık aralığı 20-40 °C dır. Genellikle S tipi koloniler yaparlar. M tipi koloni oluşturan türleride vardır (Salmonella schottmuelleri). Salmonella, tifo, paratifo ve gıda zehirlenmesine yol açabilen, çubuksu, gram

negatif bir enterobakteri türüdür [73-74]. Genellikle tüketilen gıdalar yolu ile bulaşır. Patojenik Salmonella suşları insan ve diğer birçok memeli türünde hastalık etkenidir. Salmonella serotipleri gastroenteritten, tifo, bakteremi, fokal infeksiyonlar ve yaşam boyu taşıyıcı duruma kadar geniş bir hastalık spektrumuna yol açabilmektedir. Tifoid olmayan Salmonella enfeksiyonları, ülkemizde ve dünya genelinde en önemli gıda infeksiyonlarından biridir. Hastalık şiddetli karın ağrısı, ateş, diyare, bulantı ve bazen kusma ile kendini göstermekte, çocuklarda ve yaşlılarda aşırı su kaybına bağlı olarak hayati tehlike yaratmaktadır. Salmonella tüm dünyada gıdalar aracılığı ile enfeksiyona yol açan en önemli etmendir. Salmonella süt ve süt ürünleri, et ve et ürünleri ile bulaşan gıda zehirlenmelerine neden olmaktadır. Salmonella spp., Listeria spp. ve S. aureus gibi patojenlerin kontaminasyonu, gıda endüstrisinde karşılaşılan en önemli sorun olmakla birlikte bu mikroorganizmaların belirlenmesinde kullanılan yöntemler uzun zaman gerektiren ve yüksek maliyetli gerektirmektedir. Salmonella'nın yol açtığı gastroenterit ölümlerle sonuçlanabilir. Gastroenteritin şiddeti konağın yaşına bağlıdır. Yenidoğanlarda, bebeklerde ve yaşlılarda daha şiddetlidir. [75-76]. Hastalık Kontrol Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention, CDC)'nin en son raporlarına göre, bütün gıda kaynaklı bakteriyel patojenler içerisindeki genel sıralamada en yaygın ikinci cins olup, salgınların % 23'ünü, hastalıkların % 31'ini ve hastaneye kaldırılma vakalarının % 62'sini Salmonella vakaları kapsamaktadır [77-78].

2.8.2. Patojen tayin yöntemleri

Klasik yöntem

Genel olarak; patojenlerin izolasyonu ve tanımlanması amacıyla kullanılan analiz yöntemlerinin bazı temel niteliklere sahip olması gerekmektedir. Bunlar;

- Analizlerin kısa sürede tamamlanması (zaman faktörü),
- Ucuz olması (maliyet faktörü),
- Spesifik olması (duyarlılık faktörü),
- Doğru sonuç vermesi (doğruluk faktörü),
- Kolay uygulanabilir olması,
- Kalifiye eleman ve alet-ekipman gereksiniminin fazla olmaması şeklinde sıralanabilir.

Kültürel yöntemlerin en önemli dezavantajı ise analizlerin sonuçlandırılmasının oldukça uzun bir süreye gereksinim duyulmasıdır.

Salmonella 'nın belirlenmesindeki klasik kültürel yöntemler genellikle önzenginleştirme (16-20 saat), selektif zenginleştirme (24-48 saat), selektif katı besiyerlerinde izolasyon (24-48 saat), biyokimyasal tanımlama ve şüpheli kolonilerin serolojik doğrulanması (48-72 saat) basamaklarından oluşmaktadır. Bu nedenle gıdalardan klasik kültürel yöntemlerle Salmonella izolasyonu ve tanımlanması için en az 5-7 güne ihtiyaç duyulmaktadır [79].

Bütün bunlara bağlı olarak da gıdalarda Salmonella belirlenmesi için hızlı yöntemler geliştirme çabalarının arttığı gözlenmektedir [80-81].

PCR

PCR, herhangi bir organizmaya ait genomik DNA' daki özgül bölgelerin çoğaltılmasını (amplifikasyonunu) sağlayan basit ama çok başarılı bir in vitro DNA sentezi yöntemidir. PCR; DNA molekülünün milyonlarca hatta milyarlarca kopyasını kısa zamanda yapan bir tekniktir. PCR ın alanları kısaca;

- DNA' nın dizi analizi ve DNA haritalamasında
- Genetik hastalık teşhisinde (orak hücre anemisi, kistik fibrozis, fragile X sendromu, AIDS, lösemi vb.)
- DNA parmak analizinde
- İnsan evrimi araştırmalarında
- İnsan Genom Projesi' ndeki araştırmalarda
- Allellik dizi varyasyonlarının gösterilebilmesi ile doku transplantasyonu için doku tipinin belirlenmesinde
- Adli tıp örneklerinin genetik tiplendirilmesi (analık babalık tayini)
- Tarımda (tohum saflığının belirlenmesi)
- Sistemik ve evölüsyon çalışmalarında (doğadaki çeşitli canlı türlerinin tanısı, türler arasındaki polimorfizmin belirlenmesinde)
- Hatta Mısır' daki mumyalardan DNA klonlamasında da kullanılmaktadır.

PCR teknolojisi gıda su ve klinik örneklerinin hızlı mikrobiyal incelenmesi için geliştirilmekte ve onaylanmaktadır [82-83].

Günümüzde kullanılan DNA bazlı tekniklerin birçoğu (Gen klonlama, DNA dizi analizi ve genetiği değiştirilmiş mikroorganizmalarla yapılan çalışmalar) PCR temeline dayanmaktadır. PCR ile gen çoğaltmada gerekli maddeler kopyalanacak hedef DNA, deoksiribonükleotidler (dATP, dCTP, dGTP, dTTP ve dUTP), DNA polimeraz enzimi (Taq polimeraz), gene özgü veya genel primerler ve reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan uygun PCR tamponudur. Tekniğin prensibi; bu maddelerin hedef DNA ile birlikte aynı ortama konularak homojen bir şekilde karıştırıldıktan sonra PCR aletine yerleştirilerek hedef DNA' nın çoğaltılması ve oluşan PCR ürünlerinin agaroz jel elektroforezi ile tespit edilip görüntülenmesidir [84-85].

PCR reaksiyonu üç aşamada gerçekleşmektedir. Bunlar sırasıyla; hedef DNA çift zincirinin açılması (denaturation; 94 °C'de 30-90 saniye), primerin bağlanması (annealing; 55-60 °C'de 0.5-2 dakika) ve primerin uzaması (extension; 72 °C'de 1 dakika) aşamalarıdır. Bu sıcaklık döngüsü 30-35 defa tekrar ettirildikten sonra polimerizasyonun tam olarak gerçekleşmesi için 5 dakika daha beklenerek reaksiyon tamamlanır. Bir sonraki kullanımına kadar PCR ürünleri 4-25 °C'de bekletilir. Burada her bir döngüden sonra oluşan zincirler yeni döngünün hedef zinciri olarak görev yapmaktadır [86].

PCR, 1985 yılında Cetus şirketinden Kary Mulis tarafından ilk uygulaması yapılan bir teknik olup, belirli bir DNA parçasının kopyalanmasına ve çoğaltılmasına olanak sağlayan in vitro bir yöntemdir. DNA ikili sarmalının yüksek sıcaklıkla birbirinden ayrılmasından sonra sıcaklık düşürülür, ve bu sayede oligonükleotid primerler çoğaltılacak olan DNA parçası üzerinde karşılıklı olarak eşlenik sekanslara bağlanırlar. PCR solüsyonundaki DNA polimeraz enzimi yüksek sıcaklıklarda çalışabilen bir enzimdir ve PCR döngüleri arasında ikili sarmalın açılması için kullanılan yüksek sıcaklığa dayanabilir. Primerlerin bağlanmasından sonra sıcaklık polimerizasyonun gerçekleşmesi için uygun bir sıcaklığa düşürülür. Primerler uzatılır ve primerlerin arasında kalan bölge sentezlenir. Sarmallar tekrar denatüre edilir, yeni primerler bağlanır ve DNA sentezi tekrar tekrar gerçekleşir; Bu işlem genelde 20 ila 50 döngü arasında tekrarlanır. Bir ısı dengeleyici ve programlanabilir su banyosu sayesinde süreç için gerekli olan sıcaklık değişimleri ayarlanabilir. Bu süreçte, DNA polimeraz olarak termofil bakteri *Thermus aquaticus*'dan izole edilen ve yüksek

sıcaklıklarda çalışabilen Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Süreç oldukça basittir, ancak kontaminasyon yaratan herhangi bir DNA da bu şekilde çoğaltılabilir.

2.9. Sensör

Elektronik uygulamalarda algılama işlemini yapan sistem yada elemanlara sensör denir. Ayrıca algılayıcı yada duyurga olarak da bilinmektedir. Her geçen gün yeni ve yüksek hassasiyet gerektiren yöntemlere olan ihtiyaç artmaktadır. Bu yeni yöntemlerden birisi de yüksek seçiciliğe sahip biyosensörlerin kullanılmasıdır. Sensörlerin temel fonksiyonu girdi miktarına yanıt olarak gelen sinyalleri üretmektir. Sensörler ölçüm sistemlerine göre sınıflandırılabilirler. Örnek olarak; Ortamdaki ısı değişimini algılamamıza yarayan sensör ısı sensörü denilmektedir. Bu tür sensörler sıcaklık değişimi ile direnç gösterimi değişen maddelerle yapılır. Burada kullanılan maddelere ise termistör denilmektedir.

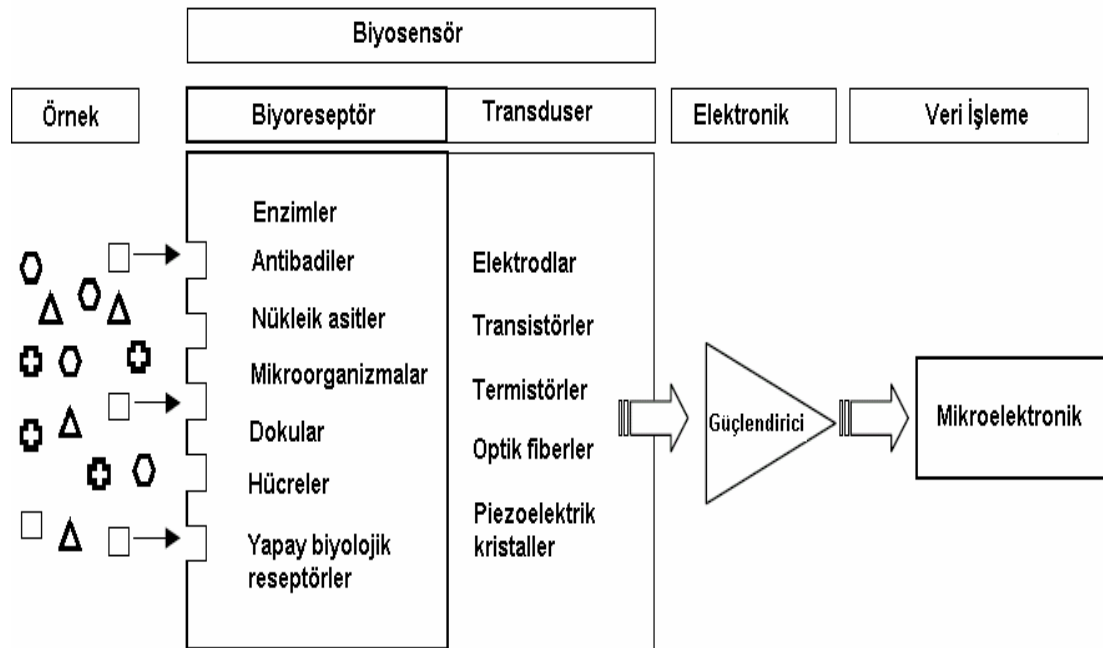
Günümüzde sıklıkla kullanılan X-ray, hazine arama dedektörü ve maden arama dedektörleri manyetik sensörlere örnek verilebilir. Bu sensörler manyetik alan etkisinden yararlanılarak oluşturulan sensörlerdir.

Herhangi bir kuvvet ve basınç değişimini algılayıp bunu elektriksel sinyale çevirebilen sensör çeşidine basınç sensörü denmektedir. Piezoelektrik Basınç sensörleri bu alanda oldukça kullanılmaktadır. Bu tür basınç sensörlerinde quartz, baryum turmalim gibi kristal yapıları maddeler kullanılır. Ani kuvvet ya da basınç değişikliklerini ölçmek için oldukça başarılı bir yöntemdir. Işık şiddetine prensibine göre çalışan sensörlere optik sensör denir. Bu sensörler ışık şiddetlerine göre dirençlerini artması veya azalması prensibine göre çalışmaktadır. Ses sensörleri ise havadaki basınç değişikliğini algılayarak sesi elektrik sinyale dönüştürün sensörlere mikrofön (ses sensörleri) denilmektedir.

2.9.1. Biyosensörler

Patojen tayininde teknolojinin gelişmesiyle biyoloji, kimya, fiziki elektronik dallarının ortak çalışmaları sonucu sensörler geliştirilmektedir. Sensörler, fiziksel ortam ile elektronik cihazları birbirine bağlayan bir köprü görevi görürler. Sistemdeki sensör veya sensör grupları yapısı hangi değişkene duyarlı ise sistem dışındaki değişkeni algılar ve elde ettiği değerleri sistemin karar verme birimine yollar.

Gün geçtikçe sensörlere daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. Özellikle gıda ve tıbbi alanlar için sensör çalışmaları hızla artmaktadır. Sensörler, pek çok bilim alanının bilgi birikiminden yararlanıp moleküllerin veya sistemlerin seçicilik özellikleri ile modern elektronik tekniklerin birleştirilmesiyle geliştirilen analitik cihazlar olarak tanımlanabilir. Çoğunlukla kullanım alanları klinik amaçlı olsa da sensörler çok farklı amaçlar için kullanılabilir. Sensörler analiz edilen madde ile seçimli bir şekilde etkileşime giren aktif bir bileşenin, bu etkileşim sonucunda ortaya çıkan sinyali ileten bir iletici sistemle birleştirilmesi ve bunların bir ölçüm sistemiyle kombinasyonu ile oluşturulur (Şekil 2.5) [87]. Tüm bu amaçlar doğrultusunda, sensörlerde tanıma elemanı olarak enzimler, anti-badiler, biyoreseptörler veya aptamerler gibi biyolojik tanıma makromolekülleri kullanılmaktadır. Genel olarak biyosensörler, biyolojik veya biyolojik olarak türetilmiş sensör elementinin, bir fizikokimyasal çevirici veya transduser ile bütünleştirilmesiyle oluşan kompakt analitik araçlardır [88]. İlk biyosensör sistemi L.C. Clark'ın kandaki oksijen seviyesini O_2 duyar amperometrik bir elektrotla ameliyat sırasında izlemesi ve ardından 1962 yılında ise O_2 duyar amperometrik elektrot yüzeyine glikoz oksidaz enzimini immobilize ederek hazırladığı glikoz biyosensörüdür [89]. 1975'de Divis'in bakterilerin biyolojik element olarak alkol ölçümünde mikrobiyal elektrotlarda kullanılabileceğini belirtmesiyle birlikte biyosensörlerin biyoteknolojik ve çevresel çalışmalarda kullanılmasına yönelik birçok çalışma başlamıştır [90].



Şekil 2.5. Biyosensör sistemlerinin genel gösterimi [106]

Biyosensörlerin genel olarak temel çalışma sistemi, analiz edilecek maddenin biyosensör yüzeyindeki biyoreseptörle etkileşime girmesi ve bunun sonucunda transduser yüzeyinde analit miktarıyla orantılı bir sinyalin oluşumu ve bu sinyalin ölçüm cihazına iletilmesi ilkesine dayanmaktadır. Biyosensörde kullanılan en önemli bileşen tayin edilecek analite karşı son derece hassas fakat tersinir bir şekilde etkileşime giren biyoreseptördür. Antikor, enzim, mikroorganizma, nükleik asit, hücre gibi biyolojik elementlerden oluşan biyoreseptör sayesinde biyosensör, spesifik olduğu hedef analiti tanıyarak etkileşime girer. Biyoreseptör molekülü, biyosensör içerisindeki biyolojik hassasiyete sahip olan kısım olup ölçülecek olan maddenin tanınmasından sorumludur. Üretilen bir biyosensör de seçicilik ve hassasiyet biyoreseptörler sayesinde kontrol edilir. Bu reseptörler sadece hedef molekülleri ile etkileşecek özellikte seçilmeli, diğer moleküller ile etkileşmemelidir.

Biyosensörler biyoaktif tabakalarında görev alan biyokomponentin türüne göre sınıflandırdığımızda:

1. DNA temelli biyosensörler
2. Enzim temelli biyosensörler
3. Doku temelli biyosensörler
4. Antikor/Antijen temelli biyosensörler (immünobiyosensörler)
5. Mikrobiyal kökenli biyosensörler şeklinde sınıflandırılırlar.

Biyosensörlerde en önemli konulardan biri seçiciliktir. Biyosensör sadece algılanması istenilen analite özgün olmalı ve diğer reaktiflere ilgi göstermemelidir. Seçicilik yeterli düzeyde olmadığında ek işlemlerle bu eksiklik giderilmelidir. Biyosensörün hedef analit tekrarlanabilirliği, kararlılığı ve duyarlılığı yüksek olmalıdır. Biyosensörde analizlenmesi hedeflenen örneğe en uygun biyokomponent ve transdüser seçilmeli ve bu iki eleman birbirine bağlanmalı yani biyokomponent transdüser yüzeyine kovalent olarak immobilize edilmelidir [91].

Enzimler biyosensörlerde kullanılan ilk biyokomponentlerdir. Enzimlerin saflastırılması, enzim stabilizasyonu ve immobilizasyon yöntemleri konusundaki ilerlemeler ve biyosensörlerde cevaplama hızının artması, analiz süresinin azalmasına katkılar sağlamaktadır.

Biyolojik ve biyokimyasal sinyalleri veya cevabı belirlenebilir sinyale dönüştürebilen sistemlere transduser denir [92]. Bundan yarım asır öncesinde ilk enzim elektrotunun bulunmasından bu yana biyosensör teknolojisinin çok hızlı gelişim gösterdiği belirtilmektedir [93]. Nitelikli bir biyosensörde hassasiyet, seçicilik, düşük ölçüm süresi, ömrü, kararlılığı, ömrü gibi detayların istenilen kriterlere uygun olmalıdır.

2.9.2. Elektrokimyasal sensörler

Elektrokimyasal biyosensörler, biyolojik bağlanma sonucu meydana gelen değişimleri yararlı elektrik sinyallerine çevirirler. Elektrokimyasal biyosensörler sağladıkları hızlı ölçüm alma, kolaylık, düşük maliyet ve tayin kapasiteleri sayesinde son yıllarda en çok üzerinde durulan sensör uygulamalarıdır. Daha da önemlisi altın nanopartiküllerin, elektrokimyasal sensörlerde kullanılması son dönemde en çok ilgilenilen konuların başında gelmektedir [94].

2.9.3. Optik biyosensörler

Fiberoptik problemlerin ucuna yerleştirilen enzim veya boyalar (floresans) ile ışığın etkileşmesi sonucu ışık şiddetinde meydana gelen değişimlerin ölçülmesi ile analit miktarının belirlenmesi prensibine dayanarak çalışan sensörlerdir.

2.9.4. Termal sensörler

Bir enzimatik reaksiyondaki entalpi değişiminden yararlanılarak substrat derişiminin belirlenmesine dayanır. Bütün biyolojik reaksiyonlar ekzotermiktir. Enzimatik reaksiyon sonucu oluşan sıcaklık değişimi ile substrat konsantrasyonu arasındaki doğrusal ilişkiden sonuca ulaşılır. Sıcaklık değişimleri termal olarak yalıtılmış ortamdaki termistörler veya termofiller aracılığıyla izlenir. Kullanılan termistörler çok küçük sıcaklık değişimlerine bile duyarlıdır. Dolayısıyla çok düşük miktardaki substrat derişiminin ölçümüne (10-5 M) olanak tanır.

2.9.5. Piezoelektrik biyosensörler

Sensör yüzeyindeki nanogram seviyelerinde kütle değişimini ölçebilen son derece hassas yüzey sensörleridir. Kütle duyarlı bu sensörlerin çalışma prensibinin temeli asimetrik

kristallerin sahip oldukları “piezoelektrik etki” özelliğine dayanmaktadır [95]. Piezoelektrik uygulamalarında kullanılan kristaller genellikle 10-16 mm boyutlarında, yaklaşık 0,15 mm kalınlığında disk, kare veya dikdörtgen şeklindedir. Rezonans frekansları 5,9 veya 10 MHz olan kuvars kristaller tercih edilir [96]. Çevirici olarak piezoelektrik kristallerin kullanıldığı kütle hassas biyosensörler, rezonans frekanstaki değişime dayanarak santimetrekarede nanogram seviyesinde kütle değişimini ölçebilen ve bu yüzden de antikor-antijen etkileşimlerinde sıkça kullanılan biyosensörlerdir. Kütle hassas biyosensörlerin çalışma prensibi piezoelektrik etkiye dayanır. Farkı türde kristaller piezoelektrik özellik gösterse de analitik uygulamalarda fiziksel, kimyasal ve elektriksel özellikleri sebebiyle kuvars kristaller tercih edilir. Piezoelektrik sensörlerin en önemli uygulaması “Kuars Kristal Mikroterazi” (QCM) dir. Piezoelektrik sensör grubunda ki QCM kütle algılayıcı bir sensördür.

2.10. Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM)

İlk kullanımı 18. yüzyılın başlarına dayanır. Bu dönemlerde kalitatif tayinler için kullanılan QCM, Sauerbrey (1959) eşitliğinin oluşturulmasından sonra kantitatif tayinler için de kullanılmaya başlanmıştır. Kuvars kristal mikroterazi (QCM), kütleli değişiklikleri, bir elektrik sinyaline çevirebilen mükemmel bir yaklaşımdır. Oldukça hassastır ve frekansın çıkış sinyaline dönüşümü kolaydır. Kuvars kristali, silikon ve oksijenden elde edilir ve SiO_2 kimyasal formülüne sahiptir. Ticari olarak kullanılan başlıca piezoelektrik maddesi kristalin kuvarsdır (silikon oksit).

Quartz Kristal Mikrobals (QCM) transducerde 10 MHz AT kesimli quartz kristallerinin rezonans frekansının absorplanan kütleyle orantılı değişmesi özelliğinden yararlanılmaktadır. Bu transducerde 1Hz'lik bir frekans değişimi cm^2 'de 1 ng'lık absorplanan kütleyle karşılık gelmektedir. Üzerine kaplanan seçici bir kimyasal arayüzeyle istenen molekül algılanabilmektedir. Yapılan çalışmalarda sensör yüzeyine immobilize edilmiş antibadilerin kullanıldığı QCM immünosensörler, HIV virüsünün de dahil olduğu pek çok analitin tayini için kullanılmıştır [97-99].

QCM'in kütle hassasiyeti, Sauerbrey denklemi tarafından verilen, kristalin toplam kütledeki osilasyon frekansı ve metal kaplı kristallerde kalan materyallerin adsorbe edilmiş tabakaları arasındaki ilişkilerden kaynaklanmıştır [100]. Bu denklem, frekans

değişikliği, Δf , ve kristal çip yüzeyi üzerindeki kütle değişimi, Δm , arasındaki ilişkiyi, aşağıdaki gibi açıklar:

$$\Delta f = -2\Delta m f_0^2 / A (\mu \rho_q)^{0.5} = -C_f \Delta m \quad (2.1)$$

Burada Δf ölçülen rezonans frekans azalmasıdır (Hz), f_0 kristalin temel modunun, rezonans frekansıdır, Δm elastik kütle değişimidir, A , kristal üzerine kaplanmış altın diskin alanıdır, ρ_q , kuvarsın yoğunluğudur ($2,684 \times 10^9 \text{ ng/cm}^3$), ve μ , kuvarsın yırtılma modülüdür ($2,947 \times 10^{20} \text{ ng/cm}^2 \text{ s}^2$). $\Delta m / A$, birim alan (ng/cm^2) başına kütle artışıdır.

2.11. Denge İzoterm Parametreleri

Aptamer ligandı bağlı QCM çiplerinin hedef analit, Salmonella hücreleri için denge bağlanma parametrelerinin tespiti için ileri ve geri bağlanma sabitleri, K_a (mL/CFU) ve K_d (CFU/mL) gibi, denge izoterm parametreleri iki farklı denge izoterm modeli, genellikle Langmuir ve Freundlich kullanılarak belirlenmektedir. Elde edilen deneysel veriler bu teorik izoterm modellerine uygulanarak denge model sabitleri belirlenebilmektedir. Langmuir ve Freundlich model denklemleri sırası ile aşağıdaki gibi verilmektedir.

$$\Delta m = (\Delta m_{\max} / K_d + C) \quad (2.2)$$

$$\Delta m = K_F C^{1/n} \quad (2.3)$$

Bu eşitliklerde, Δm QCM sensörün birim alanı üzerinde artan kütle miktarıdır (ng/cm^2); $\Delta m_{\max}$ teorik doygunluk kapasitesidir; C Salmonella hücrelerinin miktarıdır (CFU/mL); K_d (CFU/mL) denge ayrılma sabitidir ve denge birleşme sabitinin tersine eşittir ($1 / K_a$); K_F ve n ise, Freundlich model sabitleridir.

3. METARYAL VE METOT

3.1. Materyaller

3.1.1. Kimyasal malzemeler

Hidroksipropil metakrilat (HPMA), etilenglikol dimetakrilat (EGDMA) ve glisidil metakrilat (GMA), benzoil peroksit (BP), bipiridin, CuBr, 2-bromo-2-etilpropionil bromür (BMP), trietilamin ve tetrahidrofuran, toluen, etilen diamin, 6-merkaptohexanoik asit, karbodiimid (1-etil-3-3-dimetil-aminopropil karbodiimid hidroklorür) ve polivinil alkol (PVA), Sigma-Aldrich Chemical Co. (Almanya)'dan temin edilmiştir. Monomerler, azaltılmış basınç altında ve hidrokinon varlığında distile edilmiş ve kullanılabileceği kadar 4°C 'de saklanmıştır. Dwivedi ve diğerleri tarafından seçilen [4] ve Iontek Şirketi (İstanbul, Türkiye) tarafından sentezlenen *Salmonella* tanıyıcı (özellikli) aptamer, (NH₂-C6 CTGATGTGTGGGTAGGTGTCGTTGATTTCTTCTGGTGGGG) ilgili firmadan temin edilmiş ve kullanılmıştır. Diğer tüm kimyasal maddeler analitik derecededir ve Merck AG (Darmstadt, Almanya) şirketinden satın alınmıştır. Saflaştırılmış su, araştırmada kullanılmıştır ve süt (≥ % 1.5 yağ) yerel bir mağazadan elde edilmiştir. Ölçümler sırasında tüm deney seti, üç kez tekrarlanmıştır.

3.1.2. Cihazlar

UV-VIS spektrofotometre

Hazırlanan manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) küreleri üzerine *Salmonella* bakterilerinin seçici olarak bağlanabilmesi için, NH₂ grubu içeren aptamerler ligandı yüzeye kovalent olarak bağlanması için kullanıldı ve bağlanan aptamer miktarı spektrofotometrik olarak UV-VIS spektrofotometresi kullanılarak belirlendi (PG Instruments Ltd., Model T80+; PRC)).

Kuartz kristal mikrobals (QCM) sistemi

QCM aptamer-sensörü hazırlamak için QCM sensör kristali üzerine *Salmonella*'ya spesifik aptamerin immobilizasyonu gerçekleştirildi, *Salmonella* bakterisinin miktarsal tayininde kullanılmak üzere kalibrasyon grafiği elde edildi. Daha sonra, PBS içinde veya seyreltilmiş

süt içinde süspanse edilen *Salmonella* ve *E. coli* bakteri hücreleri, QCM sensörü ile hazırlanan kalibrasyon eğrisi yardımı ile miktarsal tayinleri (CHI 400A, CH Instruments, Teksas, ABD) QCM sistemi kullanılarak gerçekleştirildi.

QCM çipi

Salmonella 'ya spesifik aptamer ligandının bağlanması için kullanılan, kuvars kristal çipleri (15 mm çapında ve parlatılmış Au elektrotların çapı = 5,0 mm, kalınlığı = 1000 Å, EQCM için 10,0 MHz AT-kesim piezoelektrik kuvars tabaka (CH Instruments, Teksas, ABD) CHI firmasından temin edildi.

Kuartz kristal mikrobals (QCM) akış sistemi

QCM sensör kristali üzerine *Salmonella* 'ya spesifik aptamerin immobilizasyonu işleminde altın kaplı kuartz kristal çipleri, QCM akış hücresine (EQCM flow cell kit, CH Instruments, Teksas, ABD) yerleştirilerek çalışıldı.

Enjeksiyon pompası

QCM çiplerine aptamer ligandı immobilizasyonunda ve hedef bakteriye seçiciliğinin belirlenmesi işlerinde, QCM akış hücresinden analitlerin sürekli geçişi bir enjeksiyon pompa (ISOLAB, Model: 540060-B, Almanya) kullanılarak sağlandı.

Kullanılan diğer cihazlar

Manyetik karıştırıcı (Velp Scientifica, Italya), pH metre (NEL Elektronik, Türkiye), vakum etüvü (Nüve EV018, Türkiye), çalkalamalı su banyosu (Nüve ST402, Türkiye), inkübatör (EN025, Türkiye), sirkülatörlü ısıtıcı soğutuculu su banyosu (Labcon CPE20, Labcon LTB12140, Güney Afrika).

3.2. Yöntem

3.2.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin hazırlanması

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı ve glisidilmetakrilat (GMA) polimer zincirleri manyetik mikrokürelerin yüzeyine aşıl原因arak yüzeyde fonksiyonel gruplar elde etmek için modifiye edildi [15]. Süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile çapraz bağlayıcı (etilenglikol dimetakrilat, EGDMA), hidroksipropil metakrilat (HPMA) monomeri kullanılarak hedef patojen bakteriye spesifik aptamer ligandının immobilizasyonunda ve gerçek numune uygulamalarında ön zenginleştirme işleminde kullanılmak üzere manyetik özellik kazandırılmış küre geometrisinde poli(hidroksipropilmetakrilat/etilenglikoldimetakrilat), p(HPMA/EGDMA), mikroküreleri hazırlandı. Bu amaç doğrultusunda, etilenglikoldimetakrilat monomeri polimerizasyon işleminden önce, NaOH-NaCl çözeltisi kullanılarak monomer içindeki inhibitör uzaklaştırıldı ve çapraz bağlayıcı içerisinde kalacak muhtemel su molekülleri ise CaCl_2 kullanılarak uzaklaştırıldı. p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin sentezi ve manyetizasyonu iki aşamada gerçekleştirildi. Birinci aşamada, demir içeren p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri, Fe^{+3} iyonları varlığında süspansiyon polimerizasyonu yoluyla hazırlandı. Polimerizasyon karışımı (HPMA (7,5 mL), EGDMA (7,5 mL)) ve stabilizatör olarak da, polivinil alkol (PVA) çözeltisinden (15 mL, %5,0 w/v) oluşan organik fazı içeren polimerizasyon çözeltisi bir reaktör içerisine aktarıldı ve sıcaklığı 65 °C olan su banyosu içerisine yerleştirildi. Dağıtıcı ortam olarak kullanılan toluen (15 ml) içerisinde benzoil peroksit (0,2 g) çözüldü ve elektrolit olarak FeCl_3 (0,3 M, 300 ml) içeren sulu çözeltide reaktöre ilave edildi. Polimerizasyon işlemi, 250 rpm karıştırma hızında 70 °C'de 2,0 saat ve 80 °C'de 1,0 saat mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılarak gerçekleştirildi. İkinci aşamada ise p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin yapısında demir oksit kristali oluşumu için Fe^{+2} iyonları içeren $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonu gerçekleştirildi. Ko-presipitasyon işlemi için p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri (50,0 g) 100 mL distile su içerisinde FeCl_2 (4,0 g) çözeltisinin bulunduğu reaksiyon kabına aktarıldı. Mekanik karıştırıcı ile sürekli karıştırılan reaktör, azot atmosferi altında 50 °C'de 4,0 saat ve sonra, 90 °C sıcaklıkta 2,0 saat süresince geri soğutucu altında damla damla $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ amonyak (50 mL, %25 w/v) eklenerek reflaks işlemine tabi tutuldu. Termal çöktürme reaksiyonu süresince, p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin içerisinde Fe_3O_4 nanopartikülleri oluşturuldu. Bu işleminin tamamlanmasının ardından, bühner hunisi

ile süzölen manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroköreleri, reaksiyon ortamından ayrıldı, 3 saat etanol öözeltisi (70%; 250 ml) ile yıkandı ve daha sonra sırası ile distile su, sitrik asit, nitrik asit, NaCl öözeltisi ve su ile yıkandı. Manyetik mikrokörelere bir mıknatıs yardımı ile toplandı ve 50°C'de vakum etüvünde kurutuldu ve kullanıllana kadar oda sıcaklığında muhafaza edildi.

3.2.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokörelereinin hazırlanması

Süspansiyon polimerizasyonu ile hazırlanan manyetik p(HPMA/EGDMA) köreleri, yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu (SI-ATRP) tekniğı kullanılarak p(GMA) ile fırça tipi polimer ile aşılandı [27]. Bu amaç doğrultusunda, 75-150 µm boyut dağılıllına sahip mikrokörelere, p(GMA) ile aşıllama için kullanıldı. Bu amaçla öncelikle manyetik p(HPMA/EGDMA) körelere Br-uçlu fonksiyonel mikrokörelere olarak hazırlandı ve sonrasında ise glisidil metakrilat monomeri brom ile fonksiyonlandırılan mikrokörelere yüzeyine ATRP yöntemi ile aşılandı ve yüzeyde p(GMA) fırçaları oluşturuldu.

3.2.3. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokörelere yüzeylerine Br- uçlu fonksiyonlandırılması

Manyetik p(HPMA/EGDMA) körelere yüzeyinde p(GMA) fırçaları elde etmek için, 2-bromo-2-metilpropionil bromid (BMP) ile, literatürde tanımlandığı gibi modifiye edildi [5]. Manyetik p(HPMA/EGDMA) körelere (yaklaşık 20 g), 200 mL tetrahidrofuran ve 6,0 mL trietilamin, bir balon içereisine aktarıldı ve manyetik olarak 50 dev/dak'da karıştırıldı. Daha sonra, manyetik mikrokörelere içeren bu öözelti ortamına 2-bromo-2-metilpropionil bromid (5,0 mL) sürekli karıştırılarak 30 dakika içereisinde damla damla ilave edildi ve brominasyon reaksiyonunun oda sıcaklığında 5 saat süresince devam etmesi sağlandı. Brominasyon reaksiyonun tamamlanmasının ardından, manyetik mikrokörelere dışarıdan uygulanan manyetik alanla öözelti ortamından uzaklaştırıldı ve elde edilen manyetik mikrokörelere, p(HPMA/EGDMA)-Br olarak gösterildi. Öözelti ortamından uzaklaştırılan manyetik p(HPMA/EGDMA)-Br mikrokörelere 5 kez aseton ve saf su ile yıkandı ve bir vakum etüvünde 50 °C'de kurutuldu.

3.2.4. p(GMA) fırçalarının Br-ile fonksiyonlandırılan manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerine ATRP ile Aşılması

Br-sonlu fonksiyonlandırılmış manyetik mikroküreler (10,0 g), bir reaktöre (100 mL) aktarıldı ve 30 mL glisidil metakrilat (GMA) monomeri eklendi. Reaktör içerisine, CuBr (0,6 g), bipiridin (2,81 g) ve dioksan (30 mL) ilave edilerek 65 ° C'de 10 saat süresince aşılama polimerizasyonu gerçekleştirildi. Reaksiyonun tamamlanmasının ardından, elde edilen manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri, dışarıdan uygulanan manyetik alanla çözelti ortamından uzaklaştırıldı ve aseton (250 ml) içerisine aktararak polimerizasyon kalıntıları uzaklaştırıldı. Daha sonra, P(GMA) aşılansın manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri, yaklaşık % 2,0'lik (w/v) EDTA içeren bir çözelti ortamına aktararak bakır iyonlarının uzaklaştırılması için 48 saat sürekli karıştırıldı. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri 5 kez olmak üzere su ve etanol ile arka arkaya yıkandı ve 4 ° C'de % 70 etanol içerisinde saklandı.

3.3.5. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine aptamer ligandının bağlanması

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri (yaklaşık 50 mg), fosfat tamponu (50 mM, pH 8,5) içinde, 2 saat süre boyunca dengeye getirildi. Tampon içerisinden uzaklaştırılan p(GMA) aşılı manyetik mikroküreler, *Salmonella* bakterisine özgün -NH₂ gruplarına sahip olan yukarıda nükleik asit dizisi verilen aptamer ligandlarının (100 µL, 200 µM; 50 mM, pH 8,5) içeren, bağlanması için kullanıldı. Aptamer ligandının manyetik mikrokürelere immobilizasyonu yukarıda verilen koşullarda 18 saat sürekli olarak karıştırılan reaksiyon ortamında, 25 °C'de, gerçekleştirildi. Aptamer ligandı bağlanma işlem basamağının ardından, fiziksel olarak adsorplanan aptamer moleküllerinin manyetik mikrokürelerden uzaklaştırılması için, fizyolojik tampon çözeltisi (PBS; 50 mM, pH 7,4) ile yıkandı. Elde edilen mikroküreler aptamer immobilize edilmiş mikroküreler (*Salmonella*-aptamer-mikroküre) olarak adlandırıldı.

3.4.6. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin karakterizasyonu

Manyetik mikrokürelerin SEM görüntüsü

Vakum etüvünde kurutulmuş manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri bir stap üzerine yerleştirildi ve azaltılmış basınç altında altın ile kaplandı. SEM mikrografları JEOL (JMS 5600) taramalı elektron mikroskobu kullanılarak elde edildi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin boy-boyut dağılımı

Manyetik mikrokürelerin ortalama boy ve boyut dağılımı farklı gözenek boyutuna sahip moleküler elekler kullanılarak belirlendi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yüzey alanlarının belirlenmesi

Manyetik mikrokürelerin yüzey alanı, BET (Brunauer-Emmett-Teller) metodu kullanılarak yüzey analizi cihazı ile ölçüldü. Çok tabakalı fiziksel adsorpsiyonu ifade eden teorik BET denklemi aşağıdaki eşitlik ile ifade edilir [101].

$$q_{\text{den}} = BQ^0 C_{\text{den}} / (C_s - C_{\text{den}})[1 + (B-1)(C_{\text{den}}/C_s)] \quad (3.1)$$

Burada, C_s adsorplanan bileşenin doygunluk konsantrasyonu, B ve Q^0 ise sırasıyla adsorplayıcı yüzeyi ile çözelti arasındaki etkileşim enerjisini gösteren ve tek tabaka adsorpsiyon kapasitesini ifade eden bir sabittir.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin şişme oranı

Manyetik mikrokürelerinin şişme oranı, distile su içerisinde tayin edildi. Vakum etüvünde kurutulan mikroküreler ($\sim 1,0$ g) içerisinde distile su bulunan volümetrik kaba aktararak sabit sıcaklıktaki ($25 \pm 0,5$ °C), izotermal su banyosu içine yerleştirildi ve 24 saat sonundaki yükseklik okundu. Kürelerin şişme oranı aşağıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Şişme Oranı} = \text{ilk yükseklik} / \text{son yükseklik} \quad (3.2)$$

Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerindeki demir oksit miktarının tayini

Manyetik mikroküreler bulunan Fe_3O_4 miktarının tayini literatürde tanımlandığı gibi gravimetrik yöntem kullanılarak belirlendi. Manyetik küreler, 110 °C’de vakum fırınında, yapısal suyun uzaklaştırılması için 2 saat kurutuldu ve oda sıcaklığında soğutuldu. Sonra, örnek manyetik küreler, bir kroze alını ve oda sıcaklığında tartıldı. Örnek içeren kroze 500 °C’de 4 saat süre ile bir kül fırınına yerleştirildi, bu süre sonunda organik tamamen yakılarak uzaklaştırıldı. Daha sonra, kroze oda sıcaklığına soğutuldu ve tartıldı.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yoğunluk tayini

Manyetik mikrokürelerin yoğunluğu Gay Lussac piknometresi ile, 25°C sıcaklıkta manyetik mikroküreler için çözücü olmayan bir sıvı (n-Dekan) kullanılarak belirlendi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-Br mikrokürelerindeki bromür tayini

Br ile fonksiyonlandırılan manyetik p(HPMA/EGDMA)-Br mikrokürelerinin bromür içeriği titrimetric yöntem kullanılarak belirlendi. Bu amaçla, 0,2 g brom ile fonksiyonlandırılmış mikroküre, 50 ml’lik balonda 10 ml metanolik NaOH çözeltisi (5,0 M) ile 4 saat reflaks edildi. Karışım filtre edildi ve distile su ile yıkandı ve filtrat bir volumetrik kap içine aktararak su ile 250 ml’ye seyreltildi. Çözeltinin NaBr içeriği merkürük tiyosiyanat metodu [102] ile kolorimetrik olarak analiz edildi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin epoksi grubu tayini

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin, erişilebilir epoksi grubu içeriği literatürde tanımlanan piridin-HCl yöntemi ile belirlendi [103]. Bu amaçla, 0,5 g manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküre piridin-HCl çözeltisi (50 ml) ile 20 dakika geri soğutucu altında etkileştirildi. Reaksiyon sonunda örnek ayarlı NaOH çözeltisi (0,1 M) ile titre edildi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) Mikrokürelere p(GMA) aşılama yüzdesinin belirlenmesi

Aşılama yüzdesi (AY) aşağıdaki eşitlik kullanılarak ağırlıktaki yüzde artışın hesaplanmasıyla belirlendi:

$$AY = [(m_g - m_0) / m_0] \times 100 \quad (3.3)$$

Burada m_0 ve m_g sırasıyla aşılama öncesi ve sonrası kürelerin ağırlıklarıdır.

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) yapısından magnetit sızma çalışmaları

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinden sızan magnetit miktarını belirlemek için, mikroküreler (200 mg), 0,1 M HNO₃ derişimine sahip desorpsiyon ortamına (15 ml) aktarıldı ve 24 saat çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Ortam içersine sızan Fe iyon miktarı, atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS; AA 6800, Shimadzu, Japan) ile belirlendi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin Fourier transform infrared (FTIR) spektrası, bir FTIR spektrofotometre (FTIR 8000 Series, Shimadzu, Japan) kullanılarak elde edildi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin manyetik özelliğinin belirlenmesi

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-gp(GMA) mikrokürelerinin manyetizasyonuna karşı, uygulanan manyetik alan, titreşimli örnek manyetometresi (VSM; Model 155, Digital Measurement System, Inc., Westwood, MA, ABD) ile belirlendi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin termal özelliği

p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g p(GMA) manyetik mikrokürelerinin termogravimetrik analizi (TGA), bir DSC–diferensiyel termal analiz (DTA) cihazı (Model

DSC-60-DTG-60H, Shimadzu, Japan) kullanılarak gerçekleştirildi. Her analiz 10 mg örnek ile 10 °C/dak ısıtma hızında, azot atmosferi altında yapıldı ve örnekler, hava geçiren alüminyum kaplara yerleştirildi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine bağlanan aptamer ligandı miktarının belirlenmesi

Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine kovalent olarak bağlanan *Salmonella* bakterisine özgün bağlanan aptamer ligand miktarı, UV-vis spektrofotometre kullanılarak ölçüldü. Derişimi bilinen standart aptamer ligandı çözeltilerin absorbansı, bir UV-vis spektrofotometresi (PG Instruments Ltd., Model T80+; PRC) kullanarak, 265 nm dalga boyunda ölçülerek kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve immobilizasyon işleminden sonra bağlanan aptamer miktarı bu kalibrasyon grafiği yardımı ile belirlendi. Ayrıca, bağlanan aptamer ligandı miktarı İstanbul Kemerburgaz Üniversitesi'nde bulunan UV-vis NanoDrop 2000 (Nanodrop products, Wilmington, ABD) kullanarak, 265 nm'de ölçüldü.

3.5. QCM Sensör Kristali Üzerine *Salmonella*'ya Özgün Aptamerlerin İmmobilizasyonu

Kuvars kristalin altın elektrod yüzeyi, ilk olarak sıcak pirana çözeltisi (%30 H₂O₂:H₂SO₄/1:3) ile 15 süre ile dakika temizlendi, daha sonra, etanol ve su ile yıkandı. Kurutulduktan sonra QCM akış hücresi sistemi içine yerleştirildi [104]. Akış hücresi, iki vida ile bir arada tutulan bir üst ve bir alt parçası olan, akrilik polimerden oluşmaktadır. QCM kristali, üst ve alt parçalardaki, iki O-ring-halkası arasında sabitlenmiştir. QCM sensörünün frekans değişimi akış hücresi uygulamaları süresince gerçek zamanlı olarak gözlemlendi. Her işlemin ardından, başlangıç ve sonuç frekans değişim farkı sensör yüzeyi modifikasyon basamakları sırasında kullanılan yığın uygulamaları için kaydedildi. *Salmonella* bakterisine özgün aptamer, kuvars kristal yüzeyi (15 mm çapında ve parlatılmış Au elektrotların çapı = 5,0 mm, kalınlığı=1000 Å, EQCM için 10,0 MHz AT-kesim piezoelektrik kuvars tabaka; CH Instruments, Teksas, ABD) üzerinde aşağıda verildiği gibi immobilize edildi.

3.5.1. QCM sensör kristalinin modifikasyonu

Kuvars kristalin yukarıda verilen akış hücresine yerleştirildi ve akış hücresi 10 mL'lik bir şırınga içeren enjeksiyon pompasına bağlandı. Miyarların geçişi oda sıcaklığında 100 mL/s'lik akış ile sağlandı bu yolla QCM çipi üzerinde farklı modifikasyon işlemleri gerçekleştirildi. İlk basamakta, 6-merkaptoteksanoik asitin altın kristal üzerinde kendiliğinden oluşan tek tabaka oluşturulması sağlandı. 6- merkaptoteksanoik asit çözeltisinin (% 2'lik, 5,0 mL, pH 8,0), 2,0 saat süre ile akış hücresi içerisinden geçişi sağlandı ve istenilen tabakanın çip yüzeyinde oluşumu sağlandı. Bu sürenin sonunda, modifiye edilmiş altın kristal, PBS ile (5,0 mL, 10 mM, pH 8,0) yıkandı.

Yukarıdaki işlem basamağının ardından, kristal üzerine immobilize edilen 6-merkaptoteksanoik asitin karboksil grubu karbodiimid ile aktive edildi. Bu işlem için, QCM çipi akış hücresi yerleştirildi ve karbodiimid çözeltisi (5,0 mL, 4,0 mg/mL, pH 4,0), bir enjeksiyon pompası kullanılarak akış hücresi içerisinden enjeksiyon yolu ile çözeltinin geçişi sağlandı ve kristalle yaklaşık 3,0 saat süre boyunca teması sağlandı.

3.5.2. Aktive edilen QCM sensör kristaline aptamer ligandının immobilizasyonu

Tez çalışmasının bu kapsamdaki deneyler, aptamer ligandının temini, immobilizasyonu İstanbul Kemerburgaz Üniversitesinden Sayın Doç. Dr. V. Cengiz ÖZALP'ın danışmanlığında gerçekleştirildi.

Aktive edilmiş altın kristal, Salmonella bakterisine özgün aptamer (PBS içerisinde 100 mg mL) ihtiva eden bir reaksiyon kabına yerleştirildi. Aktive edilmiş altın kristal üzerindeki amino etiketli aptamerin immobilizasyonu, 18,0 saat boyunca oda sıcaklığında yavaşça reaksiyon ortamı çalkalanarak gerçekleştirildi. Bu süre sonunda, QCM çipi, reaksiyon ortamından uzaklaştırıldı ve 1,0 M NaCl ile ve daha sonra PBS ile yıkandı. Üreticinin kılavuzuna göre (CH Instruments) 1,0 Hz'lik bir net değişiklik, 0,196 cm²'lik kristal yüzeyi alanı üzerinde, 1,34 ng kütle değişimine karşılık geldiği belirtildi ve gerekli hesaplamalar bu doğrultuda yapıldı [27].

3.6. Bakteri Kùltürlerinin Hazırlanması

Tez çalışmasının bu kapsamdaki deneyler, İstanbul Kemerburgaz üniversitesi'nde sayın Doç. Dr. V. Cengiz ÖZALP'ın araştırma laboratuvarında gerçekleştirildi [27]. *Salmonella* ve *E. coli* bakterileri, tripton soya sıvı besi yeri (TSB) içinde 37 °C'de, donmuş stoktan bir gece boyunca büyütüldü. Koloni sayımı deneyleri için, numuneler, TSB agar üzerinde yüzey üzerine ekildi. Plaklar, 18 saat süreyle inkübe edildi ve tek koloni oluşturan birimler kaydedildi. İki tip numune, biyo-algılayıcı analiz için hazırlanmıştır. PBS içinde ve seyreltilmiş süt içinde süspansiyon haline getirilmiş bakteri hücreleri, QCM sensörlerinin kalibrasyonu için kullanıldı. Bakteri içeren PBS ve süt örneklerinin hazırlanması, deneyin her bir seti için benzerdir. *Salmonella* ve *E.coli* kùltürlerinin sabit bir hacmi ($1,0 \times 10^9$ CFU/mL), bakteriyel hücreleri ayırmak için, 15 dakika boyunca 4000 rpm'de santrifüje tabi tutuldu. Süpernatantın uzaklaştırılmasından sonra, elde edilen çökelti, PBS içinde veya seyreltilmiş süt içinde yeniden süspansiyon haline getirildi. Bakteriyel çözeltiler, farklı sayıda hücre içeren numunelerin hazırlanması için PBS ile (0,137 M NaCl ihtiva eden 10 mM, pH 7,4) seyreltilti. Her dilüsyonun 0,1 mL'si, Agar plakları üzerine yayılarak ekildi ve 18 saat, 37 °C'de gece boyunca inkübe edildi. Agar plakları üzerindeki, koloni oluşturan birimler (CFU), daha sonra CFU/mL olarak sayılmıştır. QCM aptamer-sensörü için *Salmonella* standart eğrisi çizilirken, her seyreltmedeki hücrelerin sayıları kullanıldı.

3.6.1. Bakteriyel hücrelerin manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA)-aptamer mikroküreleri kullanılarak ön-deriştirilmesi

Salmonella bakteri hücrelerinin toplanması için uygulan yöntem daha önceki bir çalışmamızda verilmiştir [6]. Farklı sayılarda bakteri hücreleri içeren PBS ve süt örnekleri hazırlandı. Aptamer immobilize edilmiş manyetik küreler yaklaşık 1,0 mg'lık, 1,0 mL bakteri içeren çözelti örneği üzerine ilave edildi ve bir vorteks kullanılarak karıştırıldı. Karışım bir inkübatöre yerleştirdi ve sürekli çalkalama yolu ile 25 °C'de 30 dakika süre boyunca inkübe edildi. Manyetik kürelere adsorplanan bakteri hücreleri, 2 kez, toplam 2,0 mL PBS ile yıkandıktan sonra, manyetik ayırma yolu ile ortamdan izole edildi. İzole edilen hücreler, 20 mM NaOH muamelesi ile kürelerden elüe edildi ve asetik asitle nötralize edildi. Bakteri hücreleri ihtiva eden son numuneler QCM analizine veya koloni sayımı için kùltür plaklamasına tabi tutuldu [27].

3.6.2. Instrümantasyon ve ölçüm

Salmonella bakterisine özgün aptamer immobilize edilmiş QCM çipi, gıda örneklerinde *Salmonella*'nın gerçek zamanlı tespiti için kullanıldı. Kuvars kristal mikroterazi sistemi (Modeli CHI 400A, CH Instruments, Teksas, ABD) bir akış yolu olan hücre, osilatör ve bir analizör içermektedir. Aptamer immobilize edilmiş QCM çipi, akış hücresi içerisine yerleştirildi, sonra osilatöre ve analizörle bağlantısı sağlandı. Akış hücresi, bir enjeksiyon pompasına (ISOLAB, Model: 540060-B, Almanya) bağlandı. Cihaz kişisel bilgisayar tarafından kontrol edildi ve Windows XP işletim sistemi altında çalıştırıldı. QCM'in kütle hassasiyeti, Bölüm 2.6'da Sauerbrey denklemi ile verilen, kristalin toplam kütledeki osilasyon frekansı değişimi göz önüne alınarak gerekli hesaplamalar yapıldı [101].

QCM'in frekans kayması (ΔF) ve *Salmonella* bakteri hücreleri yoğunluğu arasındaki doğrusal ilişki, verilen deneysel koşullar altında gözlemlendi. Aptamer immobilize edilmiş kuvars kristal, QCM akış hücresi içine yerleştirildi, kristalin sadece bir tarafı, hücre kuyusu içinde örnek çözeltisi ile temas ettirildi. PBS içindeki *Salmonella* bakteri hücreleri, bir enjektör pompası yardımıyla, belli bir akış hızında (50 mL/dak), QCM akış hücresi içinden geçirildi ve aptamer immobilize edilmiş QCM sensör kristali üzerinde *Salmonella* hücrelerinin adsorpsiyon yolu ile özgül olarak bağlandığı gözlemlendi. Rezonans frekansı, bir kuvars kristali frekans sayacı kullanılarak sürekli olarak kaydedildi. Veri, ana ekranda görüntülendi ve frekans sayacı ara yüzüne bağlanan bir bilgisayar tarafından doğrudan okundu. Bazal rezonans frekans değerleri, immobilize edilmiş *Salmonella* bağlayan aptameri ile, *Salmonella* hücrelerinin etkileşiminin öncesinde ve sonrasında kaydedilmiştir. Başlangıç (F_A) ve sonuç (F_B) kararlı frekans değerleri arasındaki frekans değişimi ($\Delta F = F_B - F_A$) olarak bildirildi ve biriken kütle miktarı, yukarıda açıklandığı gibi, Sauerbrey denkleminde (2.1 Eşitliği) göre, hesaplanmıştır. Bütün deneyler, 25°C'de gerçekleştirildi ve uygulanan yöntem, deneyin her bir seti için aynı koşullar altında gerçekleştirildi [27].

Özetle, *Salmonella* bağlayıcı aptamer immobilize edilmiş kuvars kristal hücresi, sıralı olarak, 20 mM NaOH çözeltisi, saf su ve PBS ile, bir şırınga pompası kullanılarak, 1,0 mL/dak akış hızı ile yıkandı. Sonra, *Salmonella*'yı özgün tanıyan aptamerler immobilize edilmiş QCM sensörünün yanıtı, kararlı bir frekans okuması elde edilene kadar izlendi. Bundan sonra, değişken yoğunluktaki *Salmonella* bakteri hücreleri (10^2 ve 10^5 CFU/mL), PBS (3,0 mL) içinde hazırlandı ve örnek hücre süspansiyonu, 50 mL/dak'lık akış hızındaki

bir şırınga pompası vasıtası ile QCM akış hücresi içine enjekte edildi, ve her numune için frekans kayması izlendi.

Bakteri hücrelerinin aptamer bağlı QCM çiplerinden desorpsiyonu, 1,0 mL/dak akış hızında, 20 mM NaOH çözeltisinin 4,0 mL'sinin uygulanması ile gerçekleştirildi. Desorpsiyon sonrasında, sensör hücresi, saflaştırılmış su ve PBS ile yıkandı. Aptamer taşıyan sensörün *Salmonella*'ya özgünlüğünü ve seçiliğini göstermek için, sensörün yanıtı, *E. coli* hücreleri kullanılarakda izlendi. Gerçek zamanlı veri, SigmaPlot 11 (Systat software Inc.) tarafından, negatif üssel düzeltme yoluyla araştıma için işlendi.

3.6.3. Denge izoterm parametrelerinin belirlenmesi

Aptamer bağlı QCM çipleri ile, *Salmonella* hücrelerinin tespitinde elde edilen deneysel verileri teorik olarak türetilen ve bölüm 2.7'de verilen Langmuir ve Freundlich izoterm modelleri ve 2.2 ve 2.2 Eşitlikleri kullanılarak denge izoterm model parametreleri belirlenmiştir. *Salmonella*'ya spesifik aptamer immobilize edilmiş QCM sensörü verileri, ileri ve geri bağlanma sabitleri, K_a (mL/CFU) ve K_d (CFU/mL) gibi, denge izoterm parametrelerinin belirlenmesi için analiz edilmiştir [27].



4. ARAŞTIRMA BULGULARI

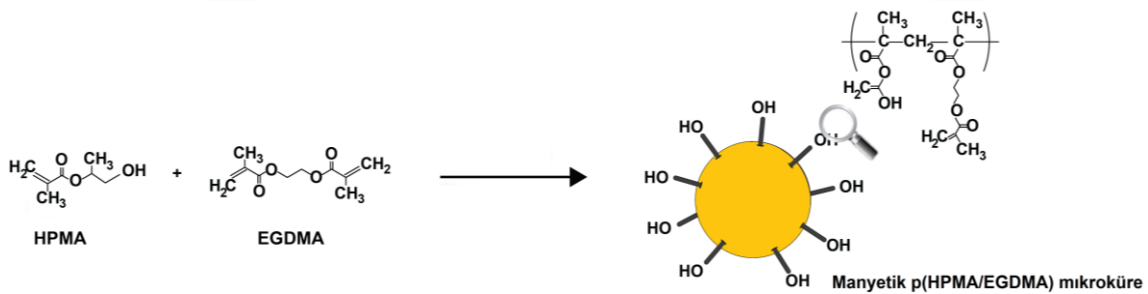
Manyetik taşıyıcılar, genellikle partikül formunda, çeşitli sentetik polimerlerden, biyopolimerlerden veya gözenekli camdan kompozit olarak ya da yüzeyi modifiye edilmiş magnetik gibi, inorganik magnetik materyallere dayanan magnetik partiküllerden hazırlanmaktadır [19, 26, 32, 51]. Magnetik partiküllerin boy boyut dağılımı <18 nm altında olduğunda, dış magnetik alana karşı süperparamagnetik gibi davranırlar ve magnetik alanın uzaklaştırılması sonucunda bu özelliklerinden dolayı hemen sistem içerisinde kolaylıkla yeniden suspansiye olmaları büyük avantaj sağlamaktadır. Ayrıca, manyetik alan yokluğunda kendi aralarında manyetik bir etkileşim olmamaktadır [34, 50].

Genellikle biyomateriyal ve biyoteknoloji uygulamalarında kullanılan magnetik destek materyalleri polimerizasyon işlemi sırasında ortama magnetik demiroksit partiküllerinin ilavesi ile hazırlanmaktadır. Ticari olarak temin edilebilen veya laboratuvar koşullarında hazırlanan magnetik destek materyaller iki temel yapıdan oluşmaktadır. Birinci yapı, Fe_3O_4 , MnFe_2O_4 ve CoFe_2O_4 gib inorganik magnetik nanopartiküllerin oluşturduğu magnetik merkezdir. Magnetik materyalleri oluşturan, ikinci yapı ise magnetik merkezi çevreleyen bir polimer tabakadır. Magnetik merkez materyale magnetik özellik kazandırırken fonksiyonel group içeren polimerik yapı daha çok saflaştırma ve immobilizasyon gibi amaçlara hizmet etmektedir [12]. Biyolojik sıvılardan hedeflenen analitin tanısında, ayrıştırılmasında ve saflaştırılması, doğal veya sentetik kökenli polimerler (polisakkaritler, poliakrilamitler, polivinil polimerler ve poliakrilatlar) destek materyalleri olarak kullanılmaktadır. Bunlar arasında, akrilat kökenli polimerler uzun ömürlü sentetik polimerlerdir. Bu nedenle, manyetik ayırma teknolojilerinde, manyetik özellik kazandırılmış akrilat temelli polimerlerin biyoteknolojik uygulamaları dikkat çekmektedir [13, 32].

Bu doğrultuda, tez çalışması kapsamında manyetik özellik kazandırılmış poli(hidroksipropimetakrilat/etilenglikoldimetakrilat), p(HPMA/EGDMA), mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı ve glisidilmetakrilat (GMA) polimer zincirleri manyetik mikrokürelerin yüzeyine aşılansak yüzeyde fonksiyonel gruplar oluşturuldu [25]. Elde edilen manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri kullanılarak hedef patojen bakteriye spesifik aptamer ligandının immobilizasyonunda ve gerçek numune uygulamalarında ön zenginleştirme işleminde kullanıldı.

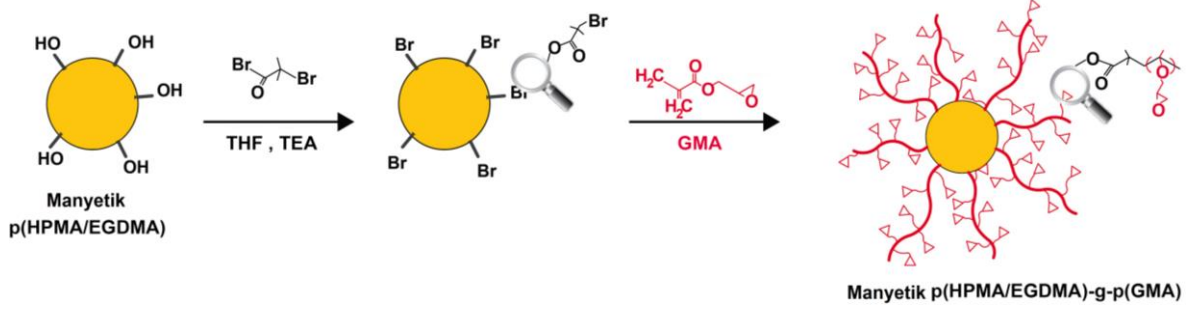
4.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelere hazırlanması ve karakterizasyonu

Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi. Hazırlanan mikrokürelere manyetik özellik kazandırmak iki basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Fe(III) içeren p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere, Fe(III) iyonları varlığında süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile HPMA ve EGDMA monomerlerinden hazırlandı. İkinci basamakta ise p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere yapısında demir oksit kristali oluşumu için Fe(II) iyonları içeren $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonu ile kürelere manyetik özellik kazandırıldı (Şekil 4.1).



Şekil 4.1. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere sentezinin şematik gösterimi

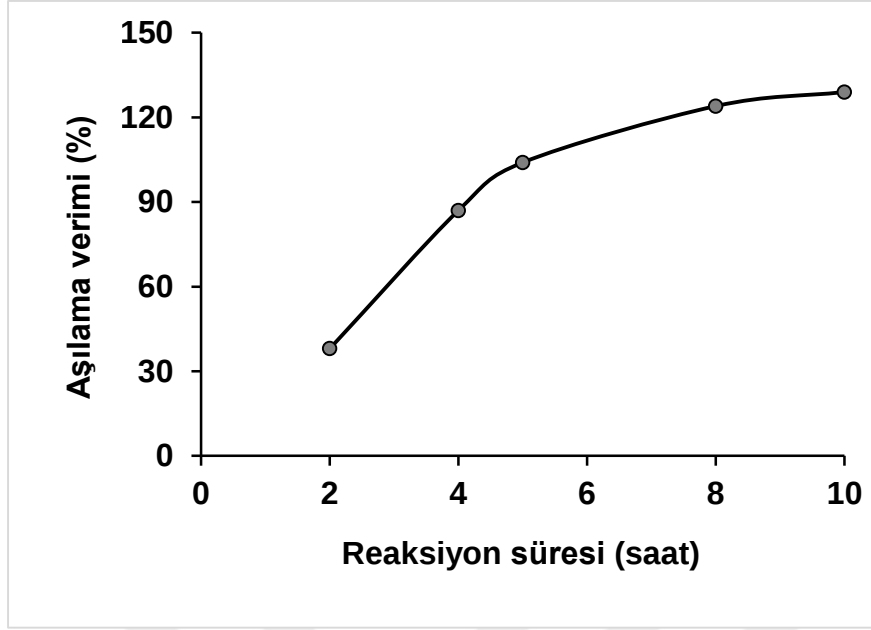
Daha sonra hazırlanan bu manyetik kürelere ATRP yöntemi ile yüzeyde tarak tipi GMA zincirleri ilave edildi. GMA'nın yapısında bulunan fonksiyonel epoksi grubu, biyolojik moleküllerin amin, tiyol ve hidroksil grupları ile reaksiyona girerek hedef molekülün yüzeye kovalent olarak tek basamakta bağlanmasını sağlar. Ayrıca, çeşitli aktivasyon işlemlerine olanak tanır, depolama esnasında ve çözelti ortamında kararlıdır ve farklı fonksiyonel gruplar taşıyan moleküller ile (amino, tiyol, hidroksil gibi) kararlı O-C ve N-C kovalent bağları oluştururlar. Glisidil metakrilat içeren polimerik yapılar yüksek mekanik kararlılığa sahip olmaları nedeni ile geniş pH aralığında biyomedikal ve biyoteknoloji alanındaki çeşitli uygulamalarda etkili ve güvenli olarak kullanılmaktadır [16, 37, 54]. Bu nedenlerden dolayı tez çalışmasında, fonksiyonel epoksi grubu içeren glisidil metakrilat (GMA), manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere aptamer ligandının kovalent olarak bağlanabilmesi için aşılama monomeri olarak kullanıldı. Yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu (SI-ATRP) yöntemi ile, p(GMA) zincirlerinin manyetik p(HPMA/EGDMA) kürelere aşılmasını içeren yüzey modifikasyonu işlemi Şekil 4.2'de gösterildi.



Şekil 4.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin sentezinin şematik gösterimi

Sentezlenen manyetik p(HPMA/EGDMA) küreleri yüzeyinde p(GMA) fırçaları elde etmek için, 2-bromo-2-metilpropiyonil bromid (BMP) ile modifiye edildi ve brom içeriği gram manyetik mikroküre başına 0,28 mmol brom olarak belirlendi.

Glisidil metakrilat monomeri Br-uçlu fonksiyonel manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin yüzeyine SI-ATRP yöntemi ile aşılandı ve yüzeyde p(GMA) fırçaları oluşturuldu. SI-ATRP reaksiyon zamanı 10 saat sürdürüldü ve yüzde aşılama verimi yaklaşık %129 olarak bulundu. Kütle artışı monomerlerin polimerize olan fraksiyonunu gösterdiğinden, bu sonucun aşılama reaksiyonlarının verimi olarak rapor edildi (Şekil 4.3). Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri üzerindeki erişilebilir epoksi gruplarının miktarı, HCl-piridin metoduyla belirlendi ve 3,89 mmol/g olarak belirlendi. Ağırlık kazanımı (%129) manyetik mikrokürelerin 10 saat aşılama reaksiyonundan sonra elde edildi. Bu, manyetik mikrokürelerin gramı başına (aşılı p(GMA) miktarı, gram manyetik mikroküre başına 1,29 g'dır ve GMA'nın molar kütlesi 142 g/mol'dür) $[(1,29/142)/(1+1,29)](10^3) = 3,97$ mmol GMA aşılandığını göstermektedir. Aşılanan polimer kütlesi, başlangıç brom içeriğine (0,26 mmol/g) bölününerek, başlama bölgesi başına, polimerizasyonun ortalama derecesi 12 birim ($3,97 / 0,26 = 15,3$ birim) olarak bulundu. Böylece, başlama bölgesi başına ortalama 15 GMA tekrarlayan birimi olduğu hesaplandı.



Şekil 4.3. Br-uçlu fonksiyonel manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin yüzeyine p(GMA) aşılama veriminin reaksiyon süresine göre değişimi

Vakum etüvünde kurutulan manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) destek materyalinin boy ve boyut dağılımı belirlendi. 53-300 μm arasında dağılım gösterdi ve polimerizasyon verimi % 87 olarak hesaplandı. 75-150 μm boy ve boyut dağılımına sahip bölüntü DNA aptamer ligandının immobilizasyonu çalışmalarında kullanıldı.

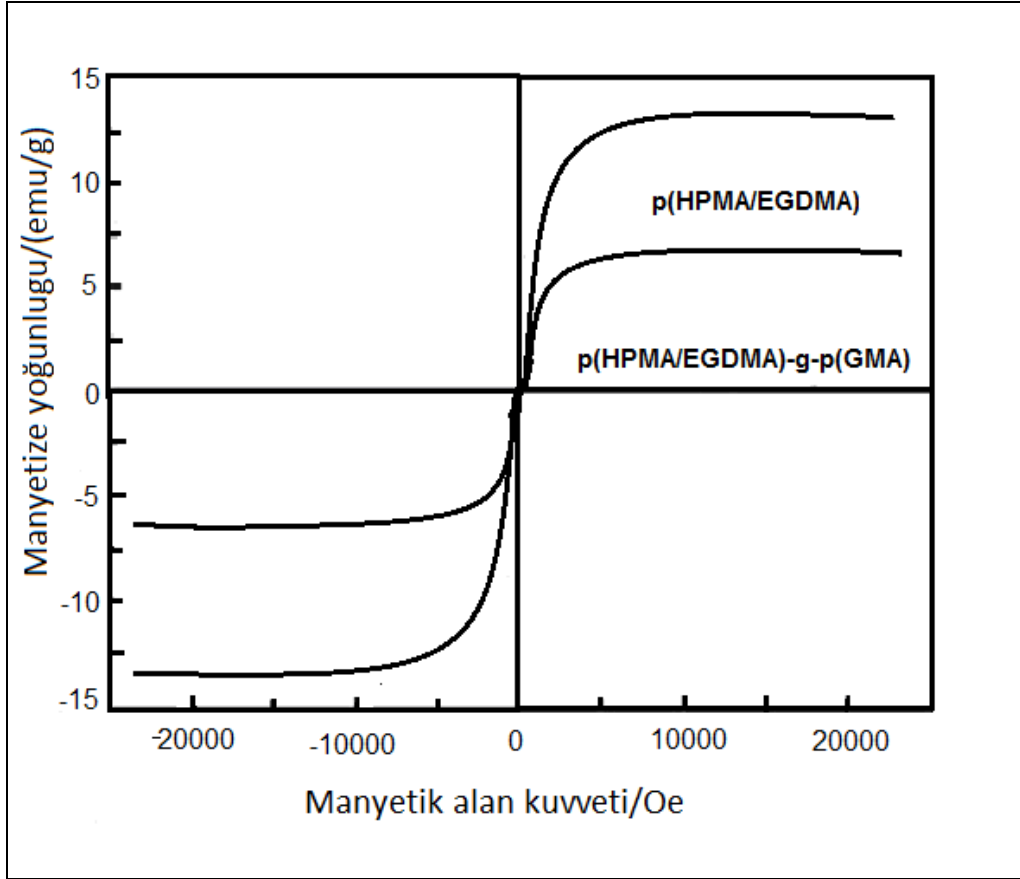
Biyoteknoloji uygulamalarında, hedef analite yüksek afinite göstermesi beklenen polimerik malzemenin biyolojik sistemlerinde kullanımı düşünüldüğünde su içeriği, oldukça önem kazanmaktadır [14]. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin şişme oranı sırası ile 27,8 ve 21,3 olarak bulundu. Bu değer biyolojik uygulamalar için yüzey ıslanabilirliği göz önüne alındığında uygun sınırlar arasında bulunmaktadır. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin, glisidil metakrilat monomerinin aşılansak modifiye edildiğinde, fırça tipi polimer zincirleri içeren aşılı mikrokürelerin su içeriğinin azaldığı görüldü. p(GMA)'nın polaritesinin düşük olduğu ve herhangi bir sabit yüke sahip olmadığı göz önünde bulundurulduğunda bu sonucun tutarlı olduğu görülmektedir. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yoğunluğu sırası ile 1,27 ve 1,09 g/cm^3 olarak belirlendi.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin içinde çökeltilmiş demir oksit kristallerinin miktarı, gram mikroküre başına sırasıyla 173 ve 79 mg

olarak bulundu. Manyetik polimerin yapısının kararlılığı, ortam pH'sı 0,5 M HCl ve NaOH kullanılarak 1,0-12,0 aralığında ayarlanan saf su içerisinde 48 saat inkübe edilmesiyle çalışıldı. İnkübasyondan sonra, manyetik küreler kurutuldu ve Fe_2O_3 içeriği gravimetrik olarak belirlendi. Fe_2O_3 içeriğinde ve manyetizasyonunda, çalışılan geniş pH aralığında (pH 1.0 ve 12.0 arasında) kayıt edilecek değişiklik göstermedi.

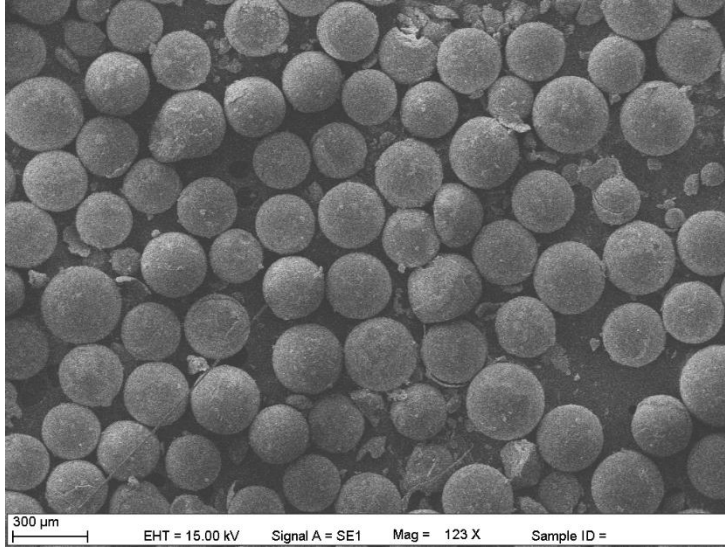
Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin spesifik yüzey alanları, BET ölçümleri ile sırası ile 9,3 ve 7,1 m^2/g olarak belirlendi. p(GMA) ile mikrokürelerin aşılmasından sonra spesifik yüzey alanında görülen azalma, aşılama sonucunda manyetik kürelerin gözenekliliğinde belirli bir azalmayı neden olduğunu düşündürdü.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin, manyetik davranışları, VSM ile değerlendirildi (Şekil 4.4). Spesifik doygunluk manyetizasyonu (σ_s), manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreler için 13,9 emu/g ve manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri için 6,7 emu/g olarak belirlendi. Bu sonuç, manyetik mikrokürelerin, kalıcı bir mıknatıs ile birkaç saniye içinde sucul ortamlardan kolayca ayrılabilceğini gösterdi. Fe_3O_4 nanopartiküllerinin p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin içyapısında oluşumu, gravimetrik analiz ile de teyit edildi ve mikrokürelerin içinde tutuklanmış demir oksit kristalinin miktarı, gram mikroküre başına 169 mg olarak bulundu. p(GMA) ile aşılama sonrası kürelerin doygunluk manyetizasyonundaki azalma, p(GMA) polimer katmanının diamanyetik katkısından dolayı, birim ağırlık başına manyetik momentlerin miktarındaki azalma ile açıklanabileceğini düşündürdü.



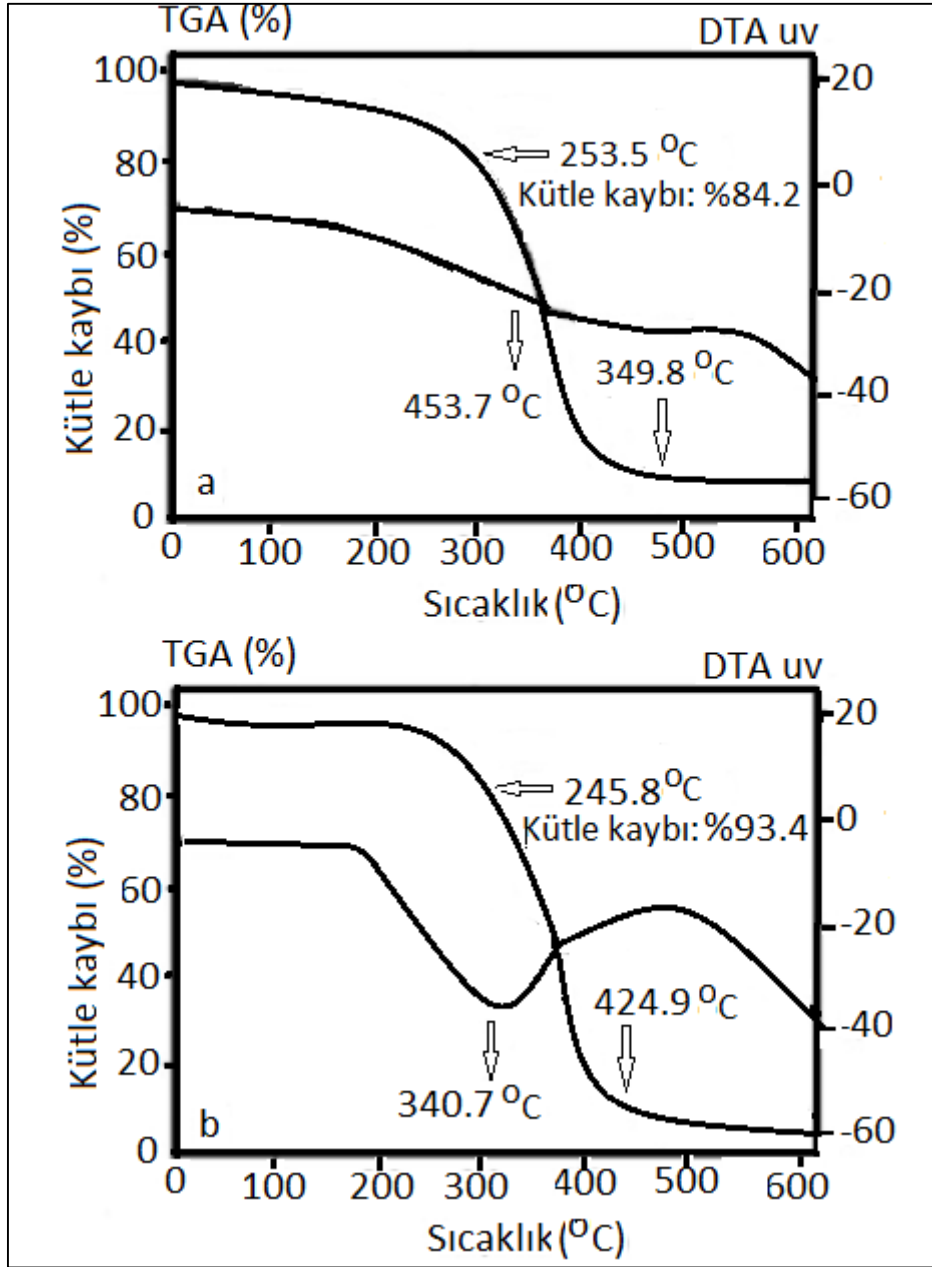
Şekil 4.4. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin VSM eğrileri

Sentezlenen manyetik özellik kazandırılmış p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin SEM mikrografında küresel bir yapıya ve polimerizasyon işlemi süresince oluşan gözeneklerden dolayıda pürüzlü bir yüzeye sahip olduğunu gösterdi (Şekil 4.5). Mikrokürelerin gözenekli yüzey yapısı, geniş bir yüzey alanı sağladığından yüksek ligand immobilizasyonu ve yüksek miktarda hedef analite bağlanma kapasitesine erişilmesini sağlayacağı düşünüldü.



Şekil 4.5. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin SEM mikrografı

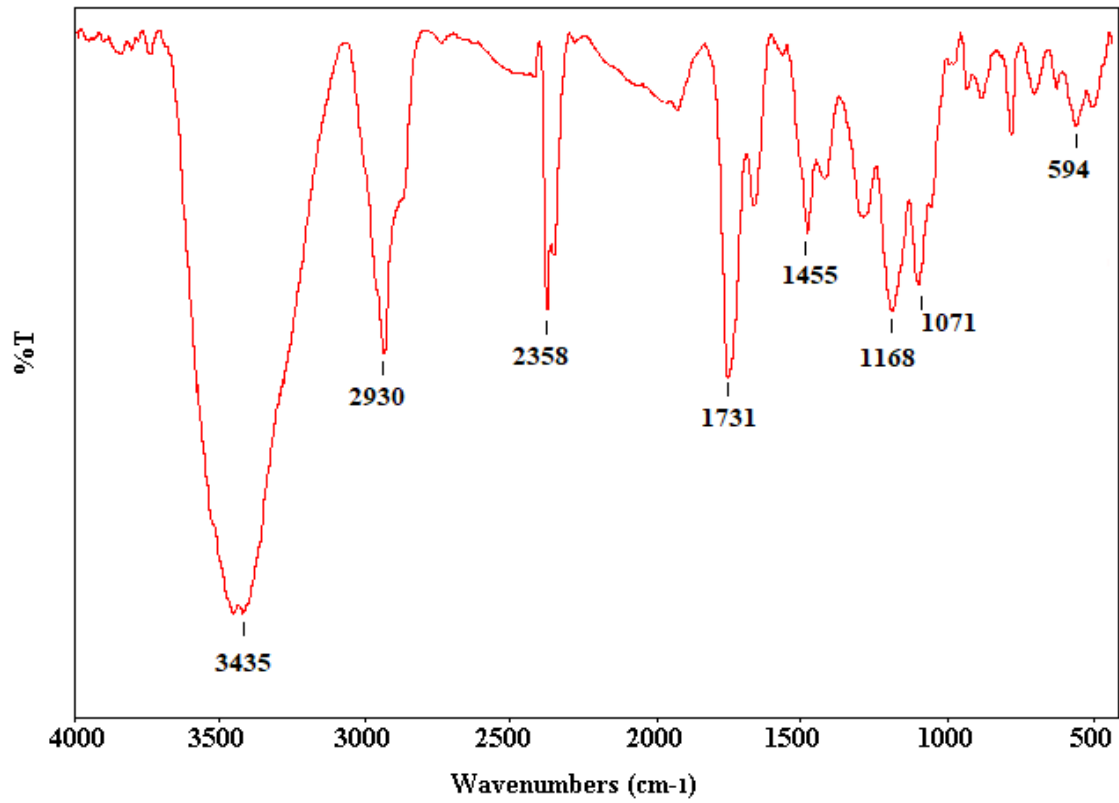
Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin ısısal kararlılığı, termal gravimetrik analiz (TGA) kullanılarak belirlendi. Şekil 4.6 (A) manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin ve Şekil 4.6 (B) ise manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin DTA/TGA eğrisini göstermektedir. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin başlangıç ağırlık kaybı, örneklerdeki az miktardaki nemin varlığından kaynaklandığını düşünüldü. Başlangıçtaki ağırlık kaybı, sıcaklık artışıyla birlikte, keskin ve sürekli bir ağırlık kaybını izledi. TGA eğrisinden de görüldüğü üzere, Fe_3O_4 kristalleri içeren manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri, manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinden daha küçük bir eğim ve yüksek bir ısısal kararlılık gösterdi (Şekil 4.6). Degradasyon tamamlandıktan sonra, p(GMA) aşılınmış manyetik mikroküreler için kalan kalıntı, aşılınmamış manyetik mikrokürelerinkinden daha az olduğu görülmüştür. Bu, p(GMA)-aşılı manyetik mikrokürelerin kompozisyonunun daha çok organik bileşen içerdiği için, p(GMA)'nın gösterdiği katman etkisinden kaynaklandığı görüldü. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerindeki çökeltmiş demir oksit kristalinin miktarı sırasıyla 173 ve 79 mg/g olarak belirlendi.



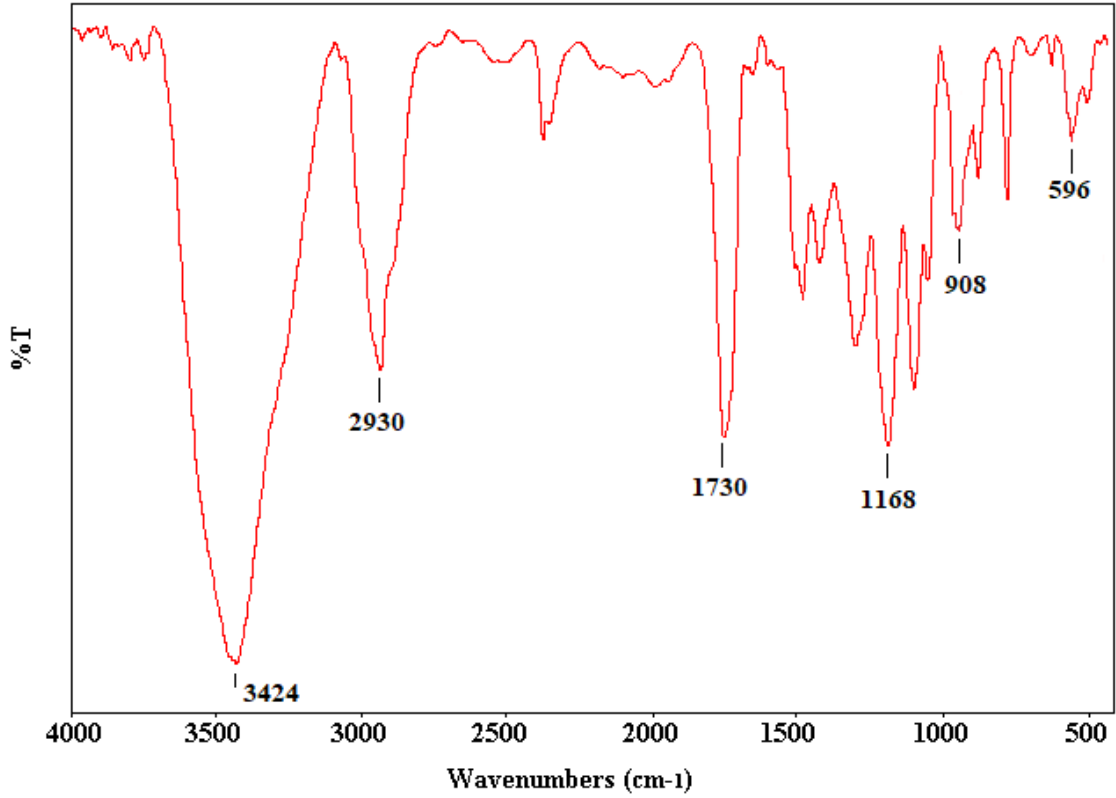
Şekil 4.6. Manyetik p(HPMA/EGDMA) (a) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) (b) mikrokürelerinin DSC ve TGA eğrileri

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumları, Şekil 4.7 ve 4.8’de sunuldu. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu, 3435 cm^{-1} ’de alkolün hidrojen bağının karakteristik gerinim titreşimine sahiptir (Şekil 4.7). 2930 cm^{-1} ’de metilen titreşimi hidroksipropil metakrilat ve aşıl原因an glisidil metakrilatın her ikisinin karakteristik titreşimleri arasında yer alır (Şekil 4.7 ve 4.8). 1730 cm^{-1} ’deki titreşim her iki monomerin ester konfigürasyonunu göstermektedir. p(GMA) aşıl原因an manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumunda 908 cm^{-1} ’de gözlemlenen pik epoksi halkasına ait titreşim bandıdır. Bu sonuç, p(GMA) zincirlerinin

manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküre yüzeyine aşılandığını gösterdi. Fe_3O_4 , 600 cm^{-1} 'de karakteristik banda sahiptir ve Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de 594 ve 596 cm^{-1} 'de görülen bu pikler sırası ile, manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yapısı içinde Fe_3O_4 moleküllerinin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir. Sonuç olarak, FTIR spektral analizi, p(GMA) zincirlerinin manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerine aşılandığını ve manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin içindeki Fe_3O_4 varlığını onaylamıştır.



Şekil 4.7. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu



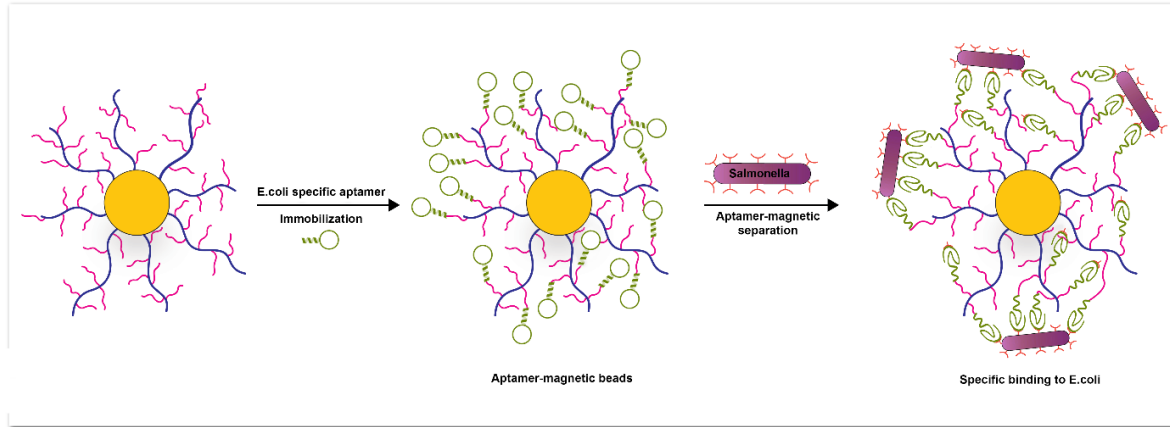
Şekil 4.8. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumu

4.2. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine *Salmonella* bakterisi için spesifik aptamer ligandının immobilizasyonu

Polimer yüzey modifikasyonundan sonra potansiyel olarak, çeşitli biyomoleküllerin immobilizasyonunda ve bunun sonucunda da spesifik etkileşim için istenen afinite özelliklerini ortaya çıkaran materyalleri hazırlamak için kullanılmaktadır. Bu yöndeki yüzey modifikasyon işlemleri genel olarak, hedef biyomoleküller için spesifik ya da pseudospesifik bir ligandla yüzeyi zenginleştirmeyi içermektedir. Modifiye edilen polimerler, polimer yüzeyi ile bütün hücre, organel, enzim ve nükleik asitlerin etkileşimini içeren biyoteknolojik alanlarda kullanılmaktadır [37, 54, 95]. Biyolojik moleküllerin immobilizasyonu için kovalent veya non-kovalent metodlar kllanılmaktadır. Kovalent bağlanma metodları, moleküllerin yüzeye kararlı bağlanmasını sağlamasının yanında, oldukça geniş aralıktaki biyolojik moleküllere uygulanabilirliği ve tekrar kullanımın yüksek olmasında sağlar.

Saçaklı p(GMA) polimeri aşılannmış manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri, aptamer, protein, nükleik asit, lipid ve şekerler de dahil olmak üzere çeşitli ligandların üzerinde bulunan hidroksil, amino veya tiyol grupları üzerinden kovalent olarak bağlanma yoluyla,

uygun immobilizasyonuna olanak sağlar. Manyetik mikrokürelerin üzerindeki saçaklı yapı çok tabakalı ligand bağlanmasına olanak sağlayarak polimerik materyale ligandın bağlanma kapasitesini artırır [5, 27]. Tez çalışmasında, p(GMA) aşılana manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel epoksi grupları ile aptamer ligandının amin grubu arasındaki reaksiyon sonucunda, mikroküre yüzeyine hedef patojen *Salmonella*ya spesifik aptamer ligandı kovalent olarak immobilize edildi (Şekil 4.9). Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine aptamer immobilizasyonu prosedürünü takiben, her mikrokürenin yüzeyinde immobilize olan 6930 *Salmonella*-aptamer molekülü olduğunu hesaplandı. Aptamer ligandı bağlı manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri sulu ortamdan hedef hücrelerin yakalanması için kullanılmıştır (Şekil 4.9).

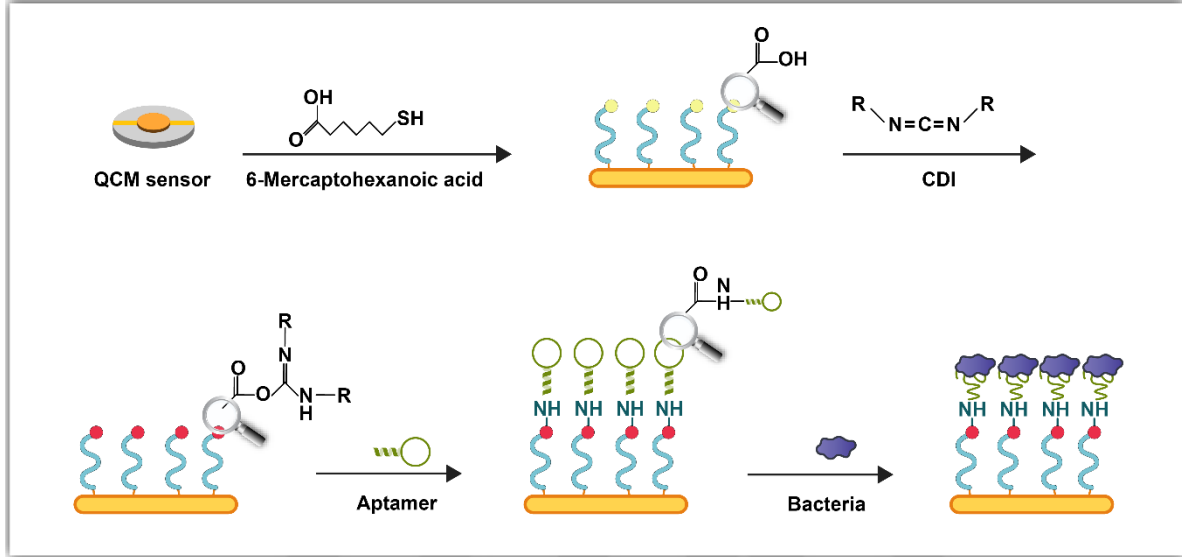


Şekil 4.9. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandın bağlanması işleminin şematik gösterimi

4.3. *Salmonella* bakterisi için spesifik QCM çiplerinin hazırlanması

6-merkaptohexanoik asit QCM çipi üzerinde tek tabaka oluşumu için kullanıldı ve pH 4,0'de suda çözünabilir karbodiimid ile aktive edildi. Bu yolla, reaktif imid grupları, aptamer ligandının immobilizasyonu için, kristal yüzeyinde oluşturulmuş oldu (Şekil 4.10). Aminle modifiye edilmiş aptamer dizilerinin kovalent bağlanması, sensör kristalinin imin grupları ve *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandının amino grupları arasında gerçekleştirildi (Şekil 4.10). Bu amaçla, *Salmonella*'ya özgül aptamerin immobilizasyonu süresi sonunda (18 saat süresince inkübasyonu sonucunda), frekansın 21 Hz azalması ile sonuçlandı. Bu azalma, aptamer moleküllerinin 28,14 ng/cm²'lik yüzey kaplamasına karşılık geldiği yukarıda verilen formülle hesaplandı. QCM, elektriksel uyarımda, piezoelektrik kuvars kristal'deki

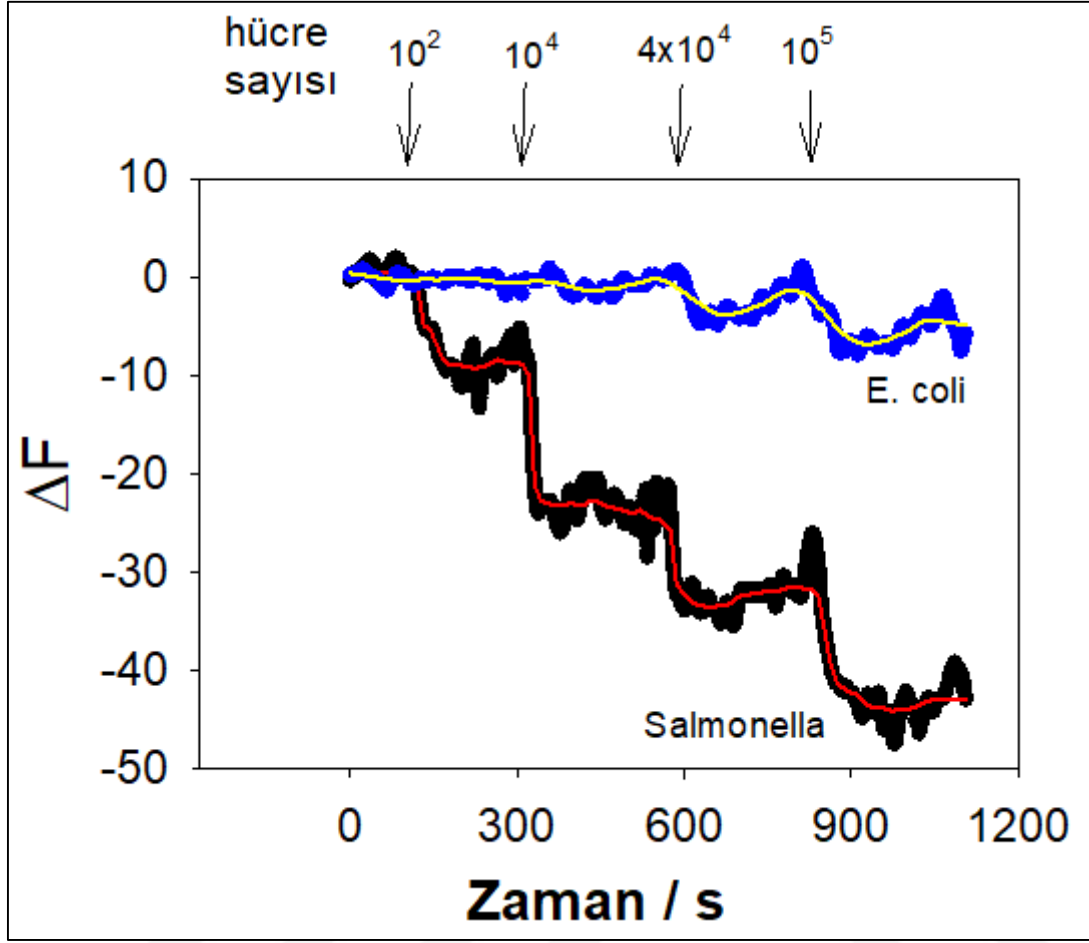
değişimleri ölçen, bir yığın akustik dalga ölçümü metodudur ve bu frekans değişiklikleri, Saubery eşitliğinde verildiği gibi sensörün yüzeyindeki kütleyle doğrusal orantılıdır [2, 27]. Yüzeye aptamer immobilizasyonundan sonra, sensör çipi, bağlanma deneyleri için bir sürekli akış hücresine ile irtibatlandırıldı.



Şekil 4.10. QCM kristalinin yüzeyinin fonksiyonlandırılmasının şematik gösterimi

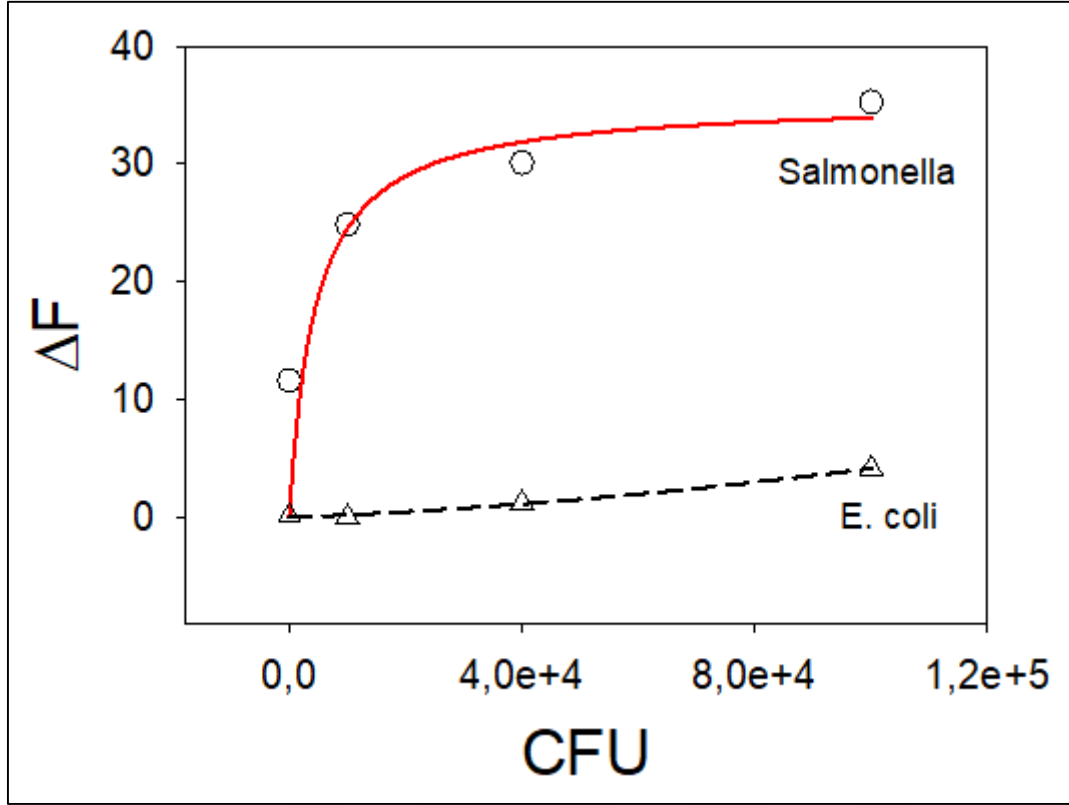
4.4. Denge izotermeleri parametreleri

Salmonella'ya spesifik aptamer ligandı QCM sensör sistemine bakteri hücrelerinin bağlanma eğilimi çalışıldı. Farklı konsantrasyonlarda hücreler, yaklaşık 5 dakika boyunca, sistemden sürekli olarak geçişi sağlanan PBS tamponuna ilave edildi (Şekil 4.11). Spesifik olarak bağlanmayan hücreler, sistemden tekrar 5 dakika süresince, PBS'nin akışına izin verilerek uzaklaştırıldı. *Salmonella* hücrelerinin eklenmesi, frekans değerlerinde azalma ile sonuçlandı.



Şekil 4.11. Salmonella bakterisine karşı QCM de frekans değişimi (CFU/ml)

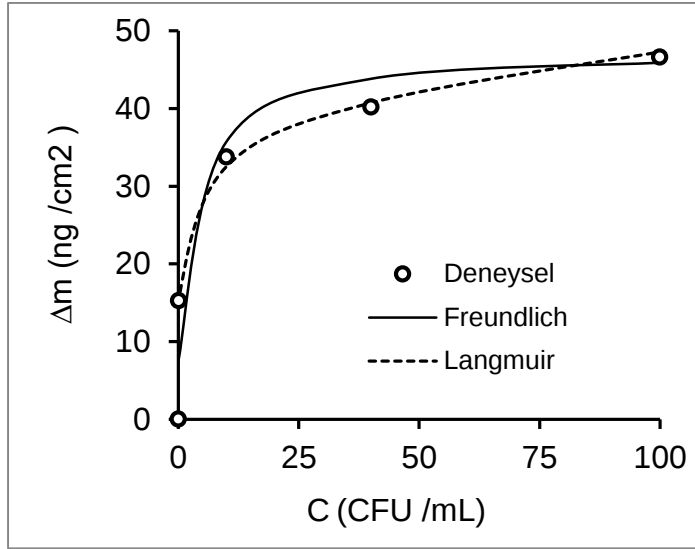
Frekans değişiklikleri, bir bağlanma eğrisi elde etmek için Salmonella bakteri hücre sayılarına karşı çizildi (Şekil 4.12). Hücrelerin sayısının artırılması ile, frekans -32 Hz'lik bir doygunluk seviyesine kadar azaldığı gözlemlendi. Aptamer immobilize QCM çipleri, daha sonra *Salmonella* bakterilerinin tespiti için kullanıldı.



Şekil 4.12. *Salmonella*'ya yanıt olarak frekans değişiklikleri (CFU/mL): Değişen *Salmonella* hücre sayılarına karşı aptamer ligandı bağlı QCM çip yüzeyi için belirlenen frekans değişimi

Salmonella'ya özgül aptamer immobilize edilmiş kuvars kristal QCM çipleri kullanılarak elde edilen veriler, ileri ve geri bağlanma sabitleri, K_a (mL/CFU) ve K_d (CFU/mL) gibi, denge izoterm parametrelerinin belirlenmesi için analiz edildi. Bu amaç için, Bölüm 2.7'de verilen iki farklı denge izoterm modeli, Langmuir ve Freundlich, aptamer immobilize edilmiş kristal yüzeylerine *Salmonella* adsorpsiyonu için uygulandı.

Langmuir modeli, eş enerjili ve yan etkileşimleri olmayan homojen arayüzey etkileşimlerini tanımlamak için kullanılmaktadır. Freundlich modeli ise heterojen yüzeylere daha uygundur. Langmuir modelleri için elde edilen yüksek korelasyon katsayıları (R^2 0,9998'den yüksek) ve ilgili semi-resiprokal eğriler, *Salmonella*'ya özgül aptamer bağlı QCM çipleri için, doğrusal değişimlerle sonuçlanmıştır. Bu doğrunun eğiminden, maksimum kapasite (Δm_{max}), 47,4 (ng/cm²) olarak bulunmuştur. Teorik olarak hesaplanan bu Δm_{max} değeri, deneysel değere (46,6 ng/cm²) çok yakın bulunmuştur ($m_{deneysel}$). Bu sonuçlar, *Salmonella* hücrelerinin, *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandına bağlanması işleminin, Langmuir modeli ile tarif edilebileceğini göstermiştir (Şekil 4.13).



Şekil 4.13. Aptamer ligandı bağlı QCM çip yüzeyi ve salmonella hücreleri arasındaki bağlanma için elde edilen deneysel, Langmuir ve Freundlich izoterm eğrisi

Denge bağlanma eğrisinden afinite sabiti (K_d), 3259 CFU/mL olarak belirlendi. Denge izoterm parametresi K_a , $3,07 \times 10^{-4}$ ml/CFU olarak hesaplandı. Freundlich modelinden elde edilen denge bağlanma, (0,998'in üzerinde R^2) sulu bir ortamdan *Salmonella* hücrelerinin, aptamer immobilize edilmiş QCM sensörleri üzerine, yüksek bir adsorpsiyon kapasitesiyle kolayca bağlandığını göstermiştir (Şekil 4.13). Deneysel olarak test edilen *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandı bağlı QCM çipi için belirlenen n değerlerinin büyüklüğü (6,16), sulu çözeltiden *Salmonella* hücrelerinin yüzeye spesifik adsorpsiyon işlemi için yeterince yüksek olduğunu gösterdi (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandı bağlı QCM kristali için belirlenen izoterm model sabitleri ve korelasyon katsayıları

Deneysel	Langmuir			Freundlich		
$\Delta m_{\max, \text{deneysel}}$ (ng/cm ²)	$\Delta m_{\max}$ (ng/cm ²)	K_d (CFU /mL)	R^2	K_F	n	R^2
46,6	47,4	3259	0,998	7,30	6,16	0,992

4.5. *Salmonella* bakterilerinin sulu ortamlardan manyetik olarak spesifik yakalanması

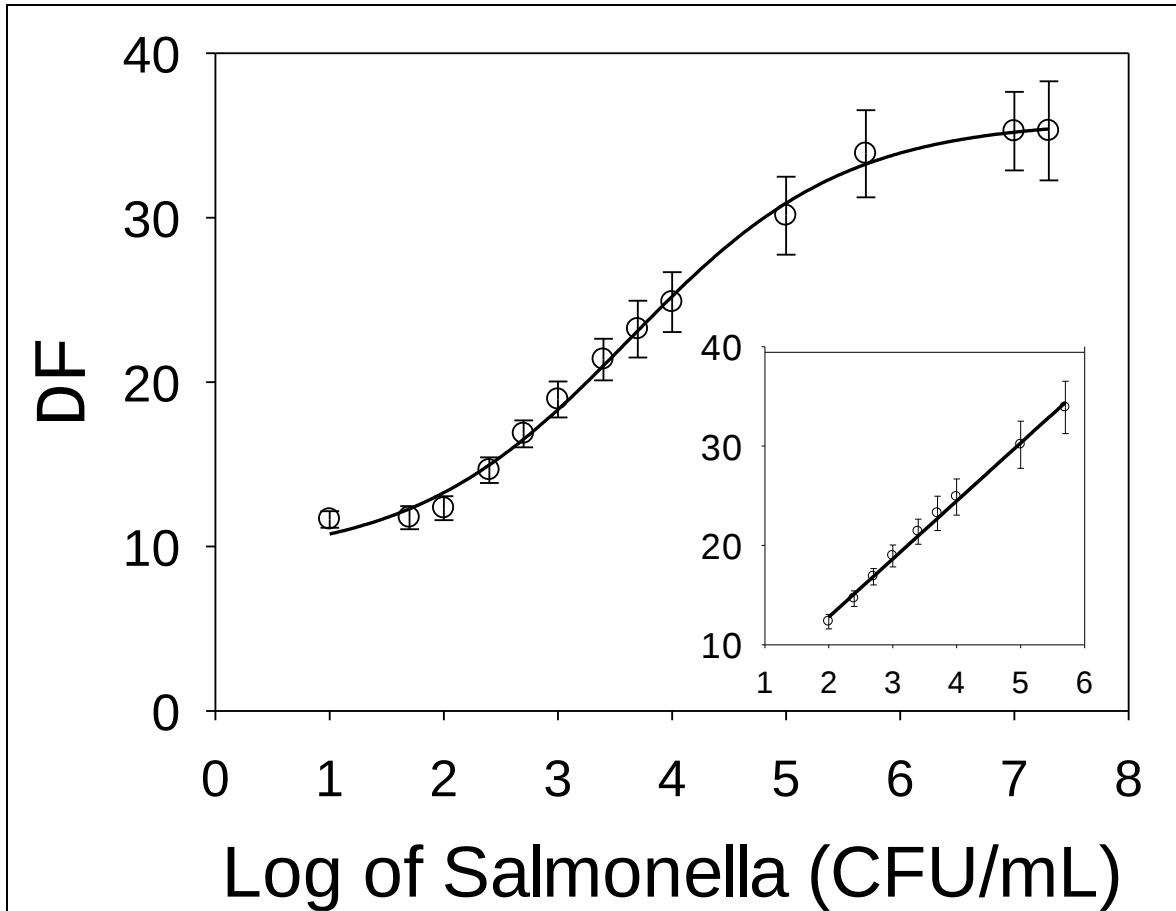
Fonksiyonel epoksi grubu taşıyan manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerine, *Salmonella*'ya spesifik aptamer ligandı doğrudan immobilize edildi ve sulu

ortamdan hedef patojen hücrelerin yakalanması için kullanıldı (Şekil 4.9). Dışarıdan uygulanan basit bir manyetik malzeme ile, aptamer ligandı immobilize edilmiş manyetik mikroküreler sulu ortamlardan *Salmonella* bakterilerini kolaylıkla ayırıştırılmasını sağladı. Literatürde, benzer çekirdek-kabuk tipi manyetik küreler, süt örneklerinden *Salmonella* bakterilerin manyetik ayırma yolu ile ayırılarak gerçek zamanlı PCR yolu ile birlikte tayin edildiği bildirilmiştir [6]. Aptamer ligandının kullanıldığı manyetik ayırma işlemleri, çözelti ortamında özellikle yüksek konsantrasyonlarda biyolojik malzemeler mevcut olduğunda, gelişmiş bir platform sağlayarak bakteri tespitinde önemli gelişmeler sağlanmasına neden olduğu rapor edilmiştir. Literatürde antikor veya aptamer ile (biyo-algılama molekülü olarak) işlevselleştirilen manyetik kürelerin kompleks örneklerdeki *Salmonella* bakterilerin tamamının yakalanmasının mümkün olduğunu da göstermiştir [6,7]. Bu nedenle tez çalışmada, QCM analizi ile bakteriyel hücrelerin gerçek zamanlı olarak saptanması için, sentezlenen manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri ön-zenginleştirme (veya ön-deriştirme) yöntemi olarak kullanılmıştır. Aptamer immobilize manyetik mikrokürelerden, yaklaşık 10^9 aptamer-manyetik küre alınarak, 10^5 CFU/ml bakteriyel hücreye 15 dakika inkübe edildi. Bakteriyel hücrelere maruz bırakılan kürelerin mikroskopi görüntüsü, aptamer ligandı bağlı mikrokürelerin, *Salmonella* 'ya spesifik olarak bağlandığını gösterdi.

4.6. QCM Sensörünün Sütte *Salmonella*'nın Tayininde Kullanımı

Yüksek afinite ile *Salmonella* bakterilerine bağlanan spesifik aptamer sekansları, manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yüzeyi üzerine yukarıda verildiği gibi bağlandı ve süt örneklerinden *Salmonella* bakterilerin hızlı bir yolla izolasyonunda da kullanıldı. Bu çalışmada, gıda numunelerinde bulunan ve analiz için girişim yapan bileşikler, manyetik ön-deriştirme metodu izlenerek, başarılı bir şekilde uzaklaştırıldı. Ön deriştirme yönteminde, aptamer ligandı immobilize edilmiş manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri gıda numunesi ile etkileştirildiğinde, örnek içerisinde sadece hedef patojenler aptamer ligandı üzerine seçici olarak adsorplandığından karışımdaki diğer bileşenler bu yolla uzaklaştırılmış oldu. Gıda örneğindeki hedef bakteri, manyetik mikrokürelerden elüe edildi ve elüe edilen bakterilerin miktarı hazırlanan QCM sensör sistemi ile analiz edildi. Elde edilen verilerden gıda örneklerinden bu geliştirilen yöntemle hedef bakterilerin doğrudan tespitinin yapılabileceğini gösterdi.

Süt örneklerinden *Salmonella*'nın gerçek zamanlı belirlenmesi için, manyetik mikroküreler den elüe edilen bakteri hücreleri, aptamer temelli QCM sensörü ile temas ettirilerek gerçek zamanlı olarak miktarsal tayinleri yapıldı. Yukarıda da belirtildiği gibi gıda örneklerinde kompleks biyolojik bir çözelti olsa bile ve arka planda bakteriyel kontaminasyon varlığında, tez çalışmasında kullanılan yöntem ve hazırlanan QCM sensörü ile yüksek özgünlükte tayin edilmeleri sağlandı. Doğrudan bağlanma analiz deneyleri, canlı *Salmonella* için, tayin limitini belirlemek amacıyla gerçekleştirildi (Şekil 4.14).

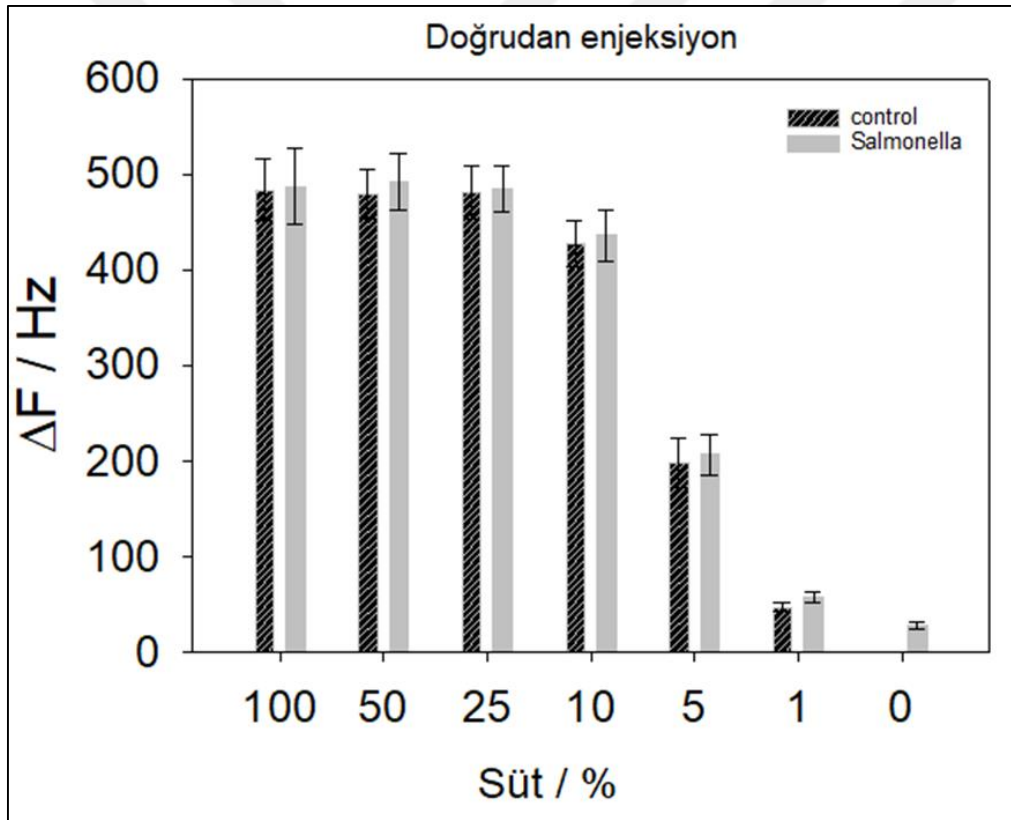


Şekil 4.14. *Salmonella*'ya yanıt olarak belirlenen frekans değişimi (CFU/ml).

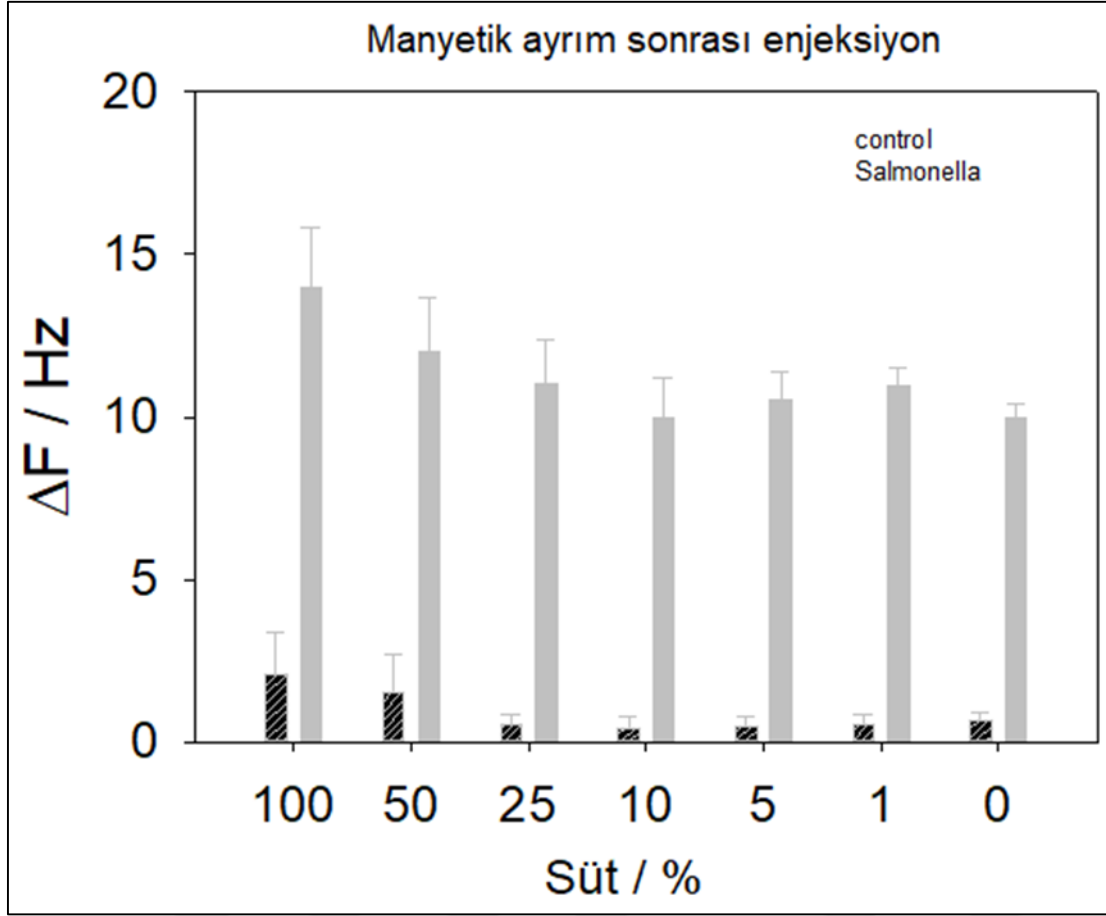
Canlı *Salmonella* hücrelerinin tayin sınırının belirlenmesi için yapılan bağlanma deneyleri, gerçekleştirildi. Farklı konsantrasyondaki hücreler, Şekil 4.12'de verilen doğrusal kısmı elde etmek için aptamer immobilize QCM sensor çipi ile inkübe edildi

Şekil 4.12'de verilen eğrinin doğrusal kısmını elde etmek için, çeşitli konsantrasyonlardaki hücreler, aptamer immobilize edilmiş sensör çipleri ile teması sağlandı. Süt örnekleri, %5 - 10 mertebelerinde seyreltilerek QCM ile analiz edildi [8]. Bu çalışmada amacımız, orijinal

örneklerin seyreltme işlemine gerek kalmadan, doğrudan sütte bakteri hücrelerini tespit etmektir. Yukarıda, sensör karakterizasyonu kısmında tarif edildiği gibi, yöntemler, *Salmonella* hücreleri eklenmiş süt örneklerinden de *Salmonella* nın belirlenmesi için kullanıldı. Şekil 4.15’de çeşitli seyreltmelerde süt örneklerinin enjeksiyonundan sonra belirlenen frekans değişiklikleri gösterilmektedir. Süt içeriği % 10’dan daha fazla olan bir seyreltme, 400 Hz’den fazla bir frekans değişimi ile sonuçlandı, bu değer, PBS’deki frekans değişikliklerinden, yaklaşık 10 kat daha yüksektir. Şekil 4.16, aptamer immobilize edilmiş manyetik mikrokürelerden, elüe edilen bakteriyel hücrelerin enjeksiyonuna karşılık olan, QCM sensörünün frekans değişikliğidir, elüent hücreleri, *Salmonella* veya *E. coli* içeren kontamine süt örneklerinden manyetik aşağı çekme yöntemiyle elde edilmiştir.



Şekil 4.15. Farklı konsantrasyonlarda süt örneklerinin frekans değişimleri (örneğin doğrudan enjeksiyonu)



Şekil 4.16. Farklı konsantrasyonlarda süt örneklerinin frekans değişimleri (manyetik küllerle ön saflaştırma işleminden sonra enjeksiyon) (Kontrol *E. coli* hücrelerini ifade etmektedir. Bakteri örnekleri 10^4 CFU/ml sabit konsantrasyonunda enjekte edildi)

Aptamer-sensörünün özgünlüğü, gıda örneklerindeki en sık görülen bakteriyel kontaminantlarında biri olan gram negatif (*E. coli*) bakterisi kullanılarak test edildi [35,36]. Kontrol olarak *E. coli* hücreleri, deneyde kullanılan *Salmonella* bakteri hücreleri ile yer değiştirilerek kullanıldı ve örnekler 10^4 CFU/ml'de kullanıldı. Sonuçlar, *Salmonella* tayininin, 10^4 CFU/ml aynı konsantrasyonda kullanılan diğer bakterilerden ayırt edilebileceğini gösterdi. Ayrıca, süt örnekleri, 10^4 CFU/ml sonuç konsantrasyonunu elde etmek için bakteri hücreleri ile karıştırıldı ve *Salmonella* hücrelerini elüe etmek için, manyetik ayırma yöntemi bu bölümde de kullanıldı. % 50 süt içeriğine kadar, numuneler, herhangi bir süt ilavesi olmayan numunelere benzer QCM yanıtını verdi. Direkt süt örneklerinde (% 100) biraz daha yüksek frekans değişimi ile sonuçlanmış olmasına rağmen, fark, ihmal edilebilir düzey gözlemlendi (% 100 sütte 28 Hz'e karşı PBS tamponunda 26 Hz) olarak belirlendi. Sensörün özgüllüğü, manyetik olarak muamele edilmiş, *E. coli* hücreleri ile karıştırılmış süt örneklerinin enjekte edilmesiyle çalışıldı (Şekil 4.16).

4.7. *Salmonella* hücreleri için QCM kristalinin rejenerasyonu ve tekrar kullanılabilirliği

Aptamer ligandı immobilize edilmiş QCM çipleri, *Salmonella* hücrelerinin tekrar bağlanması için kullanıldı. QCM sensör yüzeyine bağlanan *Salmonella* hücreleri, 20 mM NaOH solüsyonu işleme sokuldu, sensör yüzeyinden bakteriler bu yolla uzaklaştırıldı. Bu işlemin QCM sensörünün herhangi bir inaktivasyonuna sebep olmadığı, NaOH çözeltisinin uygun bir elüsyon ajanı olduğunu gösterdi. Bu rejenerasyon yönteminin aptamer ligandı bağlı QCM çipinin *Salmonella* hücrelerine karşı bağlama kapasitesinde belirgin bir kayba neden olmadığı, altıncı kez kullanım sonucunda yaklaşık olarak hücrelerin % 97'sinin yakalanabildiği belirlendi.



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında manyetik özellik kazandırılmış poli(hidroksipropimetakrilat/etilenglikoldimetakrilat), p(HPMA/EGDMA), mikroküreleri süspansiyon polimerizasyon yöntemi kullanılarak hazırlandı ve glisidilmetakrilat (GMA) polimer zincirleri manyetik mikrokürelere aşılanarak yüzeyde fonksiyonel gruplar oluşturuldu. Manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile sentezlendi. Hazırlanan mikrokürelere manyetik özellik kazandırmak iki basamakta gerçekleştirilmiştir. İlk olarak, Fe(III) içeren p(HPMA/EGDMA) mikroküreleri, Fe(III) iyonları varlığında süspansiyon polimerizasyonu yöntemi ile HPMA ve EGDMA monomerlerinden hazırlandı. İkinci basamakta ise p(HPMA/EGDMA) mikrokürelere demir oksit kristali oluşumu için Fe(II) iyonları içeren $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sulu çözeltisinde klasik termal çöktürme reaksiyonu ile kürelere manyetik özellik kazandırıldı.

Yüzeyde başlatılan atom transfer radikal polimerizasyonu (SI-ATRP) yöntemi ile, p(GMA) zincirlerinin manyetik p(HPMA/EGDMA) kürelere aşılandı. SI-ATRP reaksiyon zamanı 10 saat sürdürüldü ve yüzde aşılama verimi yaklaşık %129 olarak bulundu. Manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri üzerindeki erişilebilir epoksi gruplarının miktarı, HCl-piridin metoduyla belirlendi ve 3,89 mmol/g olarak belirlendi.

Vakum etüvünde kurutulan manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) destek materyalinin boy ve boyut dağılımı belirlendi. 53-300 μm arasında dağılım gösterdi ve polimerizasyon verimi % 87 olarak hesaplandı. 75-150 μm boy ve boyut dağılımına sahip bölüntü DNA aptamer ligandının immobilizasyonu çalışmalarında kullanıldı. Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelere şişme oranı sırası ile 27,8 ve 21,3 olarak bulundu.

Manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelere spesifik yüzey alanları, BET ölçümleri ile sırası ile 9,3 ve 7,1 m^2/g olarak belirlendi. p(GMA) ile mikrokürelere aşılanmasından sonra spesifik yüzey alanında görülen azalma, aşılama sonucunda manyetik kürelere gözenekliliğinde belirli bir azalmayı neden olduğunu düşündürdü.

Spesifik doygunluk manyetizasyonu (σ_s), manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküreler için 13,9 emu/g ve manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri için 6,7 emu/g olarak belirlendi. Bu sonuç, manyetik mikrokürelerin, kalıcı bir mıknatıs ile birkaç saniye içinde sucul ortamlardan kolayca ayrılabilceğini gösterdi.

p(GMA) aşıl原因 manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerinin FTIR spektrumunda 908 cm^{-1} 'de gözlemlenen pik epoksi halkasına ait titreşim bandıdır. Bu sonuç, p(GMA) zincirlerinin manyetik p(HPMA/EGDMA) mikroküre yüzeyine aşılandığını gösterdi. FTIR spektrumunda gözlemlenen 594 ve 596 cm^{-1} 'de görülen pikler sırası ile, manyetik p(HPMA/EGDMA) ve p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikrokürelerinin yapısı içinde Fe_3O_4 moleküllerinin başarılı bir şekilde oluştuğunu göstermektedir.

Tez çalışmasında, p(GMA) aşıl原因 manyetik p(HPMA/EGDMA) mikrokürelerin yüzeyinde bulunan fonksiyonel epoksi grupları ile aptamer ligandının amin grubu arasındaki reaksiyon sonucunda, mikroküre yüzeyine hedef patojen *Salmonella*ya spesifik aptamer ligandı kovalent olarak immobilize edildi. Mikrokürenin yüzeyinde immobilize olan 6930 *Salmonella*-aptamer molekülü olduğunu hesaplandı. Aptamer ligandı bağlı manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri sulu ortamdan hedef hücrelerin ön-zenginleştirme işlemi için kullanıldı.

QCM sensörleri çok yüksek derecede hassas kütle ölçüm cihazıdır, cihazın temel frekansı, QCM kristal yüzeyindeki nanogram seviyelerdeki kütle artışıyla, doğrusal olarak azalır. Bu çalışma, aptamer-manyetik ayırma ve QCM aptamer-sensör metodunun kombinasyonunun, gıda örneklerindeki kontaminantların hızlı ve hassas tayin için kullanılabilir olduğunu göstermiştir. Yukarıda verildiği gibi yeni bir QCM biyosensörü, gıda örneklerindeki *Salmonella* hücrelerinin tayini için geliştirildi. Bu amaçla, *Salmonella* bakterisine özgün aptamerler, modifiye altın kaplı QCM elektrodun yüzeyine kovalent olarak bağlandı ve başarılı bir şekilde, immobilize edildi. Sonuçlarımız açık bir şekilde, manyetik p(HPMA/EGDMA)-g-p(GMA) mikroküreleri üzerinde *Salmonella* spesifik aptamerlerinin immobilizasyonunun, ön deriştirme ve QCM sensörünün işletilmesi sonrasında yüksek yeniden kullanılabilirliğe sahip olduğunu gösterdi. QCM aptamer sensörü, optimize koşullar altında, hızlı yanıt (10 dakikadan az), hedef bakteri için geniş doğrusal aralık ve yüksek hassasiyet gösterdi. Deneysel sonuçlar, 100 hücrelik tayin sınırı ile, istenen seçiciliği ve 100 ila 4×10^4 CFU/ml hücreye kadar, doğrusal bir yanıt aralığını gösterdi, bu nedenle, bu

gelişilen manyetik ön zenginleştirme ve aptamer QCM yönteminin birlikte kullanımı Salmonella tayini için potansiyel bir uygulama olduğunu gösterdi.





KAYNAKLAR

1. Larsen, M. H., Dalmasso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretro, T., Možina, S.S., Rychli, K., Wagner, M., Wallace, R.J. Zentek, J. and Jordan, K. (2014). Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44, 92-109.
2. Junillon, T., Mosticon, D., Mallen, B., Baril, F., Morand, L., Michel, D. and Flandrois, J. P. (2014). Optimization of the reactional medium and a food impact study for a colorimetric in situ *Salmonella* spp. detection method. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 48-52.
3. Park, S.H., Aydin, M., Khatiwara, A., Dolan, M.C., Gilmore, D.F., Bouldin, J.L., Ahn, S. and Ricke, S.C. (2014). Current and emerging technologies for rapid detection and characterization of *Salmonella* in poultry and poultry products. *Food Microbiology*, 38, 250-262.
4. Dwivedi, H.P., Smiley, R.D. and Jaykus, L.A. (2013). Selection of DNA aptamers for capture and detection of *Salmonella* Typhimurium using a whole-cell SELEX approach in conjunction with cell sorting. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(8), 3677-3686.
5. Ozalp, V.C., Bayramoglu, G., Arica, M.Y. and Oktem, H.A. (2013). Design of a core-shell type immuno-magnetic separation system and multiplex PCR for rapid detection of pathogens from food samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9541-9551.
6. Ozalp, V.C., Bayramoglu, G., Kavruk, M., Keskin, B.B., Oktem, H.A. and Arica, M.Y. (2014). Pathogen detection by core-shell type aptamer-magnetic preconcentration coupled to real-time PCR. *Analytical Biochemistry*, 447, 119-125.
7. Vaughan, R.D., O'sullivan, C.K. and Guilbault, G.G. (2001). Development of a quartz crystal microbalance (QCM) immunosensor for the detection of *Listeria monocytogenes*. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(10), 635-638.
8. Paniel, N., Baudart, J., Hayat, A. and Barthelmebs, L. (2013). Aptasensor and genosensor methods for detection of microbes in real world samples. *Methods*, 64(3), 229-240.
9. Huang, H., Zhou, J., Chen, S., Zeng, L. and Huang, Y. (2004). A highly sensitive QCM sensor coated with Ag⁺-ZSM-5 film for medical diagnosis. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 101(3), 316-321.
10. Su, X.L. and Li, Y. (2005). A QCM immunosensor for *Salmonella* detection with simultaneous measurements of resonant frequency and motional resistance. *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6), 840-848.
11. Özalp, V.C. (2011). Acoustic quantification of ATP using a quartz crystal microbalance with dissipation. *Analyst*, 136(23), 5046-5050.

12. Bayramoglu, G., Tunali, Y. and Arica, M.Y. (2007). Immobilization of β -galactosidase onto magnetic poly (GMA–MMA) beads for hydrolysis of lactose in bed reactor. *Catalysis Communications*, 8(7), 1094-1101.
13. Oktem, H.A., Bayramoglu, G., Ozalp, V.C. and Arica, M.Y. (2007). Single-step purification of recombinant thermus aquaticus DNA polymerase using DNA-aptamer immobilized novel affinity magnetic Beads. *Biotechnology Progress*, 23(1), 146-154.
14. Duan, N., Wu, S., Ma, X., Xia, Y. and Wang, Z. (2014). A universal fluorescent aptasensor based on AccuBlue dye for the detection of pathogenic bacteria. *Analytical Biochemistry*, 454, 1-6.
15. Bayramoglu, G. and Arica, M. Y. (2012). Preparation of comb-type magnetic beads by surface-initiated ATRP: modification with nitrilotriacetate groups for removal of basic dyes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(32), 10629-10640.
16. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S.A. and Spivak, D.A. (2008). Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(4), 1009-1021.
17. Hong, S.R., Choi, S.J., Do Jeong, H. and Hong, S. (2009). Development of QCM biosensor to detect a marine derived pathogenic bacteria edwardsiella tarda using a novel immobilisation method. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(6), 1635-1640.
18. Hua, X., Zhou, Z., Yuan, L. and Liu, S. (2013). Selective collection and detection of MCF-7 breast cancer cells using aptamer-functionalized magnetic beads and quantum dots based nano-bio-probes. *Analytica Chimica Acta*, 788, 135-140.
19. Ye, W.N., Combes, D. and Monsan, P. (1988). Influence of additives on the thermostability of glucose oxidase. *Enzyme and Microbial Technology*, 10(8), 498-502.
20. Fried, J.R. (2014). *Polymer science and technology*. Torino: Pearson Education.
21. Saçak, M. (2006). *Polimer kimyası* (3. Baskı). Ankara: Gazi Kitabevi.
22. Ober, C.K., Cheng, S.Z., Hammond, P.T., Muthukumar, M., Reichmanis, E., Wooley, K.L. and Lodge, T.P. (2008). Research in macromolecular science: challenges and opportunities for the next decade. *Macromolecules*, 42(2), 465-471.
23. Tonelli, A.E. and Srinivasarao, M. (2001). *Polymers from the inside out*. New York: John Wiley & Sons.
24. Bayramoglu, G., Karagoz, B., Bicak, N. and Arica, M. Y. (2014). Surface-Initiated Ring-Opening Polymerization of Poly (2-methyl-2-oxazoline) from Poly (bromoethyl methacrylate/methyl methacrylate) Microspheres and Modification into PEI: Immobilization of α -Amylase by Adsorption and Cross-Linking. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 53(37), 14263-14271.
25. Odinan, G. (2004). *Principles of polymerization*. New York: John Wiley & Sons.

26. Svec, F. and Frechet, J. M. (1995). Modified poly (glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative-scale ion-exchange chromatography of proteins. *Journal of Chromatography A*, 702(1-2), 89-95.
27. Ozalp, V.C., Bayramoglu, G., Erdem, Z. and Arica, M.Y. (2015). Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation. *Analytica chimica acta*, 853, 533-540.
28. Gaddam, N.B., Xavioir, S.F. and Goel, T.C. (1977). Copolymerization of 2-hydroxypropyl methacrylate with alkyl acrylate monomers. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 15(6), 1473-1478.
29. Brusotti, G., Calleri, E., Milanese, C., Catenacci, L., Marrubini, G., Sorrenti, M., Girella, A., Massolini, G. and Tripodo, G. (2016). Rational design of functionalized polyacrylate-based high internal phase emulsion materials for analytical and biomedical uses. *Polymer Chemistry*, 7(48), 7436-7445.
30. Milani, A. H., Bramhill, J., Freemont, A. J. and Saunders, B. R. (2015). Swelling and mechanical properties of hydrogels composed of binary blends of inter-linked pH-responsive microgel particles. *Soft Matter*, 11(13), 2586-2595.
31. Atifi, S., Su, S. and Hamad, W.Y. (2014). Mechanically tunable nanocomposite hydrogels based on functionalized cellulose nanocrystals. *Nordic Pulp and Paper Research Journal*, 29(1), 95-104.
32. Bayramoglu, G. and Arica, M.Y. (2014). P (HPMA/EGDMA) beads grafted with fibrous chains by SI-ATRP method: agmatine functionalized affinity beads for selective separation of serum albumin. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37(2), 205-215.
33. Santander-Borrego, M., Green, D. W., Chirila, T. V., Whittaker, A. K. and Blakey, I. (2014). Click functionalization of methacrylate-based hydrogels and their cellular response. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 52(13), 1781-1789.
34. Arica, M.Y. (2000). Epoxy-derived pHEMA membrane for use bioactive macromolecules immobilization: Covalently bound urease in a continuous model system. *Journal of Applied Polymer Science*, 77(9), 2000-2008.
35. Ilić-Stojanović, S., Nikolić, L., Nikolić, V., Ristić, I., Budinski-Simendić, J., Kapor, A. and Nikolić, G. M. (2014). The structure characterization of thermosensitive poly (N-isopropylacrylamide-co-2-hydroxypropyl methacrylate) hydrogel. *Polymer International*, 63(6), 973-981.
36. Ishihara, K., Kobayashi, M., Ishimaru, N. and Shinohara, I. (1984). Glucose induced permeation control of insulin through a complex membrane consisting of immobilized glucose oxidase and a poly (amine). *Polymer Journal*, 16(8), 625.
37. Bayramoglu, G. and Arica, M. Y. (2012). Preparation of comb-type magnetic beads by surface-initiated ATRP: modification with nitrilotriacetate groups for removal of basic dyes. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 51(32), 10629-10640.

38. Orthner, M.P., Lin, G., Avula, M., Bueteftisch, S., Magda, J., Rieth, L.W. and Solzbacher, F. (2010). Hydrogel based sensor arrays (2×2) with perforated piezoresistive diaphragms for metabolic monitoring (in vitro). *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145(2), 807-816.
39. Han, I.S., Han, M.H., Kim, J., Lew, S., Lee, Y.J., Horkay, F. and Magda, J. J. (2002). Constant-volume hydrogel osmometer: a new device concept for miniature biosensors. *Biomacromolecules*, 3(6), 1271-1275.
40. Lin, G., Chang, S., Kuo, C. H., Magda, J. and Solzbacher, F. (2009). Free swelling and confined smart hydrogels for applications in chemomechanical sensors for physiological monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 136(1), 186-195.
41. Rittich, B., Španová, A. and Horák, D. (2009). Functionalised magnetic microspheres with hydrophilic properties for molecular diagnostic applications. *Food Research International*, 42(4), 493-498.
42. Arica, M.Y., Bayramoğlu, G. and Bıçak, N. (2004). Characterisation of tyrosinase immobilised onto spacer-arm attached glycidyl methacrylate-based reactive microbeads. *Process Biochemistry*, 39(12), 2007-2017.
43. Kavruk, M., Celikbicak, O., Ozalp, V.C., Borsa, B.A., Hernandez, F.J., Bayramoglu, G., Salih, B. and Arica, M.Y. (2015). Antibiotic loaded nanocapsules functionalized with aptamer gates for targeted destruction of pathogens. *Chemical Communications*, 51(40), 8492-8495.
44. Zhang, L., Zhu, X., Zheng, S. and Sun, H. (2009). Photochemical preparation of magnetic chitosan beads for immobilization of pullulanase. *Biochemical Engineering Journal*, 46(1), 83-87.
45. Qu, J., Liu, G., Wang, Y. and Hong, R. (2010). Preparation of Fe₃O₄-chitosan nanoparticles used for hyperthermia. *Advanced Powder Technology*, 21(4), 461-467.
46. El-Sherbiny, I. M. and Smyth, H. D. (2010). Biodegradable nano-micro carrier systems for sustained pulmonary drug delivery:(I) self-assembled nanoparticles encapsulated in respirable/swellable semi-IPN microspheres. *International Journal of Pharmaceutics*, 395(1-2), 132-141.
47. Yavuz, C.T., Prakash, A., Mayo, J.T. and Colvin, V.L. (2009). Magnetic separations: from steel plants to biotechnology. *Chemical Engineering Science*, 64(10), 2510-2521.
48. Ma, Z. and Liu, H. (2007). Synthesis and surface modification of magnetic particles for application in biotechnology and biomedicine. *China Particuology*, 5(1-2), 1-10.
49. Wada, S., Ichikawa, H. and Tsumi, K. (1995). Removal of phenols and aromatic amines from wastewater by a combination treatment with tyrosinase and a coagulant. *Biotechnology and Bioengineering*, 45(4), 304-309.
50. Schulz, B., Riedel, A. and Abel, P. U. (1999). Influence of polymerization parameters and entrapment in poly (hydroxyethyl methacrylate) on activity and stability of GOD. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 7(1-4), 85-91.

51. Křížová, J., Španová, A., Rittich, B., & Horák, D. (2005). Magnetic hydrophilic methacrylate-based polymer microspheres for genomic DNA isolation. *Journal of chromatography A*, 1064(2), 247-253.
52. Horak, D., Semenyuk, N. and Lednický, F. (2003). Effect of the reaction parameters on the particle size in the dispersion polymerization of 2-hydroxyethyl and glycidyl methacrylate in the presence of a ferrofluid. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 41(12), 1848-1863.
53. Horák, D. (2001). Magnetic polyglycidylmethacrylate microspheres by dispersion polymerization. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*, 39(21), 3707-3715.
54. Ozalp, V.C., Bayramoglu, G., Arica, M.Y. and Oktem, H.A. (2013). Design of a core-shell type immuno-magnetic separation system and multiplex PCR for rapid detection of pathogens from food samples. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(21), 9541-9551.
55. Deisingh, A.K. (2006). *Aptamer-based biosensors: biomedical applications*. Heidelberg: Springer.
56. Tombelli, S., Minunni, M. and Mascini, M. (2005). Analytical applications of aptamers. *Biosensors and Bioelectronics*, 20(12), 2424-2434.
57. McCauley, T.G., Hamaguchi, N. and Stanton, M. (2003). Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Analytical Biochemistry*, 319(2), 244-250.
58. Delwiche, M., Tang, X., BonDurant, R. and Munro, C. (2001). Improved biosensor for measurement of progesterone in bovine milk. *Transactions of the ASAE*, 44(6), 1997.
59. Sananikone, K., Delwiche, M.J., BonDurant, R.H. and Munro, C.J. (2004). Quantitative lateral flow immunoassay for measuring progesterone in bovine milk. *Transactions of the ASAE*, 47(4), 1357.
60. Su, X.L. and Li, Y. (2004). A self-assembled monolayer-based piezoelectric immunosensor for rapid detection of Escherichia coli O157: H7. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(6), 563-574.
61. Tschmelak, J., Proll, G. and Gauglitz, G. (2005). Optical biosensor for pharmaceuticals, antibiotics, hormones, endocrine disrupting chemicals and pesticides in water: Assay optimization process for estrone as example. *Talanta*, 65(2), 313-323.
62. Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. and Zhao, J. (2008). Aptamer-based biosensors. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 27(2), 108-117.
63. Torres-Chavolla, E. and Alocilja, E. C. (2009). Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11), 3175-3182.

64. Lee, S., Kim, Y.S., Jo, M., Jin, M., Lee, D. K. and Kim, S. (2007). Chip-based detection of hepatitis C virus using RNA aptamers that specifically bind to HCV core antigen. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 358(1), 47-52.
65. Torres-Chavolla, E. and Alocilja, E. C. (2009). Aptasensors for detection of microbial and viral pathogens. *Biosensors and Bioelectronics*, 24(11), 3175-3182.
66. Liss, M., Petersen, B., Wolf, H. and Prohaska, E. (2002). An aptamer-based quartz crystal protein biosensor. *Analytical Chemistry*, 74(17), 4488-4495.
67. Lee, M. and Walt, D.R. (2000). A fiber-optic microarray biosensor using aptamers as receptors. *Analytical Biochemistry*, 282(1), 142-146.
68. McCauley, T.G., Hamaguchi, N. and Stanton, M. (2003). Aptamer-based biosensor arrays for detection and quantification of biological macromolecules. *Analytical Biochemistry*, 319(2), 244-250.
69. Kirby, R., Cho, E.J., Gehrke, B., Bayer, T., Park, Y. S., Neikirk, D.P., McDevitt, J.T. and Ellington, A.D. (2004). Aptamer-based sensor arrays for the detection and quantitation of proteins. *Analytical Chemistry*, 76(14), 4066-4075.
70. Savran, C.A., Knudsen, S.M., Ellington, A.D. and Manalis, S.R. (2004). Micromechanical detection of proteins using aptamer-based receptor molecules. *Analytical Chemistry*, 76(11), 3194-3198.
71. Wang, K., Marshall, M. K., Garza, G., & Pappas, D. (2008). Open-tubular capillary cell affinity chromatography: Single and tandem blood cell separation. *Analytical Chemistry*, 80(6), 2118-2124.
72. Tanaka, A. and Kawamoto, T. (1999). *Cell and Enzyme Immobilization*. Washington: McGraw-Hill
73. Ryan, K.J. and Ray, C.G. (Editors) (2004). *Sherris Medical Microbiology*. New Jersey: John Wiley & Sons.
74. Baron, S. (1996). *Epidemiology--Medical Microbiology*. R.A. Gianella (Ed.). *Epidemiology chapter 21 in Baron S et al. Baron's Medical Microbiology*. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston.
75. Voetsch, A.C., Gildler, T.J.V., Angulo, F.J., Farley, M.M., Shallow, S., Marcus, R., Cieslak, P.R., Deneen, V.C. and Tauxe, R.V. 2004. FoodNet Estimate of the Burden of Illness Caused by Nontyphoidal Salmonella Infections in the United States. *Estimate of Salmonella Incidence*, 38(3), 127-134.
76. Suar, M., Jantsch, J., Hapfelmeier, S., Kremer, M., Stallmach, T. and Barrow, P. A. 2006. Virulence of broad- and narrow-host-range Salmonella enterica serovars in the streptomycin-pretreated mouse model. *Infection and Immunity*, 74(1), 632-644.
77. Painter, J.A., Ayers, T., Woodruff, R., Blanton, E., Perez, N., Hoekstra, R. M., Griffin, P.M. and Braden, C. (2009). Recipes for foodborne outbreaks: a scheme for categorizing and grouping implicated foods. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6(10), 1259-1264.

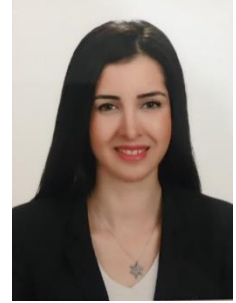
78. Zou, M., Keelara, S. and Thakur, S. (2012). Molecular characterization of salmonella enterica serotype enteritidis isolates from humans by antimicrobial resistance, virulence genes, and pulsed-field gel electrophoresis. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9(3), 232-238.
79. Allen, G., Bruce, V.R., Andrews, W.H., Satchell, F.B., Stephenson, P. (1991a). Recovery of Salmonella from frozen shrimp: Evalutaion of short-term selective enrichment, selective media, post-enrichment, and a rapid immunodiffusion method. *Journal of Food Protection*, 54(1), 22-27.
80. Andrews, W.H. (1985). A review of culture methods and their relation to rapid methods for the detection of Salmonella in foods. *Food Technology*, 3, 77-82.
81. Swanson, M.J.K., Anderson, J.E. (2000). Industry perspectives on the use of microbial data for hazard analysis and critical control point validation and verification. *Journal of Food Protection*, 63(6), 815-818.
82. Fujita, Y., Shibayama, H., Suzuki, Y., Karita, S. and Takamatsu, S. (2005). Rapid and accurate identification of microorganisms contaminating cosmetic products based on DNA sequence homology. *International Journal of Science*, 27, 309-316.
83. Davin-Regli, A., Chollet, R., Bredin, J., Chevalier, J., Lepine, F., & Pagès, J. M. (2006). Enterobacter gergoviae and the prevalence of efflux in parabens resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57(4), 757-760.
84. Zindulis, J. (2001). An insider's view into the use of PCR in the food industry. *Food Safety*, 7, 46-64.
85. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. and Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th edition). New York: W.H. Freeman and Company, 1084.
86. Hill, W.E., Datta, A.R., Feng, P, Lampel, K.A. and Payne, W.L. (2001). *Identification of foodborne bacterial pathogens by gene probes*. Gaithersburg: AOAC International.
87. Wang, J. (1997). Remote electrochemical sensors for monitoring inorganic and organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*, 16, 84-88.
88. Turner, A.P.F. (1987). *Biosensors: fundamentals and applicaitons*. Oxford: Oxford University Press, 5-7.
89. Clark, L.C. and Lyons, C. (1962). Electrode systems for continous monitoring in cardiovascular surgery. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102, 29.
90. Divis, C. (1975). Remarks on ethanol oxidation by an "Acetobacter xylinum" microbial electrode [Übersetzt, Artikel in Französisch]. *Annals of Microbiology A*, 126, 175-186.
91. Balamurugan, S., Obubuafo, A., Soper, S. A. and Spivak, D. A. (2008). Surface immobilization methods for aptamer diagnostic applications. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(4), 1009-1021.

92. Gürsoy, O., Kınık, Ö. ve Kavas, G. (2002). *Gıda güvenliği ve HACCP kapsamında süt teknolojisi açısından biyosensörlerin değerlendirilmesi*. İstanbul: Dünya yayıncılık.
93. Zhai, J., Cui, H. and Yang, R. (1997). DNA based biosensors. *Biotechnology Advances*, 15(1), 43-58.
94. Katz, E., Willner, I. and Wang, J. (2004). Electroanalytical and bioelectroanalytical systems based on metal and semiconductor nanoparticles. *Electroanalysis*, 16(1-2), 19-44.
95. Lucklum, R., Behling, C. and Hauptmann, P. (2000). Gravimetric and non-gravimetric chemical quartz crystal resonators. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 65(1-3), 277-283.
96. Taylor, R.F. and Schultz, J.S. (1996). *Handbook of Chemical and Biological Sensors, Introduction to chemical and biological sensors*. Bristol: IOP Publishing.
97. Kösslinger, C., Aberl, F.D., Wolf, H., Koch, S. and Woias, P. (1992). PZ immunosensors for HIV viruses. *Biosensors Bioelectron*, 7, 397-401.
98. Sakai, G., Sakai, T., Uda, T., Miura, N. and Yamazoe, N. (1995). Evaluation of binding of HAS to monoclonal and polyclonal antibody by PZ immunosensing. *Sensors and Actuators B*, 42, 89-94.
99. Yun, K., Kobatake, E., Haruyuma, T., Laukkanen, M., Keinänen, K. and Aizawa, M., (1998). Use of a quartz crystal microbalance to monitor immunoliposome-antigen interaction. *Analytical Chemistry*, 70(2), 260-4.
100. Sauerbrey, G.Z. (1959). Use of quartz vibrator for weighing thin films on a microbalance. *Zeitschrift für Physik*, 155, 206.
101. Weber, W.J. (1972). *In physicochemical processes for water quality control*. New York: Wiley, 206-211.
102. Basset, J., Denney, R.C., Jeffery, G.H. and Mendham, J. (1978). *In Vogel's textbook of quantitative inorganic chemistry* (4th ed.). Longman: London, 754.
103. Sidney, S. (1967). *Quantative organic analysis* (3rd ed.). New York: Wiley.
104. Bayramoglu, G., Arica, M. Y. (2012). Development of a sensitive method for selection of affinity ligand for trypsin using quartz crystal microbalance sensor. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35(3), 423-431.
105. James, W. (2000). *Encyclopedia of analytical chemistry*. New York: Wiley. 4848-4871
106. Velasco-Garcia, M.N. and Mottram, T. (2003). Biocensor technology addressing agricultural problems. *Biosystems Engineering*, 84(1), 1-12.

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Erdem Aydın, Zehra
 Uyuğu : T.C.
 Doğum tarihi ve yeri : 1989, Çiçekdağı
 Medeni hali : Evli
 Telefon : 05348511670
 e-mail : zehraerdem40@gmail.com



Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	Devam Ediyor
Lisans	Gazi Üniversitesi /Kimya Bölümü	2011
Lise	Aktepe lisesi	2005

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
-	-	-

Yabancı Dil

İngilizce

Yayınlar

Ozalp, V.C., Bayramoglu, G., Erdem, Z. and Arica, M. Y. (2015). Pathogen detection in complex samples by quartz crystal microbalance sensor coupled to aptamer functionalized core-shell type magnetic separation. *Analytica Chimica Acta*, 853, 533-540.

Hobiler

Yüzme, Yürüyüş yapmak, kitap okumak.



GAZİ GELECEKTİR..