T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YAPAY TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE KUVARS KRİSTAL MİKRODENGE SENSÖR İLE *ESCHERICHIA COLI* BAKTERİSİ ATCC 25922 SUŞUNUN DİREKT TESPİTİ

Hazırlayan
Azzam AL-TAIRI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

Yüksek Lisans Tezi

Temmuz 2020
KAYSERİ

T.C.
ERCİYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI

YAPAY TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE KUVARS KRİSTAL MİKRODENGE SENSÖR İLE *ESCHERICHIA COLI* BAKTERİSİ ATCC 25922 SUŞUNUN DİREKT TESPİTİ

(Yüksek Lisans Tezi)

Hazırlayan
Azzam AL-TAIRI

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından FBA-2016-6672 kodlu proje ile desteklenmiştir.

Temmuz 2020
KAYSERİ

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Azzam AL-TAIRI



"Yapay Tükürük İçerisinde Kuvars Kristal Mikrodenge Sensör ile *Escherichia coli* Bakterisi ATCC 25922 Suşunun Direkt Tespiti" adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi' ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan
Azzam AL-TAIRI
İmza

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU
İmza

BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKCI

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU danışmanlığında **Azzam AL-TAIRI** tarafından hazırlanan **"Yapay Tükürük İçerisinde Kuvars Kristal Mikrodenge Sensör ile *Escherichia coli* Bakterisi ATCC 25922 Suşunun Direkt Tespiti"** adlı bu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Biyomedikal Mühendisliği** Anabilim Dalında **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

09 / 07 / 2020

JÜRİ:

Danışman : Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU .....

Üye : Doç. Dr. Kutay İÇÖZ .....

Üye : Dr. Öğr. Üyesi Ömer AYDIN .....

ONAY:

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulunun ……...… tarih ve ……..……sayılı kararı ile onaylanmıştır.

……. /……../ ……

Prof. Dr. Mehmet AKKURT

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Çalışmalarım boyunca farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatan, yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen ve bu günlere gelmemde en büyük katkı sahibi sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca; kıymetli jüri üyelerinin bu tez için ayırmış oldukları zaman, çok değerli yorum ve eleştirileri için de çok teşekkür ederim.

Çalışmalarım süresince yardımını esirgemeyen

Doktora öğrencisi Fatma Betül KÖŞKER,
Arş.Gör. Melis TOKMAK,
Müh. Merve ÖRER,
Müh. Hatice YİĞİTER' e ve tüm laboratuvar arkadaşlarıma sonsuz teşekkürler ederim. Ve hayatımdaki en büyük maddi ve manevi destekçim olan aileme en içten sevgilerimi sunar, teşekkürü bir borç bilirim.

Azzam AL-TAIRI

Temmuz 2020, KAYSERİ

YAPAY TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE KUVARS KRİSTAL MİKRODENGE SENSÖR İLE *ESCHERICHIA COLI* BAKTERİSİ ATCC 25922 SUŞUNUN DİREKT TESPİTİ

Azzam AL-TAIRI

Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
Yüksek Lisans Tezi, Temmuz 2020
Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

ÖZET

Escherichia coli çoğunlukla patojenik ve toksik olmayan bir bakteri olmasına rağmen, bazı suşları patojenik ve toksik özellikler gösterirler ve bu suşlar ciddi sorunlara neden olmaktadır. Bunun yanı sıra biyolojik bir sıvı olan tükürük non-invaziv olarak önemli avantajlara sahiptir. Özellikle, örnekleme, nakliye ve depolama açısından seruma göre daha ekonomiktir. Ayrıca, küresel bir halk sağlık problemi haline gelen antibiyotik-dirençli bakterilerin tükürükte hızlı tespiti ve sonuca göre tedavi planlaması yapılması mortalite oranını ve test maliyetini ciddi oranda düşürecektir. Bu amaçla tasarlanmış olan tespit sistemi oldukça önem arz etmektedir. Tez çalışmasında, Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) sensörü ile *E.coli* bakterisinin yapay tükürük içerisinde serolojik tespiti amaçlanmaktadır. *E.coli* bakterisini direkt tespit etmek için anti-*E.coli* antikoru kullanılmıştır. Bu antikor *E.coli* bakterisi ile spesifik bir şekilde bağlanmaktadır. Fakat QCM sensör yüzeyinin kaplama ve bloklama işlemine tabii tutulması gerekmektedır. Kaplama aşamasında, QCM sensörü 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) kaplama solüsyonu içerisinde bir gece inkübe edilmiştir. Daha sonra, MUA üzerindeki karboksilat grubu ve anti-*E.coli* antikor yüzeyindeki amin grubu ile konjuge edilmesi için EDC/NHS kullanılmıştır. Böylelikle anti-*E.coli* antikoru sensör yüzeyinde biyoreseptör olarak immobilize edilmiştir. Ancak tükürük numunesinden kaynaklı oluşabilecek spesifik olmayan bağlantıları engellemek için QCM sensör yüzeyi, Büyükbaş Serum Albümini bloklama ajanına maruz bırakılmıştır. Sonra, yapay tükürükteki *E.coli* bakterisi, farklı konsantrasyonlarda (10^7, 10^6,10^4 ve 10^2 cfu/mL) 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır. Sonuçlar, sistem için en düşük tespit konsantrasyonu olan Tespit Sınırı (Limit of Detection (LOD)) 10^4 cfu/mL'de bile hassas bir şekilde kaydedilmiştir ve bu yöntemle *E.coli* bakterisinin tespit edilebildiği gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör, QCM, Bakteri Tespiti.

THE DIRECT DETECTION OF ESCHERICHIA COLI ATCC 25922 BACTERIA STRAIN IN SIMULATED SALIVA BASED ON QUARTZ CRYSTAL MICROBALANCE (QCM) SENSOR.

Azzam AL-TAIRI

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences
Master Thesis, July 2020
Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

Escherichia coli is mostly non-pathogenic and non-toxic bacteria, but some strains show pathogenic and toxic properties, and these strains cause serious problems. Moreover, saliva is a non-invasively procurable biomarker medium which has very important advantages. In particular, saliva is more economical than serum for taking, transportation and storage of samples. In addition, the rapid detection in saliva of antibiotic-resistant bacteria that have become a global public health problem and treatment planning according to the result will significantly reduce mortality rate and test cost. Therefore, designing a system that can rapidly detect a pathogenic bacterium in saliva is very significant. In this study, the serological detection of *Escherichia coli* (*E.coli*) bacteria in simulated saliva was investigated by using QCM sensor. In order to detect *E.coli* bacteria directly, an anti-*E.coli* antibody was used because it can bind specifically to *E.coli* bacteria. But firstly, QCM sensor surface needs to be modified, and non-specific binding must be blocked. During the coating phase, the QCM sensor was incubated overnight in 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) coating solution. After that, EDC / NHS were used to conjugate the carboxylate group on the MUA and the amine group on the anti-*E.coli* antibody surface. So, the anti-*E.coli* antibody was immobilized on the sensor surface as a bioreceptor. However, the QCM sensor surface was exposed to Bovine Serum Albumin (BSA) blocking agent to prevent non-specific connections that may occur from the saliva sample. Finally, *E.coli* bacteria in the simulated saliva were given at four different concentrations (10^7, 10^6, 10^4 and 10^2 CFU/mL) and repeated at least three times. The results showed that *E.coli* bacteria were detected at the minimum concentration (10^4 CFU/mL) by this system.

Keywords: Biosensor, QCM, Bacteria Detection.

İÇİNDEKİLER

YAPAY TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE KUVARS KRİSTAL MİKRODENGE SENSÖR İLE ESCHERICHIA COLI BAKTERİSİ ATCC 25922 SUŞUNUN DİREKT TESPİTİ

BİLİMSEL ETİGE UYGUNLUK……...…….ii

YÖNERGEYE UYGUNLUK...……...……iii

KABUL VE ONAY...……...……...…….... iv

ÖNSÖZ…….…… v

ÖZET……... vi

ABSTRACT…….…….. vii

İÇİNDEKİLER…….…… viii

KISALTMALAR…….…….. xii

TABLOLAR LİSTESİ ...……...….. xiii

ŞEKİLLER LİSTESİ ...…….…….……...…… xiv

GİRİŞ ...…… 1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Problem Durumu 2

1.2 Araştırmanın Amacı 3

1.3 Araştırmanın Önemi..... 3

1.4 Tükürük..... 4

1.4.1 Tespit Ortamı Olarak Tükürüğün Özellikleri 4

1.5 *Escherichia coli* Bakterisi 6

1.6 Bakteriyel Tespit Konvansiyonel Geleneksel Yöntemleri. 7

1.6.1 Bakteri kültürü 7

1.6.2 ELISA Çalışma Mekanizması 8

1.6.2.1 ELISA'da Farklı Protokoller 9

1.6.2.1.1 Direkt ELISA 11

1.6.2.1.2 İndirekt ELISA 11

1.6.2.1.3 Sandviç ELISA 11

1.6.2.1.4 Çiftli Sandviç ELISA 11

1.6.2.1.5 Rekabetçi ELISA 12

1.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu PCR 12

1.6.3.1 Farklı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) türleri 14

1.6.3.1.1 Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi. 14

1.6.3.1.2 Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu 15

1.6.3.1.3 Ters transkripsiyon PCR 15

1.6.3.2 PCR ve Bakteri 16

1.7 Bakteriler Algılama için Biyosensörler: 16

1.7.1 Bakteriyel Algılama için Optik Biyosensörler. 18

1.7.1.1 Floresan Optik Biyosensörler 18

1.7.1.2 SPR Optik Biyosensörler 19

1.7.1.3 Fiber Optik Biyosensör 21

1.7.2 Bakteriyel Algılama için Elektrokimyasal Biyosensörler. 22

1.7.2.1 Voltametrik biyosensörler 22

1.7.2.2 Potansiyometrik biyosensörler 24

1.7.2.3 Empedimetrik biyosensör 24

1.7.2.4 Kondüktometrik biyosensör 26

1.7.3 Bakteriyel Algılama için Piezoelektrik Biyosensörler. 26

1.8 Günümüzdeki tespit sistemlerinin değerlendirilmesi 29

1.9 Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) 29

1.9.1 QCM prensibi 30

1.9.2 Biyosensörler olarak QCM platformu 33

1.9.2.1 QCM İmmünosensörleri 34

1.9.2.2 QCM Platformunda Moleküler Baskılı Polimerler (MIP).....35

1.9.2.3 QCM Genetik Biyosensörler 37

2.BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1 Deney Malzemeleri ve Kimyasalları.....38

2.1.1 Kullanılan Malzemeler.....38

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar.....39

2.2 Tampon ve Yapay Tükürük Hazırlanması 40

2.3 Tespit Sistemi ve *E.coli* Tespit Deney Düzenekleri.....41

2.4 QCM Sensörü ve Tespit Hücresi Temizlenmesi.....42

2.5 QCM Biyosensör Modifikasyonunun İşlemleri 42

2.5.1 MUA ile QCM Sensörü Kaplanması.....42

2.5.1.1 MUA Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması.....43

2.5.1.2 MUA Kaplama İşleminin Yapılması.....43

2.5.2 EDC/ NHS Çapraz bağlanma (Crosslinking) 44

2.5.2.1 EDC / NHS Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması.....44

2.5.2.2 EDC/ NHS Çapraz bağlanma (Crosslinking) Uygulanması 45

2.5.3 Antikor İmmobilizasyonu 46

2.5.3.1 Antikor Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması.....46

2.5.3.2 Antikor İmmobilizasyonu Uygulanması 46

2.6 BSA Bloklama 47

2.6.1 BSA Solüsyonunun Hazırlanması 47

2.6.2 BSA Bloklama İşleminin Uygulanması.....47

2.7 *E.coli* Suşunu Tespiti 48

2.7.1 *E.coli* Bakteri Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması 48

2.7.2 *E.coli* Bakteri Solüsyonun Verilmesi.....49

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1 Araştırma Modeli.....50
3.2 QCM Biyosensör Modifikasyonunun Karakterizasyonu.....51
3.3 QCM Biyosensörün Yüzeyi BSA ile Bloklama.....52
3.4 QCM Biyosensörü ile *E.coli* ATCC 25922'nin Saptanması. 53
3.5 *E.coli* Bakteri Reaksiyonunun Standart Eğrisi.....56
3.6 Sistemin İstatiksel Yorumu(T-Testi) 56

4.BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

4.1 Tartışma.....58
4.2 Sonuç ve Öneriler.....60
4.2.1 Sonuç.....60
4.2.2 Öneriler.....60
KAYNAKÇA.....62
ÖZGEÇMİŞ.....70

KISALTMALAR

Sembol	Anlamı	Birimi
QCM	Kuartz Kristal Mikrodenge	-
E.coli	*Escherichia coli*	-
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	-
BSA	Büyükbaş Serum Albümin	-
MUA	11-Mercaptoundecanoic acid	-
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride	-
NHS	N-Hydroxysuccinimide	-
PBS	Fosfat Tamponlu Serum	-
DIW	Deiyonize Su	-
Hz	Hertz	s^{-1}
ω	Açısal Hız	W
I	Akım	A
m	kütle	g/cm^2
R	Direnç	ohm
Z	Empedans	ohm
V	Gerilim	V
f_0	Kristalin temel rezonans frekansı	Hz
f	Frekans	Hz
s	Saniye	S
mL	Mililitre	-
mg	Miligram	-
ng	Nanogram	-
SF	Seyreltme Faktörü	-
ISE	İyon Seçici Electrot	-
POC	Hasta Başında Testi	-
AuNP	Altın Nanoparçacıkları	-
QD	Kuantum Noktaları	-
PZT	Piezoelektrik Seramik Malzeme	-
IDAM	Interdigital Dizi Mikroelektrot	-
Ab	Antikor	-
Ag	Antijen	-
MIP	Moleküler Baskılı Polimerler	-
RBC	Kırmızı Kan Hücresi	-
WBC	Beyaz Kan Hücresi	-
LOD	Saptama Sınırı	-
CFU	Koloni Oluşturan Birim	-
DPV	Diferansiyel Puls Voltametrisi	-
CV	Döngüsel Voltametri	-
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans	-
CD	Karbon Noktaları	-

TABLOLAR LİSTESİ

Tablo 1. 1 Tespit ortamı olarak tükürüğün avantajları.....5
Tablo 1. 2 Yaygın olarak kullanılan enzimler hakkında ayrıntılı bilgiler.....9
Tablo 1. 3 ELISA protokollerinin ve kullanılan hedef biyomoleküllerin karşılaştırılması 10
Tablo 1. 4 Günümüzdeki kullanılan E.coli tespit sistemlerinin karşılaştırılması. 28
Tablo 1. 5 QCM biyosensörleri tarafından testlerin incelenmesi. 33
Tablo 3. 1 QCM sensörü yüzey modifikasyonunun her aşamasında frekans kayması ve molekül miktarı değişiklikleri göstermektedir. 52
Tablo 4. 1 Kullanılan yöntem tipine ve elde edilen LOD'ye göre bakterilerin saptanması için bazı yöntemler özetlenmiştir. 59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. 1. Şematik diyagram, serum moleküllerinin tükürük içerisine dağılım. 5
Şekil 1. 2. Escherichia coli bakteri illüstrasyonu 6
Şekil 1. 3. Bakteri tespiti için farklı yöntemler 7
Şekil 1. 4. Polimeraz zincir reaksiyonu prensipleri 13
Şekil 1. 5. DNA'nın PCR ile üstel çoğaltılması 14
Şekil 1. 6. Farklı hedeflerin amplifikasyonu 15
Şekil 1. 7. Biyolojik tanıma elemanları (Biyoreseptör). 17
Şekil 1. 8. Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörü kavramı. 20
Şekil 1. 9. Fiber-optik biyosensörlerin şematik gösterimi 21
Şekil 1. 10. Döngüsel voltametri (CV) örnek sonuçları. 23
Şekil 1. 11 Elektrokimyasal ölçümler için giriş / çıkış bazı fonksiyonları. E = potansiyel, i = akım ve Q = yük. 23
Şekil 1. 12 EIS sensör tasarımının şematik ve sonuçlar gösterimleri 25
Şekil 1. 13 Spesifik etkileşim sırasında PZT rezonatörünün elektrik empedansının maksimum reel kısmının zamana bağlılıkları 27
Şekil 1. 14. Kullanılan altın ile kaplanmış QCM sensör. 30
Şekil 1. 15. (a) kuvars kristal elektrotlarına statik bir voltaj uygulandığında, (b) kuvars kristal elektrotlarına bir AC voltajı uygulandığında kuvars, (c) salınım genliği ve elektrotlar tarafından çekilen akım 31
Şekil 1. 16. Sauerbrey bulgularının açıklandığı şematik 32
Şekil 1. 17. QCM İmmünosensörleri prensibi. 34
Şekil 1. 18. Nanoparçacık ile QCM immünosensörü sinyal arttırılması 35
Şekil 1. 19. Moleküler Baskılı Polimer ile kaplanmış QCM sensörü ve şablona kimyasal olarak aynı veya yakın bir analit analizi 36
Şekil 1. 20. Sinyal amplifikasyonu için nanopartiküller ile etiketlenmiş bir DNA probu kullanan bir QCM Genetik Biyosensör prensibi 37
Şekil 2. 1. Kullanılan *E.coli* tespit QCM sistemi. 38
Şekil 2. 2. EDC yapısı. 39
Şekil 2. 3. NHS yapısı. 40
Şekil 2. 4. MUA yapısı. 40

Şekil 2. 5. Kaplı döngü QCM tespit sistemi. 41
Şekil 2. 6. Açık döngü QCM tespit sistemi. 42
Şekil 2. 7. QCM sensörünün MUA ile kaplanması. 43
Şekil 2. 8. EDC / NHS reaksiyonu. 45
Şekil 2. 9. Anti-E.coli antikor immobilizasyonu. 46
Şekil 2. 10. BSA bloklama. 47
Şekil 2. 11. QCM sensörü ile *E.coli* Bakteri tükrük içersinde tespiti. 48
Şekil 2. 12. E.coli bakteri solüsyonunun konsantrasyonu seyreltme işlemleri. 49
Şekil 3. 1. QCM Biyosensör Modifikasyon İşleminin QCM ile Takibi. 51
Şekil 3. 2. BSA Bloklam İşleminin QCM ile Takibi. 53
Şekil 3. 3. Farklı konsantrasyonlarda *E.coli* ATCC 25922 solüsyonlarının uygulanması sonuçları. 54
Şekil 3. 4. Deneyler Aşamalarının Frekans Değişimi 55
Şekil 3. 5. Logaritmik eksenlerde doz kıyaslaması.. 56

GİRİŞ

Biyosensörler, hedef biyolojik ajanın tespitine yönelik biyoreseptörlerin kullanıldığı sensörlerdir. Elektrokimyasal, optik, termal vb. yöntemlerin kullanıldığı biyosensörlerde hız ve yerinde tespit ön plana çıkmaktadır. Patojen mikroorganizmaların uygun ortam sağlandığında kolayca üreyebildikleri ve kısa sürede toksijenik etkiler ile kişiyi ölüme giden tabloya ulaştırmaları mümkün olmaktadır. Dolayısıyla tespit için tasarlanan biyosensörlerin mümkün olabildiğince hızlı, hassas ve yerinde tespite imkân vermeleri oluşabilecek olumsuz bir tabloyu önleyebilir ve gerekli tedbirlerin alınmasını sağlayabilir. *E.coli* bakterisi, bilim dünyasında en çok çalışılan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Genellikle, *E.coli* bağırsaklarda yaşayan çoğunlukla patojenik ve toksik olmayan bir bakteri olmasına rağmen, bazı suşları patojenik ve toksik özellikler gösterir ve bu suşlar ciddi sorunlara neden olmaktadır. Ayrıca, biyolojik bir sıvı olan tükürük non-invaziv olarak önemli avantajlara sahiptir. Bu yüzden hızlı ve tükürük içerisinde tespiti oldukça önem arzetmektedir. Tez çalışmasında, yapay tükürük içerisinde Kuvars Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance (QCM)) sensör ile *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun direkt tespitidir. Sağlanan sensör platformu 60 dakika gibi kısa bir sürede, yerinde ve invasiv olmayan bir şekilde tespite imkân sağlayacaktır. Hızlı tespit sayesinde incelenen numune ile ilgili bilgiye en kısa sürede ulaşma imkânı doğacaktır. Kurulan platform ile belirlenen hedefler gerçekleştirildiğinde gerek *E.coli* bakterisinin enteropatojenik ve enterotoksijenik türlerinin gerekse diğer patojenlerin tespitinin yapılabileceği bir platform oluşacaktır. Bu tez dört bölümden oluşmaktadır. Birinci bölümde genel bilgiler ve literatür çalışması özet bir şekilde verilmiştir. Kullanılan yöntem hakkında ayrıntılı bilgi ikinci bölümde verilmektedir. Bu tez deneysel bir çalışma olduğu için kullanılan materyal ve yöntemin aşamaları ayrıntılı bir şekilde anlatılmaktadır. Elde edilen bulgular üçüncü bölümde sunulmaktadır. Tartışma, sonuç ve öneriler son bölümde verilmektedir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Problem Durumu

Diyagnostik ve izleme genellikle biyopsiler ve tekrarlanan kan alımı gibi ağrılı invazif prosedürleri gerektirir ve hoş olmayan bir deneyime gereksiz stres eklemektedir. Tükürük tabanlı biyobelirteçler bu önlemleri atlamak için eşsiz fırsatlar sunmaktadır. Tükürük, sistemik hastalıklar, ağız kanseri, kalp ve kardiyovasküler hastalıklar, periodontal hastalıkların yanı sıra ağızla ilgili bakteriler (ör. *Streptococcus salivarius, Streptococcus sanguinis,*ve *Neisseria subflava,*), HIV ve daha fazlası gibi bulaşıcı hastalıklar da dahil olmak üzere çok çeşitli teşhis uygulamaları nedeniyle diyagnostik amaçlı giderek daha popüler bir örnek matris haline gelmektedir [1][2].

Escherichia coli ATCC 25922 gram negatif bir bakteridir. Genellikle, E.coli patojenik ve toksik olmayan bir bakteri olmasına rağmen, bazı suşları ciddi sorunlara neden olmaktadır. İnsan gastrointestinal kanalında doğal olarak yaşayan E.coli bakterilerinin, gıda veya suyun dışkı yoluyla kontamine olduğu belirlenmiştir [3]. Şimdiye kadar, farklı yöntemler ile *E.coli* suşunu tespit etmek için bazı protokoller mevcuttur. Bunların arasında bakteri kültürü ve koloni sayımı temelli yöntemler devam etmektedir. Ancak sonuç vermesi fazla zaman almaktadır. Bu nedenle hızlı bakteri taranması ve hasta başı testleri için uygun değildir. Diğer ve sık kullanılan bir yöntem olan polimeraz zincir reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction (PCR)) yada gerçek zamanlı PCR ile hızlı ve özgün bir şekilde *E.coli* tespiti sağlanmaktadır. Bu yöntemler daha duyarlı ve özgündür[4]. Fakat PCR ön işlemleri ve cihazları hem çok pahalı hem de gelişmekte olan ülkelerde yaygın değildir. Genellikle, bakterilerin serolojik tespiti ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ile yapılmaktadır. Bu teknik, PCR'e nazaran gerçekleştirmesi daha kolay ve daha ucuzdur ELISA özgü olmasına rağmen

her kullanılan antikorun etiketlenmesini gerektirmektedir, bu da zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir. Ek olarak, belirli antikorlar doğrudan etiketleme için uygun olmayabilmektedir [5]. Bu engellerin üstesinden gelebilmek için biyosensörlere dayalı yöntemler ön plana çıkmaktadır. Bu çalışmada, yapay tükürük içerisinde *E.coli* bakterisinin ATCC 25922 suşunun serolojik tespiti için bir piezoelektrik biyosensör (Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM)) kullanılmıştır. Tespit, klinik diyagnostik cihazların hassasiyet seviyesinde, gerçek zamanlı, hızlı ve yerinde uygulanacak şekilde kurgulanmıştır.

1.2 Araştırmanın Amacı

Bu çalışmada, *E.coli* bakterisinin ATCC 25922 suşunun tespiti hedeflenmiştir. *E.coli* ATCC 25922 suşu vücudumuzda bulunan; patojenik ve toksik olmayan bir bakteridir. Bu bakteri bilimsel araştırma çalışmalarında en çok kullanılan mikroorganizmaların başında gelmektedir. Problem durumu bölümünde belirtildiği gibi, *E.coli* tespiti için çeşitli yöntemler mevcuttur. Fakat bu yöntemler bazı dezavantajlara sahiptir. Bu yöntemlere nazaran biyosensörlere dayalı tespit yöntemleri düşük maliyetli, hızlı ve pratiktir. Bu sebeple çalışmada, *E.coli* bakterilerini saptanmak için bir piezoelektrik biyosensör kullanılmıştır. Özetle Kuvars Kristal Mikrobalans (QCM) sensörü kullanarak klinik diyagnostik cihazların hassasiyet seviyesinde, yaklaşık bir saat içerisinde, gerçek zamanlı, hızlı ve erken bir şekilde, yapay tükürük içerisinde *E.coli* bakterisinin ATCC 25922 suşunun serolojik tespiti yapılması amaçlanmıştır.

1.3 Araştırmanın Önemi

Escherichia coli ATCC 25922 gram negatif bir bakteridir. İnsan gastrointestinal kanalında doğal olarak yaşayan *E.coli* bakterilerinin, gıda veya suyun dışkı yoluyla kontamine olduğu belirlenmiştir. Fakat, tükürük biyolojik örnekleri elde etmek için ilginç bir alternatif olarak ortaya çıkmıştır. Tükürük, biyolojik sıvı olarak önemli avantajlara sahiptir. Bunlardan en önemlisi ağrısız ve invasiv olmayan bir yöntem olması ve aynı zamanda kolay bir şekilde elde edilebilmesidir.[6]. Ayrıca, küresel bir halk sağlığı problemi haline gelen antibiyotik-dirençli bakterilerin tükürükte hızlı tespiti ve sonuca göre tedavi planlaması yapılması mortalite oranını ve test maliyetini ciddi oranda düşürecektir. Bunun için tükürük içerisinde patojenik bakterilerin tespit edilebilmesi önemlidir. Biyosensör tabanlı yöntemler ile yapılan bu çalışma gibi

çalışmalar, genelikle hızlı, düşük maliyet ve pratik bir şekilde moleküler biyobelirteçlerin tespiti sağlanmaktadır. Bu yöntemler ile rutin mikrobiyoloji laboratuvarlarında ve uzman personel gerektirmeden tespit uygulanabilmektedir. Ayrıca, bakterilerin erken tespiti ve sonuçlara göre tedavi planlaması sayesinde hastaların kurtarılması ciddi oranda artırılabilmektedir. Diğer bir husus da bu çalışmayla sadece patojenik bakterilerin değil aynı zamanda diğer patojenik mikroorganizmaların tespitine sağlamaktadır.

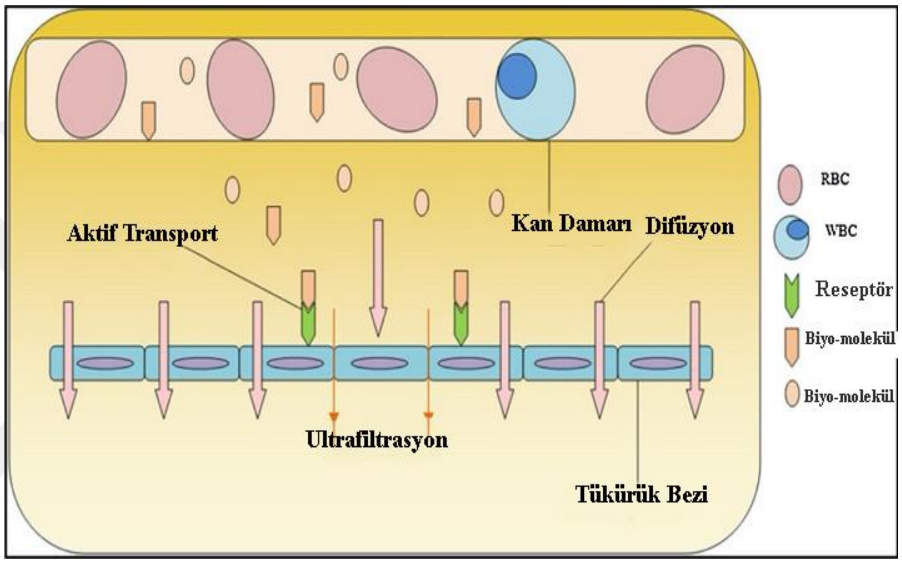
1.4 Tükürük

İnsan tükürüğü, su (% 99), proteinler (% 0.3) ve inorganik maddelerden (% 0.2) oluşan hafif asidik (pH 6.0 ila 7.0) heterojen bir biyolojik sıvıdır. Ortalama olarak, bireysel tükürük salınımı günde 1 ila 1.5 litre aralığındadır. Tükürük sadece sindirimi, yutmayı, tadımı ve doku yağlamasını kolaylaştırmakla kalmaz, aynı zamanda patojenlere karşı koruyucu bir bariyer olarak da hizmet etmektedir. Tükürük, tükürük bezleri içinde acinus hücreleri tarafından üretilir, küçük kanallarda toplanır ve daha sonra ağız boşluğuna salınır [1]. Tükürük hormonlar, antikorlar, büyüme faktörleri, enzimler, mikroplar ve serum ürünlerini (maddelerini) içermektedir. Tükürük mikrobiyotası, farklı oral yüzeylerden dökülen bakterilerden oluşur ve içerisinde mililitrede 100 milyondan fazla bakteri içerir [7]. Ayrıca, tükürükte yaklaşık 5500 farklı protein türü mevcuttur. Bu nedenle birçok tespit uygulaması için büyük bir potansiyel göstermektedir [8]. Şekil 1.1'de gösterildiği gibi, birçok biyolojik tanıma bileşeni pasif difüzyon, aktif transport veya ekstrasellüler basınç altında süzme yoluyla kan içinden tükürüğe girmektedir. Bunun için tükürük birçok durumda vücudun fizyolojik fonksiyonunun bir yansıması olarak görülebilmektedir. Fakat kan ile karşılaştırıldığında düşük analit konsantrasyonu bulundurması sebebiyle tükürüğün teşhis amaçlı kullanımında bir sınırlamaya neden olmuştur. Bununla birlikte, oldukça hassas moleküler yöntemler ve nanoteknolojinin ortaya çıkmasıyla, bu sınırlama artık aşılabilmektedir [9].

1.4.1 Tespit Ortamı Olarak Tükürüğün Özellikleri

Tükürük, invaziv olmayan, ucuz, hızlı, kullanımı güvenli, nakliyesi ve depolamasının kolay olması gibi çeşitli nedenlerle ve sağlık ile ilişkili biyobelirteçler içermesinden dolayı, tespit ortamı olarak tespit çalışmalarında öncelikli olarak tercih edilir [9].

Özellikle tükürük tabanlı bir hasta başı (point of care(POC)) teşhis sistemi için en önemli gereksinimlerden biri numunenin toplandıktan hemen sonra kullanılmasıdır. Teşhis yapılırken manüel ön analitik işlemden kaçınılması, uygulama süresini azaltılması ve harici ekipmanın kullanılmaması büyük önem arz etmektedir. Tükürüğün avantajları teşhis aracı olarak tablo 1.1'de özetlenmiştir. Tüm bu özellikler tükürüğü bebeklerde, çocuklarda, yetişkinlerde çeşitli biyobelirteçlerin saptanması ve izlenmesi için çekici bir tespit ortamı yapmaktadır [9].



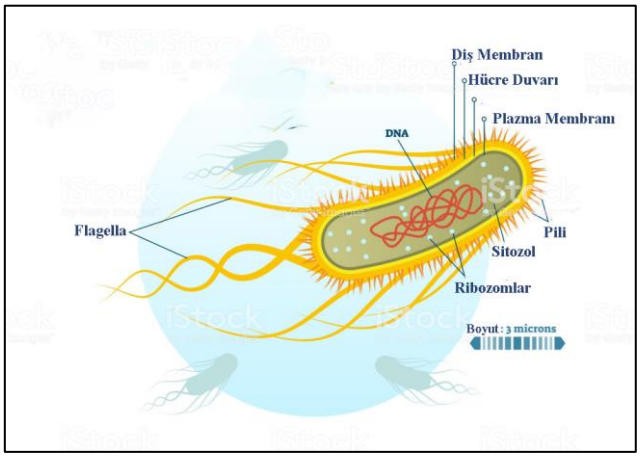
Şekil 1. 1. Şematik diyagram, serum moleküllerinin tükürük içerisine dağılım hareketini göstermektedir [9].

Tablo 1. 1 Tespit ortamı olarak tükürüğün avantajları [9].

NO	Avantajlar
1	Non-invaziv, kullanımı kolay ve ucuzdur.
2	Serum örneklemesinden daha güvenli.
3	Uzman personele ihtiyaç duyulmaması.
4	Numune toplamanın ve taramanın evde yapılabilmesi.
5	Çapraz kontaminasyon riskinin minimum olması.
6	Seruma göre daha ekonomik örnekleme, nakliye ve depolama.
7	Teşhis prosedürleri sırasında serum ile karşılaştırıldığında daha az manipülasyon gerektirmesi.
8	Gerçek zamanlı teşhis.

1.5 *Escherichia coli* Bakterisi

Escherichia coli, enterobacteriaceae ailesinin bir üyesidir ve illüstrasyonu şekil 1. 2'de gösterilmektedir. *E.coli,* insan gastrointestinal sistemindeki yaygın fakültatif anaeroblardan biridir. Ayrıca, *E.coli* gıda kaynaklı salgınlara neden olma kabiliyeti ile de bilinmektedir. Bu bakteri, basit kültür ortamlarında veya yapı maddesi olarak gliserol veya glikozlu sentetik ortamlarda kolayca büyüyen, spor oluşturmayan, gram negatif bir basildir. Ayrıca, *E.coli* peritriköz flagella ile hareket edebilen veya hareket etmeyen fakültatif bir anaerobdur. Diğer biyokimyasal özellikleri arasında indol üretimi, sitrat fermantasyonunun olmaması, pozitif metil kırmızı testi ve negatif üreaz ve Voges – Proskauer reaksiyonları bulunmaktadır. *E.coli* serotipleme şemasına göre üç temel antijen, O (lipopolisakarit), K (kapsüler) ve H (flagellar) ile karakterize edilmektedir. *E.coli*'nin birçok suşu zararsızdır ve hatta bağırsağın zararlı patojenler tarafından kolonileşmesini önlemek de dahil olmak üzere konakçıya sağlık açısından bir çok fayda sağlamaktadır. Bununla birlikte, geniş bir hastalık spektrumuna neden olabilecek patojenik stratejiler geliştiren *E.coli* grupları da vardır. Bu hastalıklara örnek olarak şiddetli ishal hastalığı ve ciddi sekeller verilebilir. Diyarejenik *E.coli*'nin ana kategorilerinin her biri genellikle enterik *E.coli* enfeksiyonlarının patogenezini ve epidemiyolojisini anlamada faydalı olduğu kanıtlanan O:H serotiplerine göre gruplandırılabilmektedir [10].

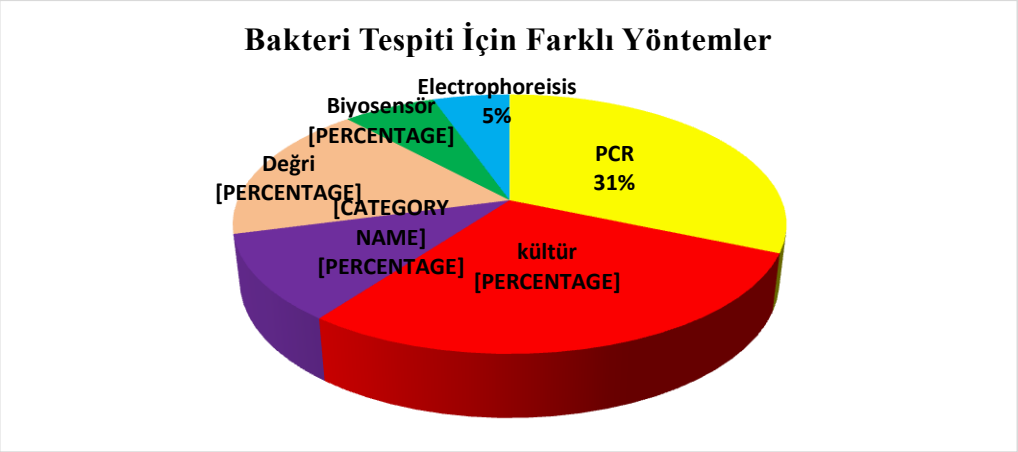


Şekil 1. 2. Escherichia coli bakteri illüstrasyonu [11].

Bu araştırmada, ATCC 25922 *E.coli* bakteri suşu kullanılmıştır. ATCC 25922 suşu, özellikle antikor duyarlılık tahlillerinde kalite kontrol suşu olarak yaygın olarak kullanılmaktadır [10]. Bu *E.coli* bakteri suşu Seattle ve WA'da (1946) toplanan bir insan

klinik örneğinden izole edilmiştir. Ayrıca, *E.coli* bakteri ATCC 25922 suşu O6 serotipine ve birinci biyotipine sahiptir[12].

Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, bakterilerin nicel veya nitel tespiti için farklı analitik teknikler mevcuttur. Bu bölümde bazı teknikler ayrıntılı bir şekilde anlatılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemlerin çoğunun yaygın uygulamalarını önleyecek dezavantajları vardır.



Şekil 1. 3. Bakteri tespiti için farklı yöntemler [13].

1.6 Bakteriyel Tespit Konvansiyonel Yöntemleri.

Bakterilerin nicel ve/veya nitel tespiti için çeşitli yöntemler bulunmaktadır. Bunlar arasında, bakteri kültürü yaygın olarak kullanılan tekniklerden biridir. Ancak birkaç dezavantajı vardır. Ayrıca bakteriyel tespit immünolojik analizler (ELISA) ve nükleik asit amplifikasyonu (polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)) gibi diğer yöntemlerle de gerçekleştirilmektedir.

1.6.1 Bakteri kültürü

Bakteriyel örneklerin kültürlenmesi, bakteriyel patojenlerin saptanması için en eski ve en yaygın tekniklerden biridir. Tek bir hücre çoğaltarak koloni oluşturmak bakteriyel amplifikasyonu sağlar. Bu yöntemle ilgili temel zorluk, birçok bakterinin kültürlenmesi ve görünür koloniler oluşturması için gereken uzun zamandır. Örneğin; Listeria monocytogenes durumunda bakteri kültürü 7 güne kadar sürebilmektedir. Ek olarak, kültür ortamına ekilen *L. monocytogenes* bakterisi, büyümenin yavaşladığı zaman aralığında sayımı zorlaştırmaktadır. Bakteri kültürü ile ilgili zorluklar nedeniyle, bu

yöntemler, genellikle polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), daha hızlı bir yöntemle birlikte kullanılmaktadır. Bu yöntem (koloni-PCR) kullanarak Salmonella, Listeria, *E.coli* ve Campylobacter bakterileri tespit edilmesidir. Kültüre tabanlı bakteriyel tespit stratejileri için gereken zaman ve emek, alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ve yaygınlaştırılmasına yol açmıştır [13]. ATCC 25922 bakteri suşu, birçok protokolle hem agar hem de sıvı ortamlarında kültür olabilmektedir. Genel olarak, agar ortamı için bir litre saf su içerisinde 40 g *Tryptic Soya Agar* (BD 236950) kullanılmaktadır. Benzer şekilde, sıvı ortamı için bir litre saf su içerisinde 30 g *Tryptic Soy Broth (BD cat 211825)* kullanılmaktadır. Bundan sonra, her iki ortam için bakteri 35 °C'de etüv cihazına yerleştirilmiştir [14].

1.6.2 Enzim-Bağlı- İmmünosorbent Deneyi (ELISA)

Özellikle bakteri tespitinde, ELISA çok çeşitli analitler için biyo-tanımada en baskın tekniklerden biridir. ELISA'nın yürütülmesi, ilgilenilen antijene karşı spesifik bir bağışıklık tepkisine sahip en az bir antikor içermektedir. Antijenin katı substrata bağlanma işlemi, farklı uygulanan protokollere göre gerçekleşebilir. Saptanabilir ajanlar (antijenler), doğrudan spesifik olmayan adsorpsiyon yoluyla veya başka bir antikor tarafından spesifik yakalama yoluyla bir substrat üzerinde immobilize edilebilir. Antijenin immobilizasyonundan sonra yüzey normalde deneyin sonraki aşamalarında spesifik olmayan bağlanma olasılığını azaltmak için bir bloke edici ajan ile kaplanmaktadır. Tercih edilen protokol vasıtasıyla, etiketlenmiş antikor eklendiğinde antijen ile birleştirilmektedir. Daha sonra oluşturan kompleks tespit sinyaline yol açılmaktadır. Etiketli antikor, kovalent yöntemle enzime-bağlı bir antikor veya biyo-konjüge yöntemle ikincil antikor ile saptanabilen bir antikordur.

Farklı enzimler arasında, yabanturpu peroksidaz enzimi (Horseradish Peroxidase (HRP)) ve alkalin fosfataz enzimi (Alkaline Phosphatase (AP)), antikorları etiketlemek için en popüler enzimlerden kullanılmaktadır. Bu enzimler nispeten ucuz ve ticari olarak temin edilebilirken yüksek substrat afinitesi sunmaktadır. Tablo 1. 2'de yaygın uygulanan enzimler hakkında ayrıntılı bilgileri özetlenmektedir. Daha sonra enzimatik reaksiyonu geliştirmek ve sinyal yoğunluğunun ölçülebildiği rengi üretmek için alt tabaka plakaya eklenmektedir. Bu sinyal (çoğu durumda) doğrudan yüzeyde bulunan antijenlerle ilgilidir. Bir enzimle spesifik bir reaksiyonun bir sonucu olarak, substrat

deneyde ilgilenilen analitin nicelleştirilmesi için farklı araçlar sağlanmaktadır. Substrat, enzimle konjuge antikor miktarıyla orantılı olan renkli, flüoresan veya ışıldayan luminesant ölçülebilen bir sonuç vermektedir [15].

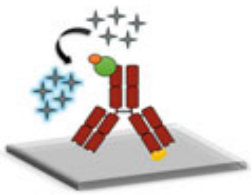
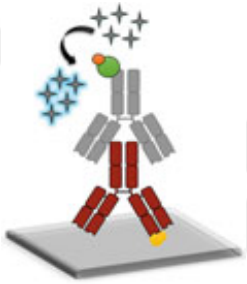
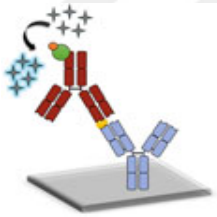
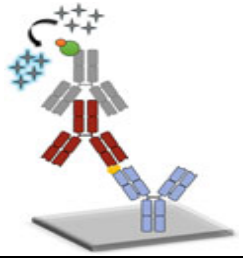
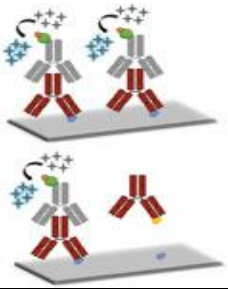
Tablo 1. 2 Yaygın olarak kullanılan enzimler hakkında ayrıntılı bilgiler [15].

Enzimler	**HRP**	**AP**	**ß-D-galaktosidaz**
Molekül Ağırlığı M_W	40,000	86,000	465,000(4 Altbirimler)
Enzim/Antikor Oranı	4:1	2:1–3:1	1:1
Avantajları	- Sterik engel yoktur. - Piyasada kolaylıkla bulunabilir.	- Sinyal güçlendirme yapılabilir. - Yüksek hassasiyet gösterir.	- Alkol varlığında reaksiyon oranı artar. - Hidrofobik membran yüzeylerindeki deneyler için uygundur.
Dezavantajları	- Sodyum azid gibi birçok koruyucu madde ile uyumsuzdur.	- Sterik engel / yüksek doz hook fenomeni. - Kolaylıkla şelatlaştırıcılar, asidik pH (<4.5) ve inorganik fosfatlar ile inaktive olur.	- Antikor kaynaklı inhibisyondan kaybetmiş.
Öneriler	- Steril tampon gerektirmektedir.	- Şelatörlerin kullanımı ve asidik pH reaksiyona müdahale edebilir.	- Çoğunlukla hücreye bağlı ELISA prosedürlerinde kullanılabilir.

1.6.2.1 ELISA'da Farklı Protokoller

Testin amacına, analiz edilen örneklerin tipine ve reaktiflerin saflığına bağlı olarak klinik uygulamada farklı ELISA protokolleri kullanılmaktadır. Bu bölümde, doğrudan, dolaylı, sandviç, çift sandviç ve kompetitif protokoller dahil olmak üzere ELISA deney yapmak için ana protokoller kısaca açıklanmaktadır.

Tablo 1. 3 ELISA protokollerinin ve kullanılan hedef biyomoleküllerin karşılaştırılması [15].

Protokollar	Hedef	Avantajlar	Dezavantajlar
Direkt ELISA 	Ag	- Hızlıdır. - İkincil Ab'yi gerek yoktur. - İkincil antikor ile spesifik olmayan bağlanmayı ortadan kaldırır.	- Yüksek Ag saflığı gerektirir. - Konjuge Birincil Ab yaygın değildir.
İndirekt ELISA 	Ab	- Etiketlenebilir konjuge ikincil Ab bulundurur. - Birincil Ab'nin immüno-reaktivitesinden ödün verilmez. - İkincil Ab birincil Ab'ye çoklu bağlanması tespit sinyalinin amplifikasyonu sağlanabilir.	- Doğrudan protokole kıyasla ekstra bir adım gereklidir. - Spesifik olmayan bağlanma şansı nispeten yüksektir.
Sandviç ELISA 	Ag	- Çok çeşitli hedef biyomoleküllerin tespitinde uygulanabilir. - Uygulanan protokol yüksek özgünlük sağlar.	- Ag yokluğunda, birincil ve ikincil Ab tepki verebilmesi ve yanlış pozitif sinyal üretebilmesi.
Çiftli Sandviç ELISA 	Ag ve Ab	- Çok çeşitli hedef biyomoleküllerin tespitinde uygulanabilir. - Uygulanan protokol diğerlerine göre daha yüksek özgünlük sağlar.	- Uzun ve sıkıcı prosedürler gerektirir.
Rekabetçi ELISA 	Ag	- Test yüksek özgünlük sağlar.	- Yüksek reaktif tüketimi. - Uzun ve sıkıcı prosedürler.

1.6.2.1.1 Direkt ELISA

Direkt ELISA, yıkama ve bloklama aşamalarına bakılmaksızın iki aşamalı bir testtir. İlk adım numunedeki antijenin küvetin yüzeyine bağlanmasıdır. Sonraki aşamada, teste enzim etiketli bir birincil antikor eklenmektedir. Tespit stratejisine göre substrat ve inhibitör ajanlar daha sonra küvete ilave edilir ve son okuma sinyali kaydedilebilmektedir. Bu tip test genellikle numunedeki diğer proteinler katı faz ile etkileşime girebileceğinden testte hata oluşturulmaktadır. Bu nedenle bu tip teste izole edilmiş ve saflaştırılmış antijen (analitler) gerektirmektedir. Birincil antikorların hepsinin enzim etiketli olmasının mümkün olmadığına dikkat edilmelidir.Bu sebepten dolayı bu testte yapılan algılama sınırlıdır [15].

1.6.2.1.2 İndirekt ELISA

İndirekt ELISA yıkama ve bloklama aşamalarını saymadan üç aşamalı bir testtir. İlk adım numunedeki antijenin kuyunun katı yüzeyine bağlanmasıdır. Direkt ve İndirekt ELISA arasındaki fark bir sonraki aşamada, teste etiketli olmayan bir birincil antikor eklenmektedir. Birincil antikor antijen ile bağladıktan sonra birincil antikoru tanıyan enzim-etiketli ikincil bir antikor ilave edilmektedir. Diğer prosedürler aynı şekilde uygulanmaktadır. İndirekt ELISA'da, çok çeşitli ikincil etiketli antikorlara daha fazla erişilebilirlik sunarken testin özgünlüğünü azaltmaktadır [15].

1.6.2.1.3 Sandviç ELISA

Sandviç ELISA testi, adından da anlaşılacağı gibi, birincil ve ikincil antikorlar ilgili analiti aralarına alarak her iki taraftan sarmaktadır. İlk immobilize edilmiş biyomolekülün (birincil antikor) yüksek oranda saflaştırılabilmesi sebebiyle bu strateji testin spesifikliği üzerinde daha iyi bir kontrol imkânı verebilmektedir. Fakat herhangi bir yolla, ilgili analit (antijen) birincil antikor ile etkileşime girmezse, ikincil antikorun birincil antikor ile bağlanması ve yanlış sinyal üretmesi durumu olacaktır [15].

1.6.2.1.4 Çiftli Sandviç ELISA

Çift sandviç ELISA en spesifik ELISA protokolü olarak bilinmektedir. Çift sandviç ELISA'da, ilgilenilen analit (antijen) iki antikor arasında sarılmaktadır. Bu antikorlar farklı konak vücutlarında üretilmektedir. Kullanılan antikorlar birbirlerine bağlanamaz,

bu nedenle spesifik olmayan bağlanma şansı en aza indirilmektedir. Tablo 1. 3'te gösterildiği gibi, immobilize edilmiş bir şekilde verilen antijen ile antikoru ve bir birincil antikor arasında sıkıştırmaktadır. Daha sonra ikincil antikor birincil antikorla birleşir ve tespit sinyali kaydedilebilmektedir. Çift sandviç ELISA test uzun ve sıkıcı prosedürleri olduğuna rağmen ELISA protokoller arasında bu test en güvenli tipidir [15].

1.6.2.1.5 Rekabetçi ELISA

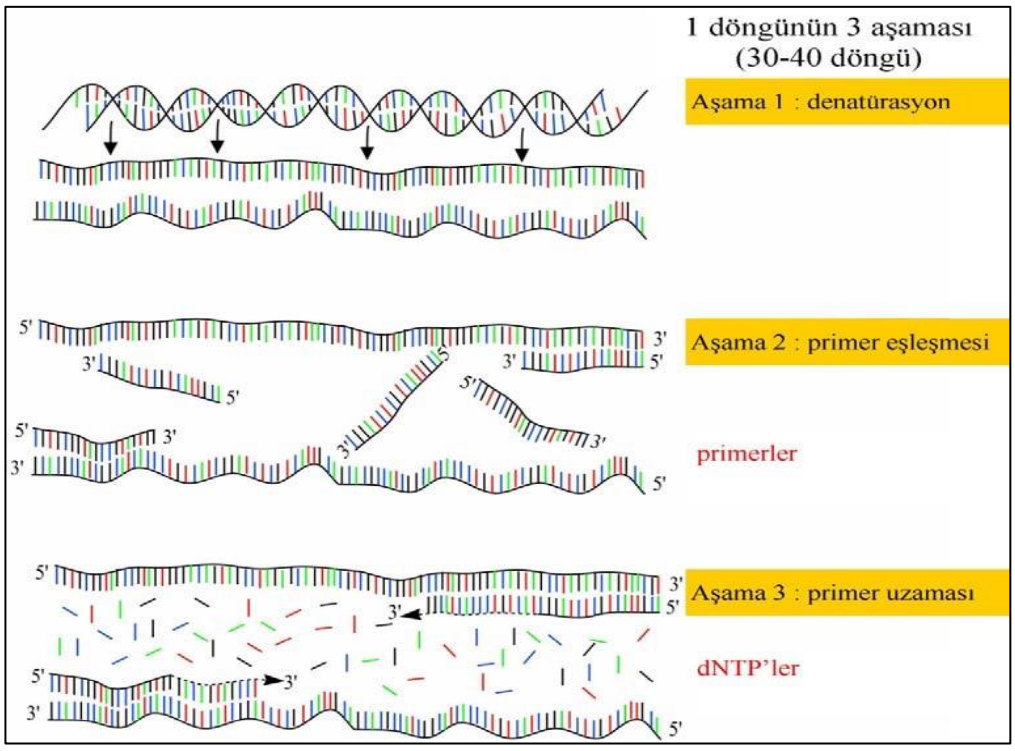
Rekabetçi ELISA, inhibisyon ELISA veya rekabetçi immünoanaliz olarak bilinmektedir. Bu testte sinyal girişiminin saptanmasıyla bir antijenin konsantrasyonunu ölçmektedir. Numunedeki antijenler, belirli bir miktarda etiketlenmiş antikora bağlanmak için referans antijenler ile rekabet etmektedir. Referans antijen, bir plaka yüzeyine önceden kaplanmaktadır. Numune etiketlenmiş bir antikor ile önceden inkübe edilir ve oyuklara ilave edilir. Numunedeki antijenler miktarına göre referans antijenleri bağlamak için duruma göre az veya çok serbest antikorlar bulunacaktır. Bu durum, numunede ne kadar fazla antijen varsa, o kadar az referans antijenin tespit edileceği ve sinyalin zayıflayacağı anlamına gelmektedir. Bazı rekabetçi ELISA protokollerinde, etiketlenmiş antikorlar yerine etiketlenmiş antijenler kullanmaktadır. Etiketlenmiş antijenler ve numune antijenleri (etiketsiz) birincil antikorlara bağlanmak için rekabet etmektedir. Numunedeki antijen miktarı ne kadar düşük olursa, kuyudaki etiketlenmiş antijenlere bağlı sinyal o kadar güçlü olacaktır. Bu protokole göre hazırlanan test uzun, sıkıcı ve büyük miktarda numune tüketmesine rağmen yüksek derecede özgünlük sağlamaktadır [5].

1.6.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Polymerase Chain Reaction (PCR)) DNA'nın laboratuvarda in vitro spesifik enzimatik amplifikasyonunu sağlayan bir araç olarak tanınmaktadır. Polimeraz zincir reaksiyonu belirli bir DNA bölgesini amplifiye edebildiğinden patojen teşhisinde kullanılır. Artan DNA sekanslama verilerinin miktarı sayesinde, her mikroorganizma (mikroorganizma grupları ve alt grupları, vb.) için PCR tahlilleri tasarlamak mümkündür. PCR tahlili yapmak için gereken temel gereksinimler şunlardır:

1. Termal döngüleyici.
2. Nükleik asit şablonu (DNA veya RNA).
3. DNA polimeraz enzimi.
4. Primerler (yani, amplifiye edilen sekansı tamamlayıcı kısa DNA oligonükleotitler).
5. Deoksinükleotid trifosfatlar (dNTP'ler).
6. Tampon (uygun tuzlar dahil).

PCR reaksiyonunda ilk önce çift zincirli sarmal yapıda olan DNA'yı ayırmak için çözeltinin sıcaklığı artırılmaktadır. Bu işleme DNA denatürasyonu denir. Daha sonra, reaksiyon sıcaklığı düşürülmektedir. Böylece primerler tamamlayıcı hedef sekansa birleştirilir. Bu aşamada DNA polimeraz enzimi dNTP'leri birleştirerek serbest 3' hidroksil grubu ucundan primeri uzatmaktadır. Ortam koşulları, hedef amplikasyonun maksimum verimlilik ile elde edilmesini sağlamak için değiştirilebilmektedir. Denatüre etme, tavlama ve uzatma işleminin tamamı, reaksiyonun bir döngüsünü şekil 1.4'te gösterildiği gibi tamamlanmaktadır. PCR reaksiyonunda döngü sayısı genellikle 20-40 döngü yapılmaktadır. Teorik olarak, her döngü tamamlandığında üstel bir amplifikasyon vardır (2^n, burada n = döngü sayısı) [16].



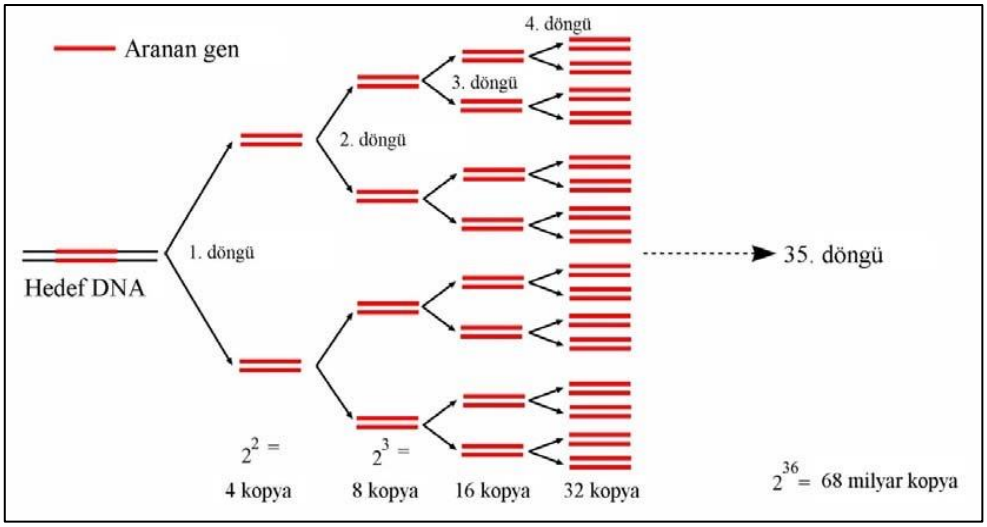
Şekil 1. 4. Polimeraz zincir reaksiyonu prensipleri [17].

Kantitatif qPCR'de (Gerçek Zamanlı PCR), her döngüden sonra flüoresans ölçülmektedir. Bu nedenle fluoresan sinyalinin yoğunluğu, ölçme zamanında numunedeki anlık DNA amplikon miktarını yansıtmaktadır. Başlangıç döngülerinde flüoresans ayırt edilemeyecek kadar düşüktür. qPCR analizleri sadece patojenik mikroorganizma tespiti için değil, aynı zamanda spesifik genlerin, alellerin, ve benzerlerinin varlığını belirlemek için de kullanılmaktadır. Örneğin, suşların ve izolatların tiplendirilmesi, antimikrobiyal direnç profili, toksin üretimi, vb. QPCR'nin ana avantajları, farklı matrislerde hedef DNA dizilerinin hızlı ve yüksek verim tespiti ve nicelleştirilmesini sağlamasıdır. Ayrıca qPCR, çapraz bulaşmalardan kaçınmak açısından daha güvenlidir. Çünkü amplifikasyondan sonra numunelerle daha fazla manipülasyona gerek yoktur. Yaşayan ve ölü hücreler arasında ayrım yapamaması qPCR'nin en önemli dezavantajıdır. Bu nedenle kültür, bakterilerin tespitinde standart olarak kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bulaşıcı hastalık için kritik ve zamanında müdahalenin gerekli olduğu durumlarda, geleneksel, uzun süren ve çok aşamalı kültür teknikleri uygun bir sürede sonuç verememektedir [18].

1.6.3.1 Farklı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR) türleri

1.6.3.1.1 Standart Polimeraz Zincir Reaksiyonu Yöntemi.

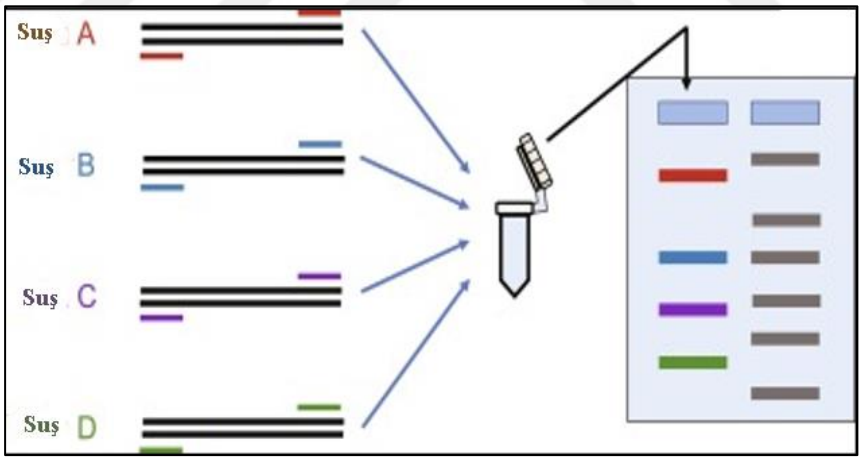
Standart polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), şekil 1.5'te gösterildiği gibi belirli bir DNA sekansının bir veya birkaç kopyasının üstel amplifikasyonu sağlanmaktadır. Bu yöntem en basit PCR yöntemidir ve prensibi yukarıda bahsedilmiştir.



Şekil 1. 5. DNA'nın PCR ile üstel çoğaltılması [17].

1.6.3.1.2 Multipleks Polimeraz Zincir Reaksiyonu

Multipleks PCR'de, farklı hedeflerin amplifikasyonu için tasarlanmış iki veya daha fazla primer seti aynı PCR reaksiyonuna dahil edilmektedir. Bu teknik kullanılarak, bir klinik örnekteki birden fazla hedef sekans tek bir tüpte çoğaltılabilmektedir. Mültipleks reaksiyonlarda kullanılan primerler, benzer tavlama sıcaklıklarına sahip olacak şekilde dikkatle seçilmeli ve birbirini tamamlayıcı olmamalıdır. Ayrıca amplikon boyutları, jel elektroforezi ile görüntülendiğinde farklı bantlar oluşturacak kadar farklı olmalıdır. Multipleks PCR, tek şablonlu PCR veya çok şablonlu PCR reaksiyonunda tasarlanabilmektedir. Tek-şablon PCR reaksiyonunda, bir şablon içindeki belirli bölgeleri çoğaltmak için birkaç primer seti kullanılmaktadır. Çoklu şablon PCR reaksiyonunda, aynı reaksiyon tüpünde birden fazla şablon ve birkaç primer seti kullanılmaktadır (*şekil 1.6*). Multipleks PCR, standart PCR'dan daha karmaşık ve daha az duyarlıdır. Fakat, multipleks PCR bir örnekteki iki, üç veya daha fazla patojeni aynı anda tespit ederek maliyetleri ve zamanı azaltabilmektedir. Ayrıca, multipleks PCR, kısa sürede yüksek maliyetli polimeraz ve şablon tasarrufu sağlayabilmektedir [19].



Şekil 1. 6. Farklı hedeflerin amplifikasyonu [19].

1.6.3.1.3 Ters transkripsiyon PCR

Ters transkripsiyon PCR veya RT-PCR, RNA'nın bir şablon olarak kullanılmasına imkan vermektedir. Ters transkripsiyon PCR'de diğerlerden farklı olarak bir aşama daha ekleyerek RNA'nın saptanmasına ve çoğaltılmasına sağlanmaktadır. RNA, ters transkriptaz kullanılarak ters tamamlayıcı DNA'ya (cDNA) kopyalanmaktadır. RT-PCR'nin ilk aşaması, bir DNA / RNA hibridinin sentezidir. Ters transkriptaz ayrıca

hibridin RNA kısmını parçalayan bir RNaz H fonksiyonuna sahiptir. Tek zincirli DNA molekülü daha sonra ters transkriptazın DNA'ya bağımlı DNA polimeraz aktivitesi ile cDNA'ya tamamlanmaktadır. RNA şablonunun kalitesi ve saflığı RT-PCR'nin başarısı için önemlidir. İlk zincir reaksiyonun verimi amplifikasyon sürecini etkileyebilmektedir. Buradan sonra, cDNA'yı çoğaltmak için standart PCR prosedürü kullanılmaktadır [20]. RT-PCR, RNA virüsü enfeksiyonlarının (örn., İnsan immün yetmezlik virüsü ve hepatit C virüsü ve SARS-coV-2 virüsü) tespitinde ve nicelendirilmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır.

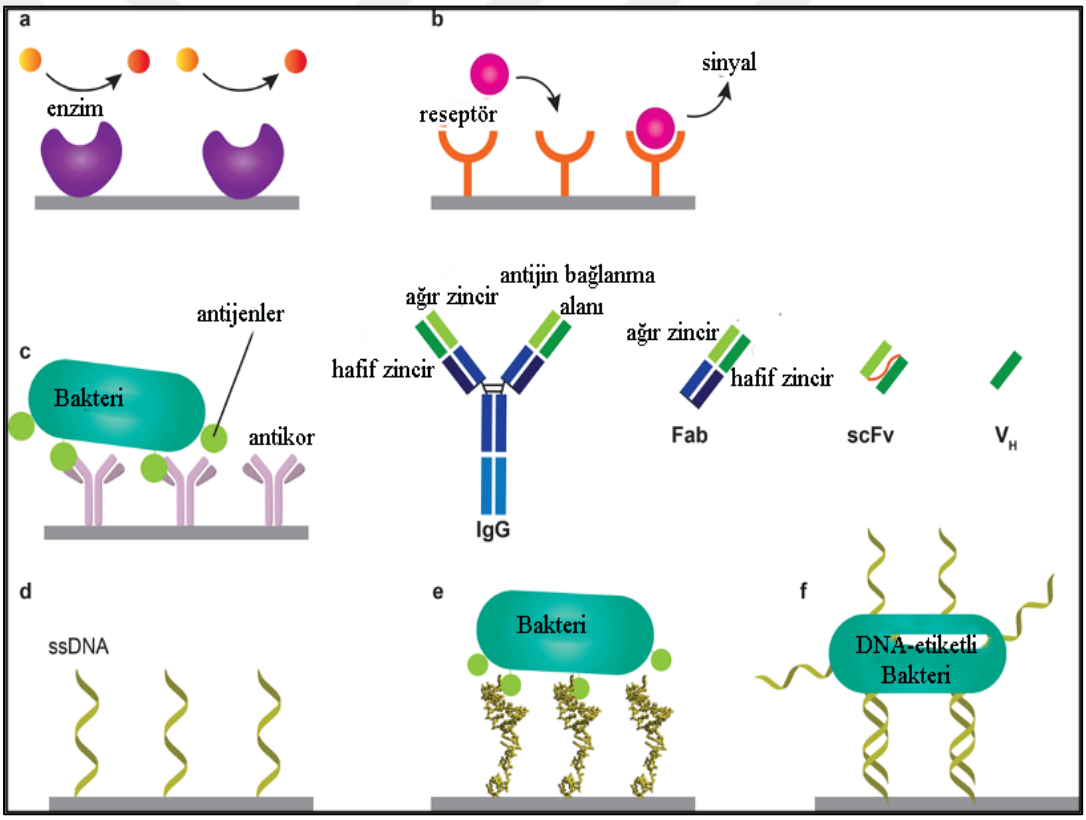
1.6.3.2 PCR ve Bakteri

PCR, kompleks çözeltilerde bakteriyel kontaminasyonu analiz etmek için kullanılmıştır. Atlas ve arkadaşları, sadece 1 fg genetik materyal içeren kompleks su numunelerindeki koliform bakterilerinin spesifik olarak tespit edildiğini bildirmişler. Bu sadece bir ila beş canlı bakteriye karşılık gelmektedir. Ayrıca, canlı hücreleri ile ölü hücreleri birbirinden ayırt etmek için PCR tabanlı yöntemler kullanmak mümkündür. Bununla birlikte, bu ayrım PCR ile zor ve analiz için özel stratejiler gerektirmektedir. Atlas ve arkadaşları tekrar Legionella pneumophila için yaptıkları analizlerle PCR tabanlı tespit yöntemlerinin gücünü göstermişlerdir. Amplifiye edilen DNA sekanslarına dayanarak yaşayabilir hücreler (hem kültüre edilebilir hem de kültüre edilmez hücreler) ve cansız hücreler arasında ayrım yapabilmişlerdir. Multipleks PCR, çeşitli bakteri türlerinin eşzamanlı tespitine uygulanmıştır. Örneğin, Kown ve arkadaşları beş farklı gıda kaynaklı patojenik bakteri tespit eden bir test geliştirmişlerdir [13].

1.7 Bakteriler Algılama için Biyosensörler:

Son yıllarda bakteri direnci daha yaygın hale geldiğinden dolay bakteri enfeksiyonunun önlenmesi ve kontrolü ciddi bir sorun haline gelmiştir. Patojenik mikroorganizmaların hızlı tespiti, tedavi sürecinin en önemli parçalarından biri olmuştur. Hızlı tepki, yüksek hassasiyet ve düşük maliyet gibi bir dizi avantaja sahip olan biyosensörler çok dikkat çekmektedir. Biyosensörler, belirli biyolojik etkileşimleri elektrik sinyallerine dönüştüren entegre cihazlardır. Elde edilen sinyaller biyolojik tepki hakkında analitik bilgi sağlanmaktadır [21]. Biyosensörler, sağlık, gıda kalite yönetimi, eczacılık ve benzeri alanlardaki birçok biyolojik analitin tespiti ve/veya miktarının belirlenmesi için önemli araçlardır [22].

Geleneksel olarak, biyosensörler bir biyolojik tanıma elemanı (Biyoreseptör), dönüştürücü ve elektronik sistemden oluşmaktadır. Elektronik sistem genellikle dönüştürücü ile kombine edilmektedir. Biyosensörler, kullanılan biyo-reseptör veya dönüştürücü türü açısından sınıflandırılabilmektedir. Biyo-reseptörler, biyolojik tanıma için biyokimyasal mekanizmayı kullanan biyolojik moleküler türlerdir. Bunlar dönüştürücü tarafından ölçülebilen bir sinyal üretmek için ilgili analitlerin bağlanmasını sağlanmaktadır. Kullanılan biyoreseptör tipine göre, biyosensörler şekil 1.7'de gösterildiği gibi nükleik asit / DNA, enzimler, antikor-antijen ve tüm hücreler ayrılabilmektedir. Ayrıca, kullanılan transdüser tipine bağlı olarak, biyosensörler, piezoelektrik, elektrokimyasal ve benzeri olarak belirlenebilmektedir [23].



Şekil 1. 7. Biyolojik tanıma elemanları (Biyoreseptör). (a) Enzimler, kullanılabilen moleküllerin kimyasal dönüşümünden sorumlu proteinler ve algılama yöntemi olarak kullanılmaktadır. (b) Reseptörler, belirli hedefleri bağlayan ve sinyale neden olan proteinlerdir. (c) Antikorlar, hedefleri için özellikle yüksek spesifisiteye sahip büyük glikopeptitlerdir. Antikor fragmanları, tam polipeptidin tanıma yeteneklerini koruyan daha küçük kısımlarıdır. IgG = immünoglobulin G; Fab = antijen bağlayıcı fragman; scFv = tek zincirli değişken fragman; vH = tek bölgeli antikor fragmanı. (d) Tek zincirli DNA (ssDNA), (e) bir hedefe bağlanmak için bir 3D konformasyonu benimseyebilir veya (f) sekans tamamlayıcısı ile hibridize olmak için kendini tanıyabilmektedir [24].

1.7.1 Bakteriyel Algılama için Optik Biyosensörler.

Optik biyosensörler en yaygın biyosensör tipidir.Optik biyosensörler yüksek hassasiyet ve seçicilik avantajlarına sahiptir. Absorbsiyon, refraksiyon, refleksiyon, dispersiyon, polarizasyon, kemilüminesans, floresan gibi birçok sinyale dayanarak hassas algılama sağlanabilmektedir. Burada bakteriyel tespitte en çok kullanılan optik biyosensörler için kısa bir sınıflandırma ve çalışma prensipleri sunulmaktadır.

1.7.1.1 Floresan Optik Biyosensörler

Floresan optik biyosensörler, optik biyosensörler arasında en popüler tespit yöntemidir. Floresan maddenin valans elektronu yeterli ışık enerjisini absorbe ettiğinde elektronun temel enerji düzeyinden daha yüksek enerji katmanına taşıyarak uyarılmış hale gelmesine neden olmaktadır. Floresan olayı elektronun temel enerji düzeyine geri döndüğünde meydana gelmektedir. Bu özellik kullanılarak moleküler reaksiyon, floresan maddenin reaktanlarla birleştirilmesiyle uygun şekilde izlenebilmektedir. Floresan teknolojisi izlenen numunelerin algılanmasına yüksek hassasiyeti sağlayabilmektedir. Ayrıca diğer avantajları hem daha hızlı tepki süresine hem de çok renkli boyalarla senkronize olarak etiketleme özelliğine sahip olmasıdır. Bu avantajlar sayesinde karmaşık örneklerde çeşitli patojenlerin kısa sürede eşzamanlı olarak tespit edilmesini mümkün kılmaktadır. Etiketleme reaktifi floresan biyosensörlerin anahtarıdır. Popüler biyobelirteçler organik boyaları, elementleri ve benzerlerini içermektedir [21].

Organik boya örnekleri olarak, Ignacio ve arkadaşları, içme suyunda *E.coli*'nin saptanması için bir flüoresan yöntemi geliştirmişlerdir. *E.coli* bakterisine bağlanma kabiliyetine sahip üç protein (GFP-Hadrurin, GFP-pb5, GFP-colS4), organik boyalar olarak kullanılmıştır. GFP-colS4 Chimera protein tabanlı biyosensör güzel stabilite ve bağlanma parametreleri göstermiştir. Sadece 8 dakika içersinde 20 ila 10^3 CFU arasında bir doğrusal aralık ve 20 CFU'luk bir belirleme sınırı ile *E.coli*'nin spesifik olarak saptanmasını gerçekleştirebilmiştir. Bu nedenle, ticari bir algılama yöntemi olarak gelecekteki gelişimi için oldukça ilginç özellikler [25].

Yeni malzemelerin geliştirilmesiyle, CdSe, CdTe, PbS, HgTe, InP, PbSe, PbTe, InAs ve GaAs gibi elementlerden oluşan nicem noktaları (Quantum dots) en popüler floresan

etiketleme malzemelerinden biri haline gelmiştir. Bu malzemenin avantajları, geniş uyarım spektrumlarına ve dar emisyon spektrumlarına sahip olmasıdır. Bu, geleneksel organik boya ile karşılaştırıldığında daha fazla uyarma ışığının seçilebileceği ve floresan algılama sisteminin büyük ölçüde basitleştirilebileceği anlamına gelmektedir. Dar emisyon spektrumları ayrıca daha yüksek algılama derecesi ve floresan yoğunluğu sağlamaktadır. Bu avantajlar sıvı numunelerde patojen tespitinin araştırılmasında iyi bir başlangıç sağlayabilmektedir [21]. Örneğin, Drishya Mohan ve arkadaşları hidrofilik floresan CdSe Kuantum noktaları (CDSe QD'ler) biyosensörünü sentezlemiş ve UV-Vis, IR ve floresan spektroskopisi kullanılarak karakterize etmişlerdir. Hidrofilik CdSe kuantum noktaları 525 nm'de absorbsiyon ve 541 nm'de güçlü bir floresan emisyonu göstermektedir. *E.coli*'yi saptamak için CdSe QD'lerinin seçiciliği, QD'lerin gliserol ile fonksiyonelleştirilmesiyle geliştirilmiştir. Kuantum noktalarının patojenik bakterilerin floresan görüntülemesi için etkili olduğu bulunmuştur [26].

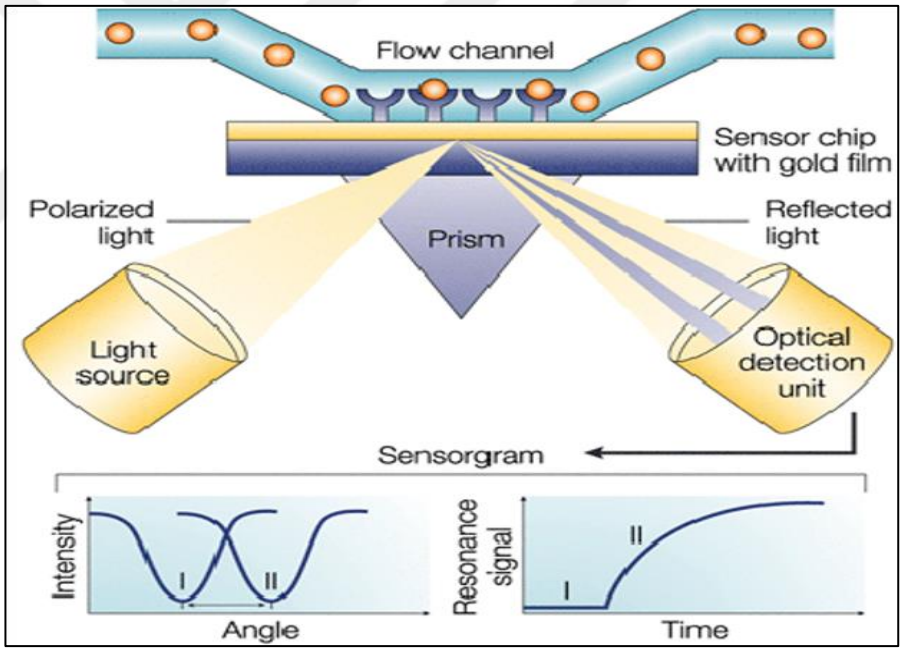
Son zamanlarda, floresan karbon noktaları (CD'ler) benzersiz özelliklere sahip oldukları için oldukça ilgi çekmektedir. Karbon noktaları (CD'ler), boyutları 10 nm'den küçük ayrı yarı küresel parçacıklardır. CD'ler mükemmel flüoresans, basit sentez, düşük toksisite, iyi biyouyumluluk ve düşük maliyetler gibi özelliklere sahiptir. Çok sayıda çalışma CD'lerin sentezini, özelliklerini ve uygulamalarını değerlendirmiştir. Karbon noktalarının (CD) çeşitli alanlarda, özellikle bakteri tespiti için geniş ileriye yönelik uygulamaları vardır. Kunhao Qin ve arkadaşları, *Escherichia coli* BW25133'ten (WT) elde edilmiş yeni bir CD'yi tek adımlı bir hidrotermal yöntemle sentezlemişlerdir. Hem canlı hem de ölü hücrelerin mikrobiyal görüntülenmesi için kullanılabilen CDs-*E.coli* ve CDs-WT'yi geliştirmişler. Ayrıca, hem in vitro hem de in vivo biyo-görüntüleme için floresan proplar olarak kullanılmak üzere CD'lerin-WT'nin biyouyumluluk ve toksik olmayan özelliklerini göstermişler [27].

1.7.1.2 SPR Optik Biyosensörler

Yüzey plazmon rezonans (SPR) analizörleri, biyomolekülerin etkileşimlerinin saptanması ve nicelendirilmesi için güçlü araçlar olarak ortaya çıkmıştır. SPR analizörleri biyomoleküler kompleks oluşumu ve disosiyasyonu dinamiklerinin gerçek zamanlı olarak izlenmesini sağlanmaktadır [28]. SPR teknolojisinin avantajları arasında biyobelirteçlerin gerçek zamanlı izlenmesi, etiketsiz, minimal numune ön işlenmesi,

kantitatif, çok iyi hassasiyet ve tekrarlanabilirlik bulunmaktadır. Bu özellikler SPR'yi hızlı analiz ve çoklu analit saptamanın gerekli olduğu hasta başında test (POC) için uygun hale getirmektedir [29].

Kretschmann geometrisinde şekil 1. 8'te gösterildiği gibi ışık dalgası, ince bir metal tabaka (çoğunlukla 50 nm kalınlığında altın veya gümüş) ile yüksek kırılma prizma birleştiricisi (genelde cam ile yapılmış) arasındaki sınırda tamamen yansıtılmaktadır. Bu ışık metal filmin yüzeyini uyararak yüzey plazmon dalgası (surface plasmon wave (SPW)) üretmektedir. SPW'nin yayılması sensör yüzeyindeki değişikliklere duyarlı olduğundan, kırılma indisinde lokal bir değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik sensör yüzeyi üzerinde immobilize edilmiş analitler ve bioreseptörler arasındaki bağlanma ile ilgilidir [29].



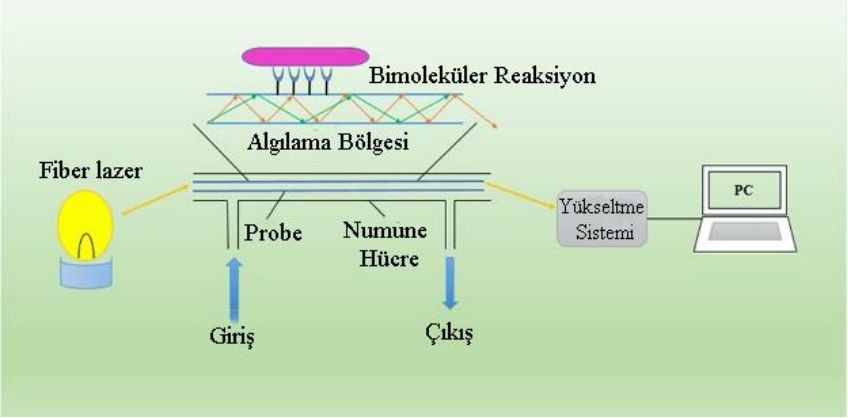
Şekil 1. 8. Yüzey plazmon rezonans (SPR) biyosensörü kavramı. (A) PSP'lerin ATR yönteminin Kretschmann geometrisinde bir polikromatik ışıkla uyarılması. (B) Altın katmandaki kırılma indisinin iki farklı değeri için karakteristik bir SPR daldırma ile yansıyan ışığın spektrumu. (c) Moleküler etkileşimin neden olduğu kırılma indisinin geçici evrimi [30].

SPR biyosensörleri, farmakoloji, patojen tespiti vb. uygulamalarda kullanılmıştır. Gür ve arkadaşları idrar örneğinden hızlı ve hassas *E.coli* tespiti için yeni yüzey baskılı amin modifiye AuNP tabanlı SPR nanosensörü geliştirmişlerdir. Tüm hücre immobilize edilmesinin stratejisi, pahalı ve zor elde eden tanıma elemanları kullanmadan analitin saptanmasını sağlama imkân vermektedir. Bu nano-ölçek algılama sistemi *E.coli*'ye

karşı yüksek bir afinite göstermiştir. *E.coli* ve biyosensör yüzeyi üzerindeki iyonlar arasındaki biyolojik etkileşim kırılma indisi değişimine neden olmaktadır. SPR kaymaları kırılma indisi değişiminin bir sonucu olarak değişmektedir. AuNP'lerin lokalize plazmonu ve yüzey plazmon dalga bileşim nedeniyle SPR kaymaları amplifiye edilmiştir. Bu *E.coli* bakteri tespiti duyarlılık artılması ve daha düşük bir LOD değeri (1 cfu/mL) sağlanmıştır. Yapay idrar örneği gibi karmaşık bir ortamda bile *E.coli*'nin saptanması, bu gelişmiş sistemi ile gerçekleştirilmiştir [31].

1.7.1.3 Fiber Optik Biyosensör

Fiber optik biyosensör, başka bir yaygın optik biyosensördür. Biyolojik türlerin (hücreler, proteinler, DNA, vb.) saptanması için optik alanda kullanılan fiberlerden elde edilmiş bir cihazdır. Fiber-optik biyosensörün diğer floresans biyosensörlerinden farkı ışığı iletmek için fiber kullanmasıdır. Fiber-optik biyosensörde, uyarıcı lazer ışığı konik fiberin yakın olan tarafına sokulmaktadır. Toplam iç yansıma dizilerinden sonra, şekil 1.9'da gösterildiği gibi ışık fiber boyunca uzak tarafa iletilerek tespit yüzeyine ulaşmaktadır. Fiber optik biyosensör ayrıca hassas filmde meydana gelen moleküler reaksiyonu yansıtmak için kırılma indisi, absorpsiyon, floresan ve yüzey plazmon rezonansındaki değişiklikler gibi çeşitli optik transdüksiyon mekanizmalarını kullanabilmektedir. Bu avantajlar nedeniyle, fiber optik biyosensörler protein ve DNA'nın çoğu tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğu floresan biyosensörü gibi fiber optik sensörlerde de eksiklik vardır. Çünkü floresan moleküllerin ömrü sınırlıdır. Bu nedenle, doğru bir yorum elde etmek için daha hızlı tepki süresine sahip bir algılama sistemine ihtiyaç duymaktadır [21].



Şekil 1. 9. Fiber-optik biyosensörlerin şematik gösterimi [21].

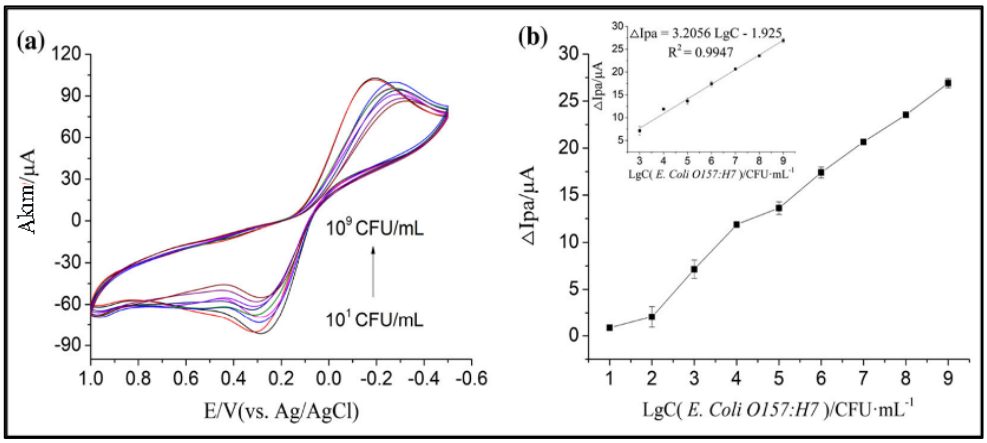
1.7.2 Bakteriyel Algılama için Elektrokimyasal Biyosensörler.

Elektrokimyasal biyosensörler, spesifik biyolojik etkileşimleri elektrik sinyallerine dönüştürerek analitik bilgileri sağlayan entegre cihazlardır [24]. Basit yapı, yüksek hassasiyet, düşük maliyet ve hızlı tepki avantajlarıyla, elektrokimyasal biyosensörler biyosensörlerin karakterlerini mükemmel bir şekilde göstermektedir. Gerçek zamanlı olarak test edilen mikroorganizmalar için en umut verici teknoloji olarak kabul edilebilmektedir [21].

1.7.2.1 Voltametrik Biyosensörler

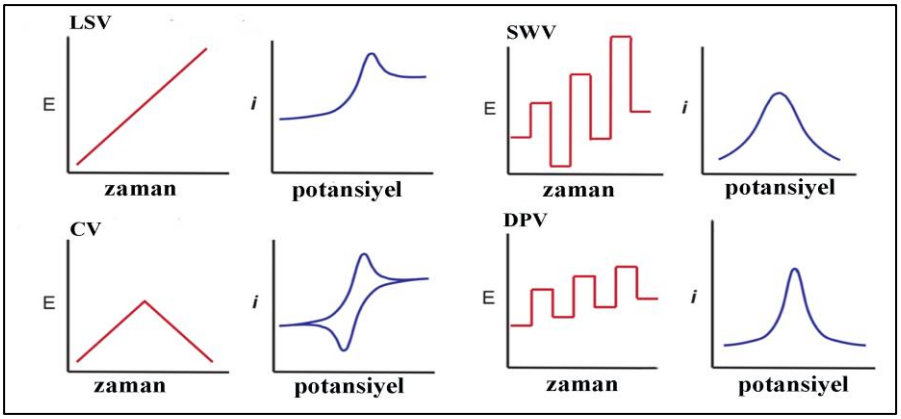
Voltametrik sensörler, hem potansiyel hem de akımın ölçülmesinden kaynaklanan çok yönlülüğü nedeniyle en yaygın biyosensör türüdür. Ayrıca, gerilim (E), akım (i), yük (Q) ve zaman (t) gibi çeşitli parametreleri analiz edebilmektedir. İlgilenilen türlerin yükseltgenme-indirgenme potansiyeli ve konsantrasyonu hakkında bilgileri bu teknik ile elde edilebilmektedir. En yaygın voltametrik teknikler, elektroda uygulanan potansiyel değiştikçe üretilen akımdaki değişiklikleri ölçmektedir. Temelde iki teknik bulunur. Bunlar doğrusal tarama voltametrisi (Linear Sweep Voltammetry (LSV)) ve döngüsel voltametri (Cyclic Voltammetry (CV))'dır. LSV'de potansiyel, akım çıkışı ölçülürken sabit bir oranda değişmektedir. CV ise LSV'ye benzer, ancak potansiyel hem pozitif hem de negatif yönde değişmektedir. CV ile çoklu döngüler mümkün olduğundan ürünlerin stabilitesini izlemek ve reaksiyon aralarını incelemek için tercih edilmektedir [13].

Döngüsel voltametri (CV), patojenlerin kantitatif olarak tespiti ve elektrokimyasal sensörlerin karakterizasyonu için kullanılabilmektedir. Örneğin, Huang ve arkadaşları, *E.coli* O157: H7'nin doğrudan tespiti için etiketsiz altın nanoparçacıkları modifiye serigrafi karbon elektrotlar geliştirmiştir. Şekil 1. 10'da gösterildiği gibi *Escherichia coli* O157: H7'nin kantitatif tespiti için döngüsel voltametri (CV) kullanmıştır. Bu elektrokimyasal immünosensör, 10^3-10^9 CFU/mL ve 5.9 * 10^2 CFU/mL LOD tespit aralığına sahiptir [32].



Şekil 1. 10. Döngüsel voltametri (CV) örnek sonuçları. (a) 10^1 CFU/mL ila 10^9 CFU/mL arasında farklı konsantrasyonlarda *E.coli* O157: H7'nin CV sonuçları. (b) İmmünoanaliz kalibrasyon eğrileri. Yükseltgenme tepe akım değişikliği (DIpa) ile *E.coli O157: H7* konsantrasyonlarının logaritması arasındaki doğrusal ilişki de eklenmiştir [32].

Diferansiyel puls voltametrisi (Differential Pulse Voltammetry (DPV)) en basit puls tekniklerinden biridir. Bu teknikte potansiyel bir pencereyi taramak için tanımlanmış bir genliğe (genellikle 10 ila 100 mV arasında) sahip bir dizi puls uygulanmaktadır. Bu işlem şarj (faradik olmayan) akımı sonuçtaki ölçümden kaldırmaktadır. Akım pulsun uygulanmasından önce ve sonra ölçülür ve bu ölçümler arasındaki fark temel potansiyelin bir fonksiyonu olarak kaydedilmektedir. Benzer bir teknik kare dalga voltametridir (square-wave voltammetry (SWV)). SWV'de kare dalga darbesi merdiven potansiyel varyasyonu ile birleştirilmektedir. Safi akım, redoks potansiyelinde merkezlenen ileri ve geri adımlar arasındaki farka göre yer almaktadır. Önemli olarak, SWV ile tepe yüksekliği mevcut elektroaktif türlerin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır [13].



Şekil 1. 11 Elektrokimyasal ölçümler için giriş / çıkış bazı fonksiyonları. E = potansiyel, i = akım ve Q = yük.

1.7.2.2 Potansiyometrik Biyosensörler

Potansiyometri, düşük maliyeti ve ölçüm kolaylığı nedeniyle yaygın olarak kullanılan en eski enstrümantal analitik yöntemlerden biridir. Potansiyometrik biyosensörler, çok yüksek empedansta bir çözeltinin elektrik potansiyelini neredeyse hiç akım akışı olmadan izlemektedir [13]. Polimerik membran iyon seçici elektrotlara (ISE) dayanan potansiyometri, fizyolojik testler için rutin olarak uygulanan iyi kurulmuş bir analitik teknolojidir. Potansiyometrik sensörler, küçük boyut, hızlı tepki, kullanım kolaylığı, düşük maliyet ve bulanık girişimlere karşı dirençli avantajlar göstermektedir [33].

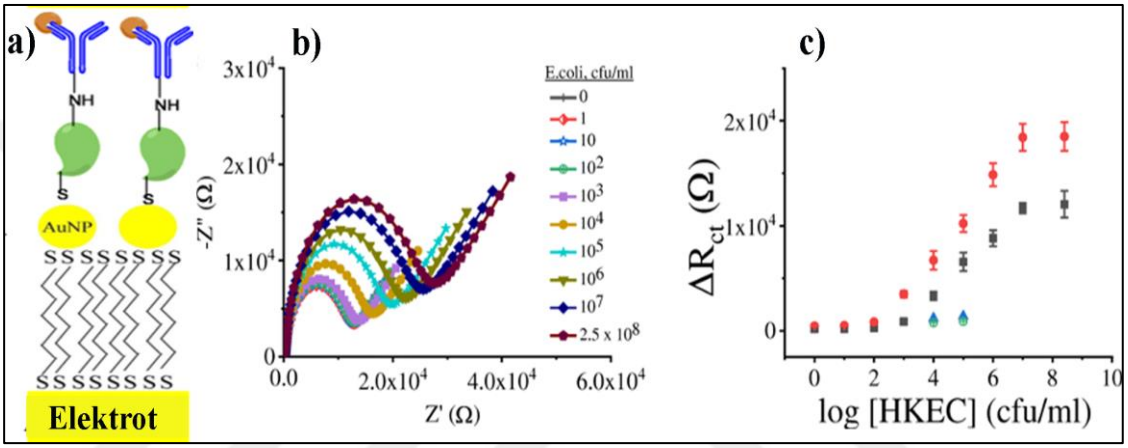
ISE tabanlı potansiyometri, antikorlar, aptamerler ve antimikrobiyal peptitler dahil olmak üzere biyo-tanıma elemanları kullanılarak bakterilerin belirlenmesi için umut verici bir araçtır. Aptamerin jenerik ve modüler yapısı nedeniyle, çok yönlü aptasensörler, spesifik bağlayıcı aptamerin seçilebildiği çok çeşitli bakteri türlerini tespit etmek için tasarlanmıştır. Bununla birlikte, bu teknik tipik olarak aptamer etiketleme ve immobilizasyon gerektirmektedir. Bu süreçler sadece ekstra zaman ve maliyet değil, aynı zamanda bakteriler ve aptamerler arasındaki bağlanma afinitelerini de etkileyebilmektedir [33].

1.7.2.3 Empedimetrik Biyosensörler

Güvenli ve tekrarlanabilen olan empedans tabanlı biyosensör popüler elektrokimyasal biyosensörlerden biridir. Empedans biyosensörleri, elektrot yüzeyindeki biyomolekül reaksiyonuna bağlı empedans değerindeki değişikliği kaydederek analiti tespit edebilmektedir. Birçok impedimetrik biyosensör tipi vardır, ancak elde edilebilecek bilgi miktarı nedeniyle elektrokimyasal empedans spektroskopisi (Electrochemical impedance spectroscopy (EIS)), en yaygın impedimetrik analiz yöntemlerinden biridir [13].

EIS'in temel prensibi, geniş bir frekans aralığında bir elektrokimyasal sisteme küçük genlikli sinüs dalgasını uygulamaktır. Sonra dedektör, yanıt sinyallerini frekansların bir fonksiyonu olarak ölçebilir. Böylece elektrotların reaksiyon yüzeyine bağlanan bakteriler, akımı önlenecek ve empedans artacaktır. Bu nedenle, bakterilerin saptanması açısından EIS güvenli bir yöntemdir [21].

Donghai Lin ve arkadaşları, *E.coli* O157: H7'nin tespiti için bir ultrasensitif impedimetrik biyosensör geliştirmişler. Ayrıca, yüksek derecede yönlendirilmiş antikor tabakası oluşturmak için altın nanopartiküller ve tiolatlanmış protein G kullanmışlardır. Kullanılan empedans tabanlı biyosensör katmanlarının yapısı, HKEC'ye yüksek afinite ve yüksek EIS performansı sağlanmaktadır. Bu biyosensör ile bakteriler, geniş bir konsantrasyon aralığı (> 10^5) ve klinik olarak anlamlı bir saptama limiti (48 cfu mL^{-1}) üzerinden tespit edilebilmektedir [34].



Şekil 1. 12 EIS sensör tasarımının şematik ve sonuçlar gösterimleri. (a) Şema AuNP modifiye edilmiş elektrot (HKEC = ısı ile öldürülmüş *E.coli* O157: H7) kullanılarak sensör tasarımının şematik gösterimleri. (b) Farklı konsantrasyonlarda HKEC ile 2 saatlik inkübasyondan sonra Au / PrG / Ab sensörünün Nyquist grafikleri. (c) Au / PrG / Ab (kare) ve AuNP ile modifiye edilmiş Au / 1,6-HDT / PrG / Ab (daire) elektrotlarının ΔRct kalibrasyonu, konsantrasyon logaritmasına karşı (n = 3) [34].

Interdigital dizi mikroelektrot (IDAM) empedans biyosensöründe önemli bir rol oynayan bir elektrottur. IDAM empedans biyosensörü ve diğer biyosensörler arasındaki fark, IDAM'ın bir çift mikroşerit elektrot dizisinden oluşmasıdır. Her dizi, paralel olarak mikrometreler genişliğinde ve aralığında olan çok sayıda parmak elektrotundan oluşmaktadır. Elektrotlar, birbirine kenetlenmiş bir elektrot dizisi oluşturmak için birbirleriyle birleştirilmektedir. Fakat IDAM'ın immobilizasyon teknolojisi hala tam olarak gelişmiş değildir. Bu da düşük bir yakalama oranına yol açmaktadır. İkinci olarak, elektrot üzerinde immobilize edilen antijen veya antikorun temizlenmesi kolay değildir. Bu birkaç tekrarlanan test sıklığına ve daha yüksek maliyetlere neden olabilmektedir. Dastider ve arkadaşları IDAM tabanlı empedans biyosensörü kullanarak *Escherichia coli* O157: H7'yi tespit etmeye çalışmışlardır. IDEA empedans biyosensörü geliştirmek için dielektroforez dielektroforez uygulayarak *Escherichia coli O157: H7*

tespit kabiliyetini artırılmıştır. Yapılan çalışmada, daha önce bildirilen tespit sınırından 10 kat daha iyi sonuçlar elde edilmiştir.

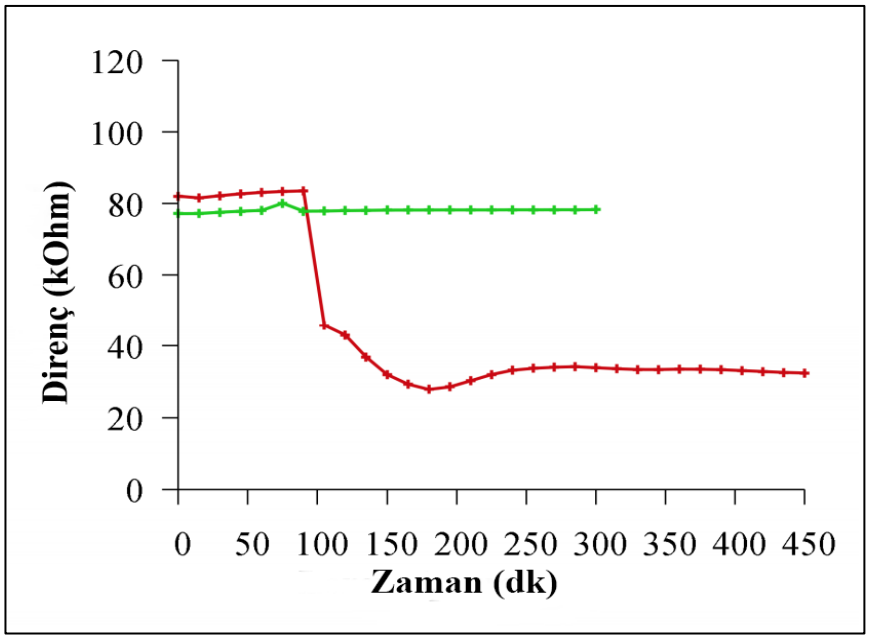
1.7.2.4 Kondüktometrik Biyosensörler

Kondüktometrik biyosensörler, yüklü ürünlerle bir enzimatik veya kimyasal reaksiyonun ilerlemesi ile üretilen bir numune çözeltisinin elektriksel iletkenliğindeki değişiklikleri ölçmektedir [13]. Diğer biyosensör transdüser tipleri ile karşılaştırıldığında, iletken ince film standart teknolojisi ile kondüktometrik biyosensörler üretilmektedir. Kondüktometrik biyosensörlerde referans elektrot gerekli değildir. Bu nedenle, özellikle gaz sensörleri olmak üzere birçok alana uygulanan kondüktometrik biyosensörler bulunmaktadır. Ancak, kondüktometrik biyosensörler, sıvı numunelerde belirli bir iletkenlik oluşturduğu için bu durum bir eksiklik olarak kabul edilmektedir. Çünkü iyonik sıvı numunelerinde analiz yapılırken düşük seçiciliğe neden olmaktadır. Bu durum, kondüktometrik biyosensörlerin klinik mikrobiyolojik tespit alanında nadiren uygulamalarının nedenlerinden biri olmaktadır. Bununla birlikte, bizim için referans sunabilecek bazı örnekler hala vardır. Ichi ve arkadaşları gram-negatif bakterilerin hızlı ve hassas tespiti için kondüktometrik immünosensörler geliştirmek üzere anti-LPS antikorları ile birleştirilmiş manyetik nanopartiküller kullanılmışlardır. Bu yaklaşım sadece *Escherichia coli* veya Serratia'yı başarılı bir şekilde saptamakla kalmaz, aynı zamanda standart immünoblot yöntemleri kullanılarak saptanamayan Pseudomonas aeruginosa ve Acinetobacter baumannii suşlarının doğrudan saptanmasına da sağlamaktadır [21].

1.7.3 Bakteriyel Algılama için Piezoelektrik Biyosensörler

Son yıllarda, biyolojik olanlar da dahil olmak üzere sıvıların farklı özelliklerinin araştırılması için piezoelektrik sensörlerin geliştirilmesi bağlamında piezoelektrik rezonatörlere özel önem verilmiştir. Piezoelektrik biyosensörler, afinite etkileşimi izlenmesi prensibi üzerinde çalışan bir grup analitik cihazdır. Bir piezoelektrik platform veya piezoelektrik kristal, bu yüzeye bağlı kütle nedeniyle salınımların değişimi prensibi üzerinde çalışan bir sensör parçasıdır. Kuvars kristal Mikro terazi (QCM) platformu, immünosensör yapısı açısından oldukça popülerdir [35].

Borodina ve arkadaşları PZT seramik rezonatörüne tabanlı mikrobiyal hücrelerin analizi için bir sensör geliştirmişlerdir. Rezonatörün elektriksel empedansı, 50–300 kHz frekans aralığında sadece üç frekans (68.7, 97.8 ve 264 kHz) değeri için tespit sağlanabilmektedir. Mikrobiyal hücrelerin antikorlar, bakteriyofajlar ve mini antikorlar ile spesifik etkileşimlerini bu sensör kullanılarak doğrudan süspansiyonda kaydederek saptanması ve tanımlanması olasılığı gösterilmiştir. Mikrobiyal hücrelerin spesifik ve spesifik olmayan reaktiflerle etkileşimi işlemi Şekil 1.11'de açıkça görülebilmektedir. Şekil 1.11, rezonatör elektrik empedansının (Rmax) reel kısmının maksimum değerinin zaman bağımlılıklarını göstermektedir. Başlangıçta, kaba hücre süspansiyonu verildiğinde sensör okumaları 12 saniyelik aralıklarla alınmıştır. Rmax değerinde herhangi bir değişiklik olmadığı görülmüştür. Daha sonra (100. saniyede), hücre süspansiyonu ile kaba spesifik / spesifik olmayan bir reaktif eklediğinde sensör okumaları tekrar kaydedilmiştir. Spesifik bir etkileşim (kırmızı eğri) durumunda, Rmax değerinin hızlı bir şekilde azaldığı ve daha sonra doygunluk işleminin gerçekleştiği görülmektedir. Spesifik olmayan etkileşim (yeşil eğri) durumunda, sensör parametrelerinde herhangi bir değişiklik olmamıştır [36].



Şekil 1. 13 Spesifik etkileşim sırasında PZT rezonatörünün elektrik empedansının maksimum reel kısmının zamana bağlılıkları "A. brasilense Sp7 hücrelerine özgü antikorlar" (kırmızı çizgi) ve spesifik olmayan etkileşim "E.coli XL-1 hücreleri-spesifik olmayan antikorlar" (yeşil çizgi) 68.7 kHz yakınındaki rezonans pik noktasında [36].

1.8 Günümüzdeki tespit sistemlerinin değerlendirilmesi

Tablo 1. 4 Günümüzdeki kullanılan *E.coli* tespit sistemlerinin karşılaştırılması.

Yöntem	Ortam	Hassasiyet	Avantajlar	Dezavantajlar	Ref.
Kültür	-	10 cfu/mL	Ucuzdur	Zaman alır	[37]
PCR	-	12 cfu/mL	Hızlı, özgün ve çok duyarlı.	Pahalı, Fazla manipülasyon gerektirir.	[38]
ELISA	Süt & PBS	1.9×10^3 cfu/mL	Kolay ucuzdur	Etiketli	[39]
EIS	PBS	48 cfu/mL	Etiketsiz	Taşınamaz	[40]
Elektrokimyasal	Süt & salin	5.9×10^2 cfu/mL	Etiketsiz ve Ucuzdur	Düşük hassasiyet	[32]
Fiber optik - SPR	PBS	94 cfu/mL	Duyarlı	Hızlı tepki algılama sistemi gerektirir.	[41]
Floresan	PBS	2.39×10^2 cfu/mL	Duyarlı	Etiketli ve hızlı tepki algılama sistemi gerektirir	[42]

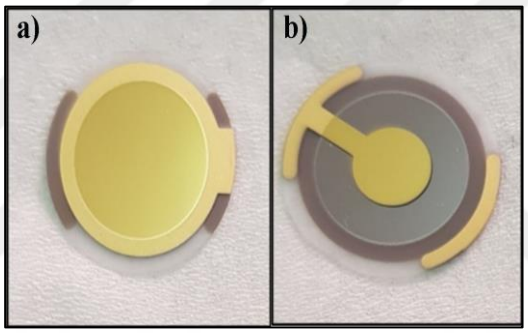
Şimdiye kadar, *E.coli* suşunu tespit etmek için bazı farklı protokoller mevcuttur. Bunların arasında bakteri kültürü ve koloni sayımı temelli yöntemler devam etmektedir. Ancak sonuç vermesi fazla zaman almaktadır. Bu nedenle hızlı bakteri taranmasına ve hasta başı testleri için uygun değildir. Diğer ve sık kullanılan yöntemlerden olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve gerçek zamanlı qPCR ile hızlı ve özgün bir

şekilde *E.coli* tespiti sağlanmaktadır. Bu yöntemler daha duyarlı ve özgündür [3]. Fakat PCR cihazları hem çok pahalı hem de yaygın değildir. Genellikle, bakterilerin serolojik tespiti ELISA ile yapılmaktadır. Bu teknik, PCR'e nazaran gerçekleştirmesi daha kolay ve daha ucuzdur. ELISA özgün olmasına rağmen her kullanılan antikorun etiketlenmesini gerektirmektedir, bu da zaman alıcı ve pahalı olabilmektedir. Ek olarak, belirli antikorlar doğrudan etiketleme için uygun olmamaktadır [9]. Ayrıca, bu yöntemler ile *E.coli* bakterisini tespit edilmesi için uzman personel gerekmektedir. Bu engellerin üstesinden gelebilmek için biyosensörlere tabanlı yöntemler ön plana çıkmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler çoğunlukla ucuz, hızlı ve yerinde tespit edilebilmesine rağmen düşük hassasiyete sahiptir. Fakat, duyarlı Elektrokimyasal biyosensörler olan (ör. elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS)) nispeten pahalı ve kolayca taşınabilir değillerdir. Çoğu floresan biyosensörü ve fiber optik sensörlerde de eksiklikler mevcuttur. Floresan moleküllerin ömrü sınırlıdır; bu nedenle, doğru bir yorum elde etmek için daha hızlı tepki süresine sahip bir algılama sistemine ihtiyaç duymaktadır [21]. Tablo 1. 4'te günümüzdeki kullanılan *E.coli* tespit sistemlerinin karşılaştırılması özetlenmiştir.

1.9 Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM)

Kuartz Kristal Mikrodenge (Quartz Crystal Microbalance (QCM)) tabanlı sensörler ile özellikle sıvı ortamlarda gerçekleştirilen algılama ve tespit yöntemleri için son yıllarda oldukça dikkat çekmektedir. "Microbalance" adı Günter Sauerbrey'e dayanmaktadır [35]. Yukarıda da bahsedildiği üzere QCM sensörünün isminin açılımı Quartz Crystal Microbalance'dır. Buradan anlaşılacağı üzere QCM küçük ("mikro") kütleleri ölçmek için kuartz tabanlı çalışan bir cihazdır. Kuvars rezonatörlerin ana parametreleri zaman ve frekanstır. Bununla birlikte, rezonans frekansı ve rezonans bant genişliği rezonatörün ortamına bağlı olduğundan dolayı plaka frekans tabanlı bir sensör olarak kullanılmaktadır [43]. QCM sensör frekanstaki (Δf) değişiklikler yüzeyde oluşan kütle değişiklikleriyle (Δm) ilgili olduğu için gerçek zamanlı analize ve hızlı gerçekleşen işlemlerin incelenmesine imkân vermektedir. QCM sensör saniyeler veya dakikalar içinde, hassas bir biçimde meydana gelen değişikliklerin algılanmasını sağlar, ancak QCM çok uzun süre gerektiren ölçümlerde de kullanılabilmektedir [44].

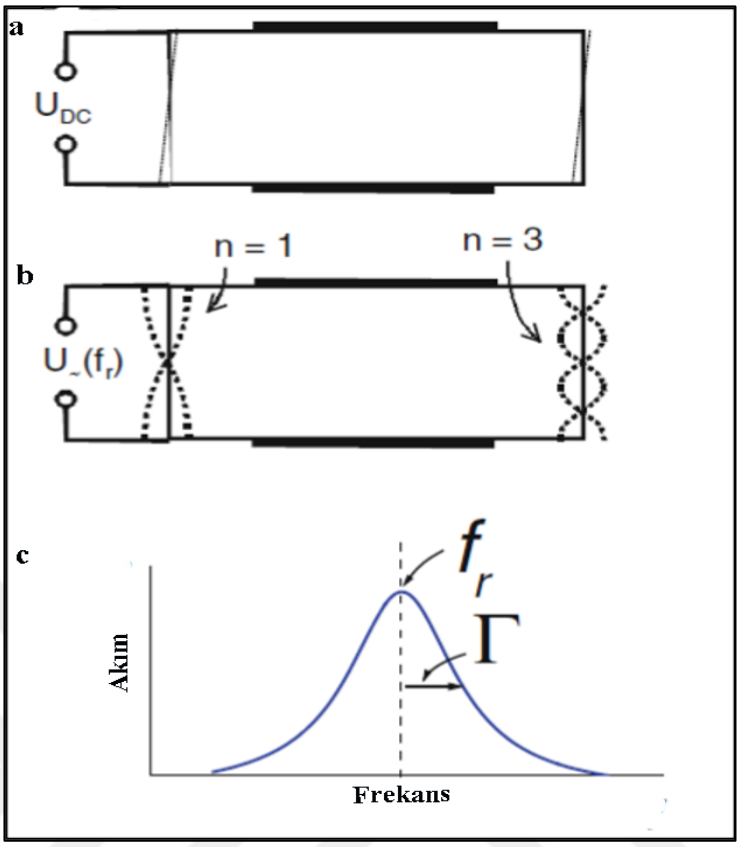
QCM sensörün ortasında, bir kuartz kristali rezonatörü (QCR) bulunmaktadır. Şekil 1.12'de önden (solda) ve arkadan (sağda) alınan algılama için kullanılan kristallerin görüntülerini göstermektedir. Şekil 1.12'de gösterildiği gibi QCM sensörün yapısı şu şekilde anlatılabilir. Esas olarak bir kristal kuartz diskin her iki tarafından altın elektrot bulunmaktadır. Ön elektrot (numuneye maruz kalan) genellikle arka elektrottan daha büyüktür. Bunun için tüm aktif alanın ön elektrot tarafından homojen bir şekilde kaplanmasını sağlamaktadır. QCM sensörün ön elektrodu numune ile etkileşen bir reseptör tabaka (genellikle altın) ile kaplanmaktadır. Bir biyosensör platformu olarak QCM, kolayca üretilmesi ve satın alınabilmesi nedeniyle çok popüler bir araç olmuştur [43].



Şekil 1. 14. Kullanılan altın ile kaplanmış QCM sensör.

1.9.1 QCM Prensibi

Kuvars, genelde metal elektrotlar yoluyla uygun bir voltaj uygulanarak belirli bir frekansta salınacak şekilde yapılabilen piezoelektrik bir malzemedir. Elektrotlara statik bir voltaj uygulandığında, kristal çok az bir kalınlık-kesme deformasyonu ile tepki vermektedir. Ancak, kristal bir AC voltajıyla uyarıldığında ve frekans kalınlık kesme modunun rezonans frekansıyla eşleştiğinde, deplasman modeli rezonatör yüzeyinde antinodları (dalga karnı) olan bir sinüs dalgası ile tepki vermektedir. Rezonatör yüzeyine paralel düğüm düzlemlerinin sayısı (n), overtone (overtone: bir rezonatör temel frekansından daha yüksek herhangi bir rezonans frekansıdır) sırasına eşittir. Şekil 1.13'te gösterildiği gibi noktalı çizgiler rezonatör temel frekansı (n = 1) ve üçüncü tonu (n = 3) karşılanmaktadır. Uyarma frekansı rezonans üstünden gelirse, salınım genlik ve elektrotlar tarafından çekilen akım büyümektedir. Akım-gerilim oranının elektriksel bir ölçüm vasıtasıyla rezonans parametrelerini (en önemlisi, rezonans frekansı, fr ve yarım bant genişliği, Γ) bulabilmektedir [43].



Şekil 1. 15. (a) kuvars kristal elektrotlarına statik bir voltaj uygulandığında, (b) kuvars kristal elektrotlarına bir AC voltajı uygulandığında kuvars, (c) salınım genliği ve elektrotlar tarafından çekilen akım [43].

Standart analitik uygulamalarda, kristal tek başına veya kristal yüzeyindeki elektrot ile etkileşim elektrik darbesi ve salınımların frekansları ölçerek analitin belirlenmesine hizmet edebilmektedir. Şekil 1.14'te gösterildiği gibi kristal yüzey üzerindeki bağlı kütle, salınımın azalmasına neden olmaktadır. Sauerbrey tarafından aşağıdaki gibi ifade edilen yaygın kuvars kristalleri için Δf kayması kristale bağlı kütle değişimi (Δm) ile doğru orantılıdır [45]:

$$\Delta f = -\frac{2\Delta m f_o^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = \quad -2.3 \times 10\text{^}6\, f_o^2 \frac{\Delta m}{A} \qquad 1.1.$$

Burada,

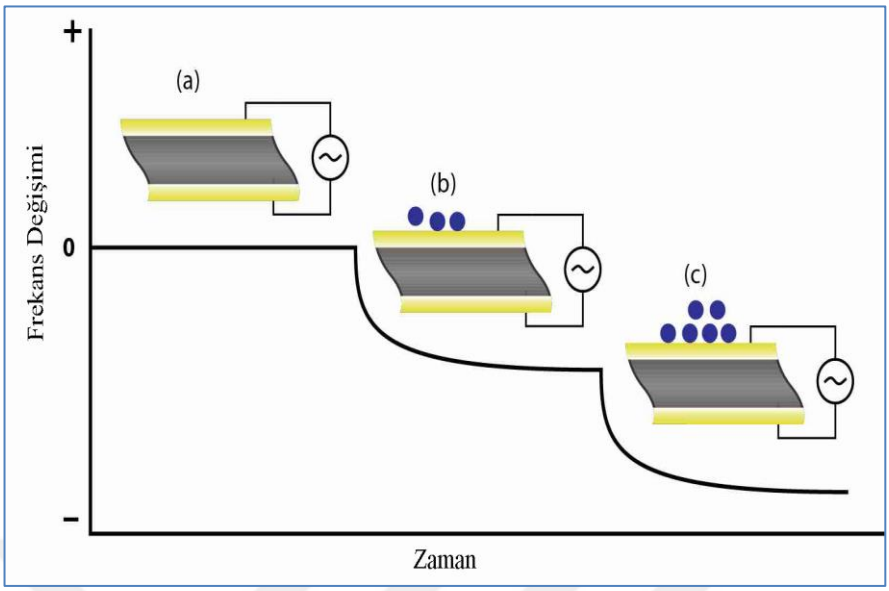
f_0 = kristalin temel resonant frekansı,

m = kristalin elektrotların yüzeyindeki kütlesi,

A = kristalin elektrotların aktif alanı,

ρq = kuartzın yoğunluğu,

μq = kesme modülüdür.



Şekil 1. 16. Sauerbrey bulgularının açıklandığı şematik. Kuvars kristali, uygun voltaj uygulandığında sabit bir frekansta salınır ve moleküller kristal yüzeyi üzerinde birikmeye başladığında salınım frekansı azalmaya başlamaktadır. Böylece, daha fazla molekül biriktikçe frekans daha da azalmaktadır [46].

Sauerbrey denklemi bir kütle ile etkileşimi tam olarak anlatmaktadır. Analitik uygulama için kullanımını sınırlayan dezavantajlar vardır. Çünkü sadece fiziksel etkileşimler değil, aynı zamanda ortam çözeltisinin viskozitesi gibi diğer özelliklerin de frekans kaymasına etkisi olmaktadır. Sauerbrey denklemi, elektrot yüzeyine kararlı bir şekilde tutturulmuş katı, ince bir filmin güvenilir bir açıklamasıdır. Viskozitenin frekans kayması üzerinde etkisinin olması, herhangi bir tahlil sırasında dikkate alınmalıdır. Örneğin, analitin bir organik çözücü içinde çözüldüğü bir numune, belirli bir durumda, su tabanlı tampondan başka bir temel frekansa sahip olacaktır. Farklı viskozitelere sahip numuneler farklı salınım sağlar ve daha sonra kolayca yanlış yorumlanabilmektedir. Sonuç olarak, Kanazawa ve arkadaşları tarafından kuvars kristali için tanımlanan denklem (1.2) dikkate alınmalıdır. Kısa bir açıklamada, denklem frekans kaymasının ortam viskozitesindeki artışla orantılı olduğunu ifade eder:

$$\Delta f = f_0^{3/2} \sqrt{\frac{\Delta(\rho_l \eta_l)}{\pi \rho_q \eta_q}} \qquad 1.2.$$

Burada da,

ρ_l sıvının yoğunluğu,

η_l sıvının viskozitesi, Diğer semboller anlamı Sauerbrey denklemi ile aynıdır.

1.9.2 Biyosensörler olarak QCM platformu

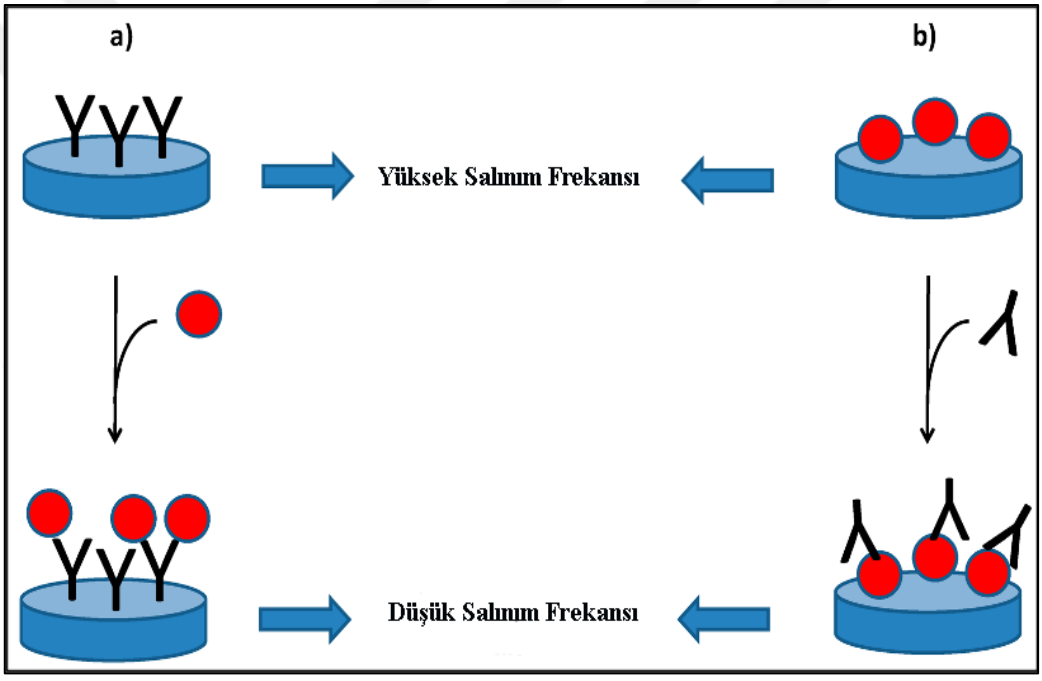
QCM platformu düşük hassasiyete sahip olması, kullanım kolaylığı, spesifikliği, doğrudan cevap vermesi gibi avantajlara sahip olduğundan hastalık teşhisi, ilaç analizlerinde, gaz sensörü olarak ve spesifik molekül tespitlerinde kullanılmaktadır. Yüksek duyarlılığı ve eş zamanlı algılama özelliği ile QCM, birçok uygulamada kullanılabilirlik açısından cazip duruma gelmiştir. QCM platformu, biyosensör çalışmaları için ideal görünmektedir. Herhangi bir spesifik reaktifi uygulamaya gerek kalmadan afinite etkileşimlerini kaydedebilmektedir. Uygulamalar göstermektedir ki; QCM, biyomoleküllerin (proteinler, DNA, antijen/antikor), lipidlerin, makromoleküllerin tespiti için uygun bir tekniktir ve var olan teknikleri tamamlayıcı özelliğe sahiptir [47]. Biyosensör olarak kullanılan bazı QCM uygulamalarının karşılaştırılması tablo1.5'te verilmiştir.

Tablo 1. 5 QCM biyosensörleri tarafından testlerin incelenmesi.

QCM Platformu	**Analit**	**Test Prensibi**	**Tespit Limiti (LOD)**	**Ref.**
10 MHz QCM	*S. aureus*	QCM Immünosensörü ve Demir Nanoparçacıkları	2.59×10^7 CFU	[48]
5 MHz QCM	EGFR Mutasyonu	QCM Genetik Biyosensör	1 nM	[49]
QCM	Klorpirifos (CHL)	MIP'li QCM	3.0×10^{-13} M	[50]
5 MHz QCM	Nükleik Asitler	QCM Genetik Biyosensör ve (AgNC'ler)	0.1 nM	[51]
5 MHz QCM	*Escherichia coli O157:H7*	QCM Immünosensörü ve Grafen Oksit Filmi	5 ng mL^{-1}	[52]
50 MHz kuvars	HIV'den antijen gp120	QCM Immünosensörü	6.5×10^4 virüsler/mL	[53]

1.9.2.1 QCM İmmünosensörleri

QCM immünosensörleri, biyoreseptör olarak antikorlar kullanır ve antikorun spesifikliği, tüm immünosensörün spesifikliğini önemli ölçüde etkilemektedir. Genel bir ifade ile, bir QCM immünosensörü, kullanılan antikor spesifik olduğunda ve elektrot spesifik olmayan reaksiyonlara duyarlı olmayacağı zaman spesifiktir. Yine de QCM immünosensörleri tipik olarak immobilize edilmiş antikorlar içerir ve antijenleri tanıyabilirler. Ayrıca bunun tersi de mümkündür. Bu nedenle immobilize edilmiş bir antijene sahip QCM immünosensörleri, bulaşıcı hastalıkların teşhisi için uygun bir araçtır. QCM immünosensörlerinin prensibi şekil 1.15'te gösterilmektedir [54].

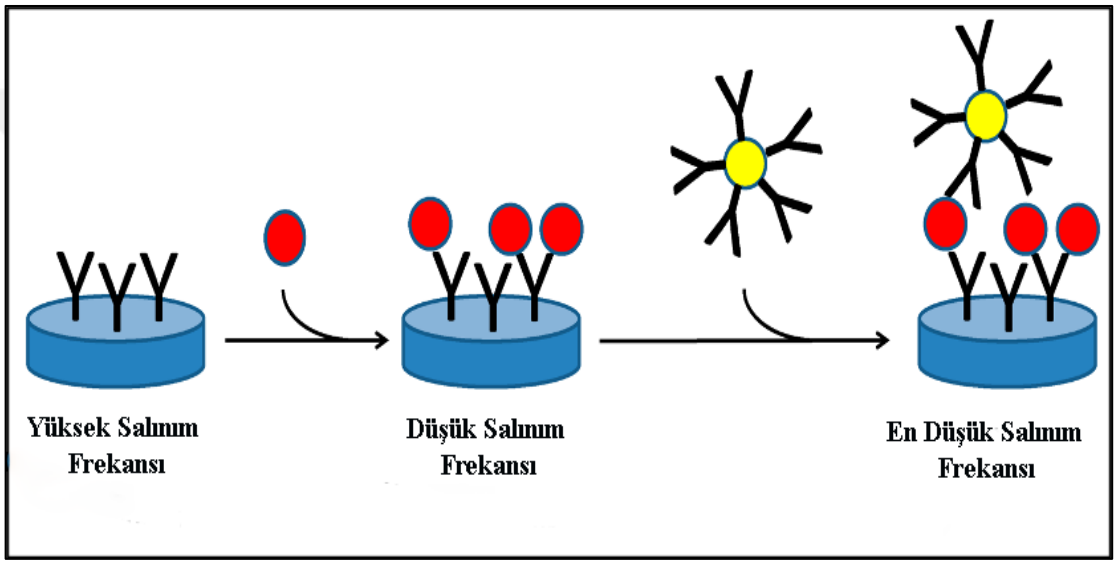


Şekil 1. 17. QCM İmmünosensörleri prensibi. Bir antijen (a) veya bir antikorun (b) belirlenmesi için QCM immünosensörleri. QCM sensörü mavi disk olarak gösterilmektedir. Antikorlar, yaygın immünoglobulinlerin tipik görünümü nedeniyle Y harfi gibi şekillendirilmektedir; bir antijen kırmızı bir top olarak çizilmektedir [54].

Kuvars kristal Mikrodengesi (QCM) platformu, immünosensör yapısı açısından oldukça popülerdir. QCM immünosensörleri, yüksek molekül ağırlıklı analitler için uygundur, çünkü salınım frekansında daha yüksek düşüşe neden olmaktadır. Aynı zamanda QCM platformu üzerinde immobilize edilmiş antikorlar tarafından düşük molekül ağırlıklı analitlerin doğrudan tanınması biraz karmaşıktır. QCM immünosensörleri geliştirilmesi için analite karşı diğer nanoparçacıklar bağlanan antikorlar tarafından uygulanmasıyla

sağlanabilmektedir. Bu da sensör yüzeyi üzerindeki kütleyi arttırmaktadır. Bu fikrin prensibi şekil 1.16'da gösterilmektedir [54].

Bu kavram kullanarak Guo ve arkadaşları QCM immünosensörü ile *Escherichia coli O157:H7*'yi tespit etmek için sinyal amplifikatörü olarak antikor fonksiyonel altın nanoparçacıkları kullanmışlardır. Ayrıca, modifiye edilmiş nanoparçacıklar kullanılarak sinyalin amplifikasyonu manyetik alana dayanabilir; çünkü manyetik nanoparçacıklar yüksek kütle yoğunluğu ile bilinen demir oksitler içermektedir [54].



Şekil 1. 18. Nanoparçacık ile QCM immünosensörü sinyal arttırılması. QCM immünosensörü ile antijenin (kırmızı top) belirlenmesi ve immünoglobulinler (Y şekilli) ile kaplanmış bir nanoparçacık (sarı top) kullanılarak salınımların arttırılması için kullanılmaktadır. Mavi disk bir QCM sensörünü temsil etmektedir [54].

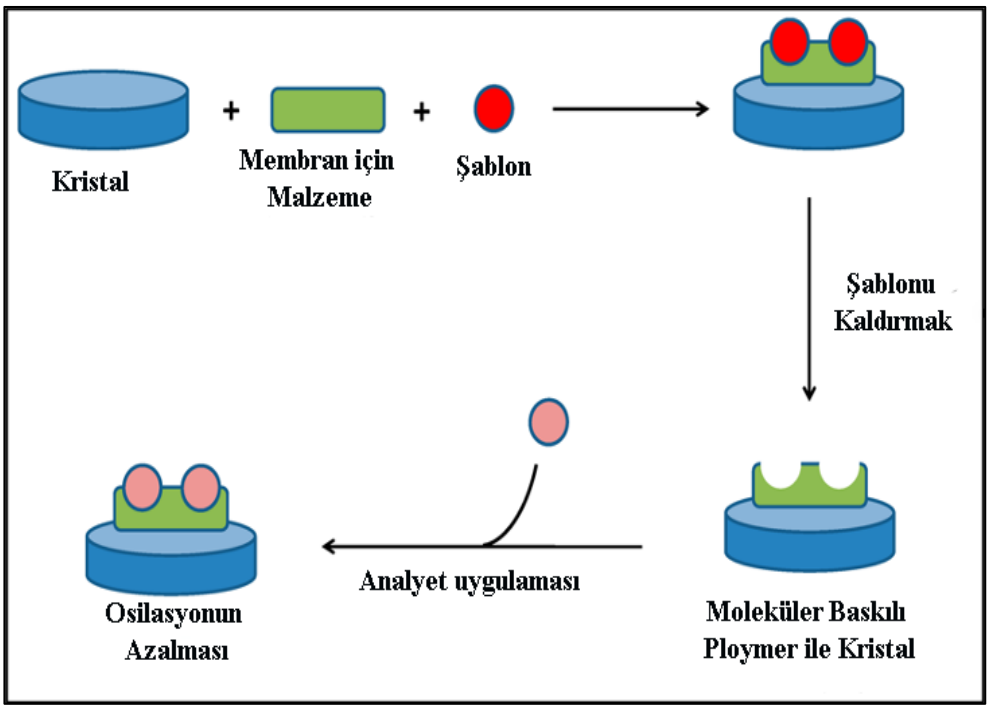
1.9.2.2 QCM Platformunda Moleküler Baskılı Polimerler (MIP)

Moleküler Baskılı Polimerler (Molecularly Imprinted Polymers (MIP)), biyosensörlerde biyolojik tanımlayıcı parça olarak antikorların veya antijenlerin yerine geçen spesifik yapay malzemelerdir. MIP'ler hedef molekülün (şablon) varlığında sentezlenmektedir. Şablonun çıkarılması, moleküler baskılı polimer konstrüksiyonu için gerekli olan başka bir adımdır ve bu adımın başarısı, fonksiyonel filme ulaşmak için bir koşuldur. Büyük şablonların polimerden çıkarılması zordur ve şablonun çıkarılmasına yol açan fiziksel veya kimyasal işlemler de tüm filmin yok edilmesine neden olabilmektedir. Yalnızca daha küçük şablonlar daha kolay kaldırılabilmektedir. MIP'lerin yapılması için birçok malzeme kullanılabilir ve geçmişte bu amaçlar için hem organik hem de inorganik

filmler önerilmiştir. Akrilatlar ve akrilamidler, sol-jeller, kitosan, dekstrin ve organometalik kompozitler, şablon şeklini büyük ölçüde koruyan ve şablonun çıkarılmasına dirençli malzemeler olarak örneklenebilmektedir [54].

Moleküler baskılı polimerler (MIP) kullanan QCM biyosensörleri, kullanım prensipleri açısından QCM immünosensörlerine çok benzemektedir. Afinite reaksiyonu ile doğrudan bir analit ile reaksiyona girerler ve afinite reaksiyonu, ölçülen salınım frekansında kaymaya neden olmaktadır. QCM immünosensörü üzerinde bir Moleküler Baskılı Polimer üretiminin şematik olarak gösterilmesi ve kullanımı şekil 1.17'de gösterilmektedir.

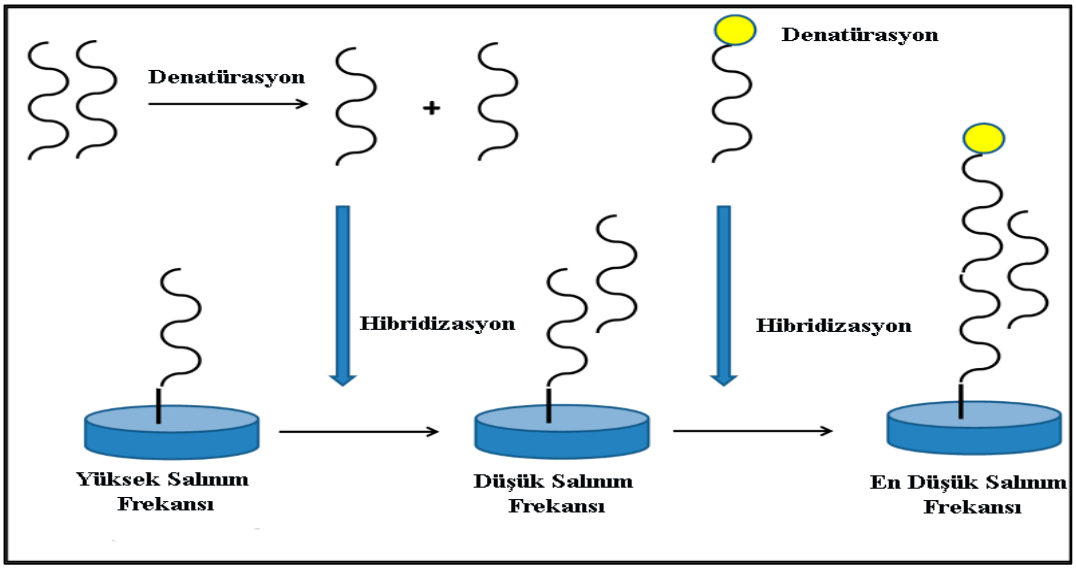
Analitik amaçlar için Moleküler Baskılı Polimerlerin uygulanması aşağıdaki örneklerde gösterilmektedir. Fonksiyonel monomer olarak 3-tiyofen asetik asit (3-TAA) kullanılarak melfalan (mel) tayini için sensörün altın yüzey üzerinde elektro-polimerizasyon ile üretilmiştir. MIP altın kaplanmış elektrokimyasal kuvars kristal mikrodenge (EQCM) elektrodu üzerinde, döngüsel voltametri (CV) kullanarak şablonun (mel) varlığında 3-TAA'nın elektropolimerizasyonu ile oluşturulmuştur. MIP sensörü 5.40 ng mL^{-1} saptama sınırı (LOD) ile mel'e karşı oldukça spesifik olmuştur [55].



Şekil 1. 19. Moleküler Baskılı Polimer ile kaplanmış QCM sensörü ve şablona kimyasal olarak aynı veya yakın bir analit analizini göstermektedir [54].

1.9.2.3 QCM Genetik Biyosensörler

Genetik bilgiler çeşitli biyosensörlerin biyolojik tanımlayıcı parçası olarak kullanılabilmektedir. Tek sarmallı kısa DNA veya RNA suşları, biyosensörlerin tasarımı için uygun olan genetik bilgi formlarına örnektir. RNA ve DNA'nın biyolojik tanımlayıcı elementleri olarak kullanımının iki önemli pratik avantajı vardır. İlk olarak, tanımlayıcı zincirler, Polimeraz Zincir Reaksiyonu ile kolayca hazırlanabilir. Bu nedenle bir biyosensörün üretiminde canlı organizma ve kimyasallarla uğraşmadan daha küçük firma tarafından yapılabilmektedir. İkinci olarak, biyosensör kullanılan zincirin uzunluğunun büyütülmesi ile geliştirilebilir. Ayrıca, QCM genetik biyosensörleri sinyalin yükseltilmesi için nanoparçacıkların uygulanmasıyla geliştirilebilmektedir. Prob fonksiyonunun prensibi şekil 1.18'de gösterilmiştir. DNA biyosensörleri genetik olarak belirlenmiş hastalıkların teşhisi için iyi uygulanabilirliğe sahiptir. Genetik bilgileri kullanan QCM immünosensörleri, patojenik mikroorganizmaların tanımlanması için iyi bir araçtır. Örneğin, QCM sensörü kullanarak *Escherichia coli O157: H7*'de *stx2* geninin tanınması için genetik prob kullanılmıştır. Bu deneyde, bakteri içeren örneklerden genomik DNA izole edilerek ve stx2 gen varlığı belirlenmiştir [54].



Şekil 1. 20. Sinyal amplifikasyonu için nanopartiküller ile etiketlenmiş bir DNA probu kullanan bir QCM Genetik Biyosensör prensibi gösterilmektedir. İlk olarak, bir numunedeki çift sarmallı DNA, örneğin ısı ile denatüre edilmiştir. İkinci aşamada, tek sarmallı DNA, bir QCM sensörü üzerinde imoblize edilmiş tamamlayıcı DNA sarmallı ile bağlanmıştır. Hibridizasyon salınım frekansının kaymasına neden olmuştur. İk aşamada, bir nanoparçacıklar etiketlenmiş bir DNA probu uygulanır ve salınım frek tekrar kaymıştır [54].

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

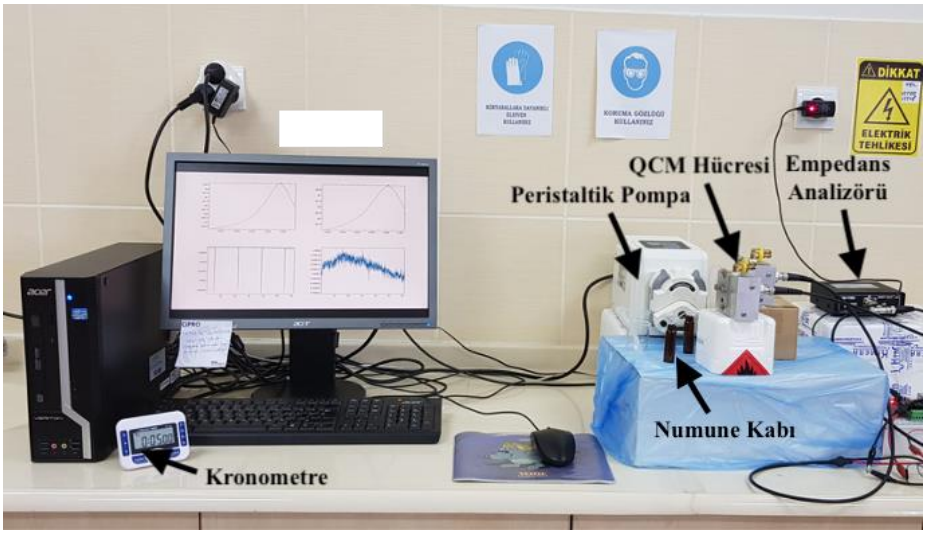
Bu araştırma deneysel bir çalışma olmaktadır. Bu bölümde çalışmada kullanılan materyal hakkında bilgi verilmektedir.

2.1 Deney Malzemeleri ve Kimyasalları

2.1.1 Kullanılan Malzemeler

Tüm yapılan *E.coli* bakteri tespitinin deneyleri esnasında kullanılan materyal aşağıdadır.

1) Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) sensörü – Biolin Scientific – QSX 301. QCM sensörü olarak 5 MHz, 14 mm çaplı, parlatılmış, AT-kesimli, altın elektrotlar özellikleri sahiptir.
2) QCM sensörü tespit hücresi, hücre platformu ve akış (flow) modülü bileşenden oluşmaktadır.
3) Empedans Analizörü (Anten Analizörü)- AIM-4300, 5 kHz – 300 MHz aralıklı (ARRAY SOLUTIONS, USA).

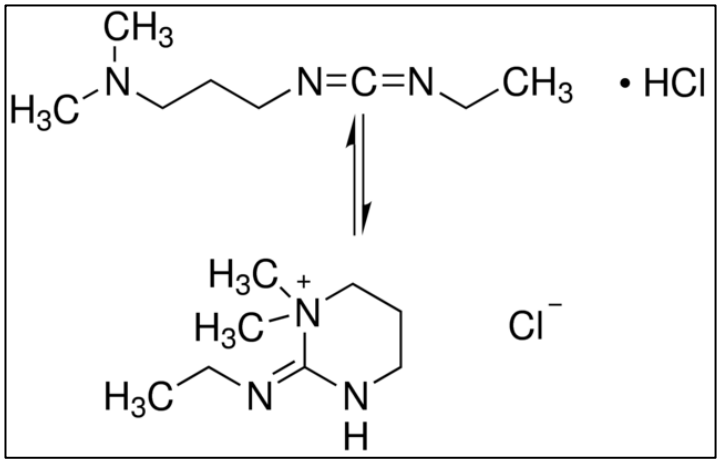


Şekil 2. 1. Kullanılan *E.coli* tespit QCM sistemi.

4) Vorteks Karıştırıcı (vortex mixer)- SA8- BioCote. UK.
5) Hassas Terazi – RADWAG AS 220.R2 – Poland.
6) pH / Sıcaklık Metre – MW 102 – Milwaukee – Romanıa.
7) Peristaltik Pompa – LongerPump – BT100-2J – China.
8) Laboratuvar Malzemesi – KRC
9) Mikropipet – (0.5-10 µl, 20-200 µl) – ISO LAB – Laborgerate GmbH.

2.1.2 Kullanılan Kimyasallar

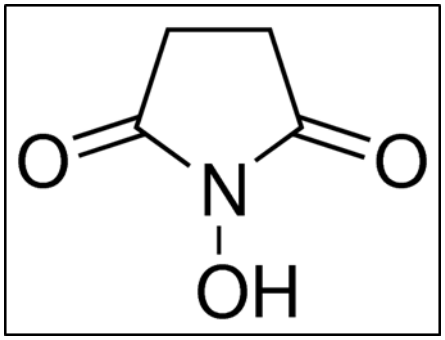
1. Saf Etil Alkol (MERCK=K50750983-846) (Erciyes Üniversitesi Biyolojik ve Medikal Diagnostik Sensörler Laboratuvarı (BiyoMeD sensör Lab.)'dan temin edilmiştir)
2. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu – (Erciyes Üniversitesi hastaneleri Merkez Laboratuvarından temin edilmiştir)
3. *Escherichia coli* Antikor (*Anti-E.coli* antibody) (Abcam= ab25823- Cambridge, UK),
4. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) – (SIGMA-ALDRICH= 03450-5G).



Şekil 2. 2. EDC yapısı [56].

Kapalı Yapısı = $C_8H_{17}N_3$

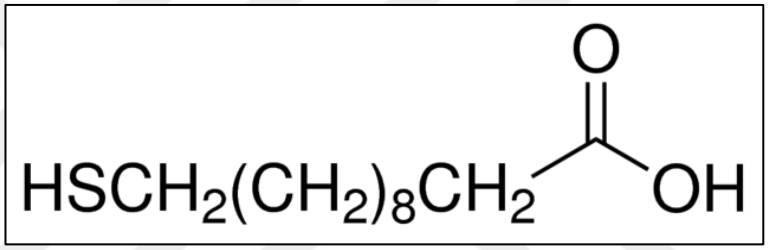
5. N-Hydroxysuccinimide (NHS) – (SIGMA-ALDRICH= 130672-5G)



Şekil 2. 3. NHS yapısı [57].

Kapalı Yapısı = $C_4H_5NO_3$

6. 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) – (SIGMA-ALDRICH= 45056-5G)



Şekil 2. 4. MUA yapısı [58].

Kapalı Yapısı = $HS(CH_2)_{10}CO_2H$

7. Saf Su (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği Laboratuvarından temin edilmiştir)
8. Hidrojen Peroksit 35% (MERCK=K48030900-633).
9. Fosfat Tamponlu Serum (Phosphate Buffered Saline (PBS)))) (Sigma = P4417-100TAB).
10. Bovine Serum Albumin (Büyükbaş Serum Albümini (BSA)) (Sigma = A2153).

2.2 Tampon ve Yapay Tükürük Hazırlanması

Fosfat tamponlu tuz çözeltisi (PBS) tabletlerinden bir tanesinin 200 mL deiyonize suda çözüldüğünde, çözeltide 0.01 M fosfat tamponu, 0.0027 M potasyum klorit ve 0.137 M sodyum klorit oluşmaktadır. Bu çözeltinin 25 derecede (oda sıcaklığında) pH değeri 7.4 olmaktadır. PBS çözeltesi genellikle temizlik yapmak ve makro molekülleri bağlanması için tampon olarak kullanılmaktadır. İnsan tükürüğünü yapay olarak edebilmek için yüzde 5'lik Sığır Serum Albümini (BSA) PBS çözeltisine ilave edilmiştir.

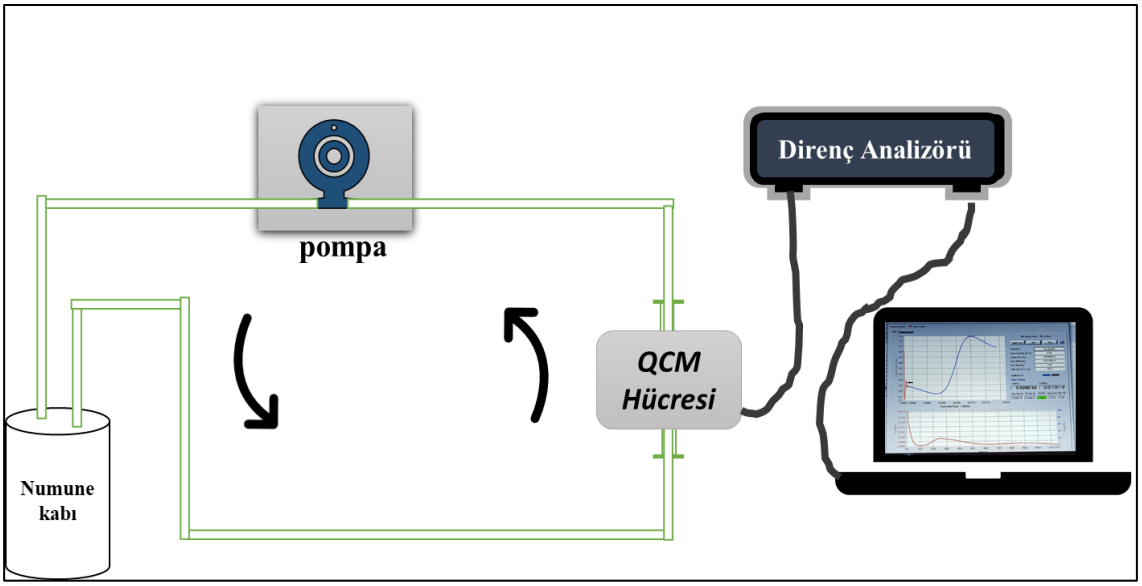
2.3 Tespit Sistemi ve *E.coli* Tespit Deney Düzenekleri

Bu çalışmada, QCM sensörü ile *E.coli* bakterisi yapay tükürük içerisinde serolojik tespiti amaçlanmıştır. *E.coli* bakterisini direkt tespit etmek için anti-*E.coli* antikor bağlantıları kullanılmıştır. Bu antikor *E.coli* bakteri ile spesifik bir şekilde bağlanmaktadır. Fakat ilk önce QCM sensör yüzeyi modifiye edilerek antikor sensör yüzeyine immobilizasyon edilmesi gerekmektedir. Çeşitli yüzey modifikasyonları arasında kovalent immobilizasyon, kontrol edilebilirliği, öngörülebilirliği, uzun vadeli stabilitesi ve yüksek bağ dayanımı nedeniyle yoğun bir şekilde uygulanır. Biyotanıma (Antikor) elemanlarının bir yüzeyde kovalent immobilizasyonu üç adımdan oluşmaktadır:

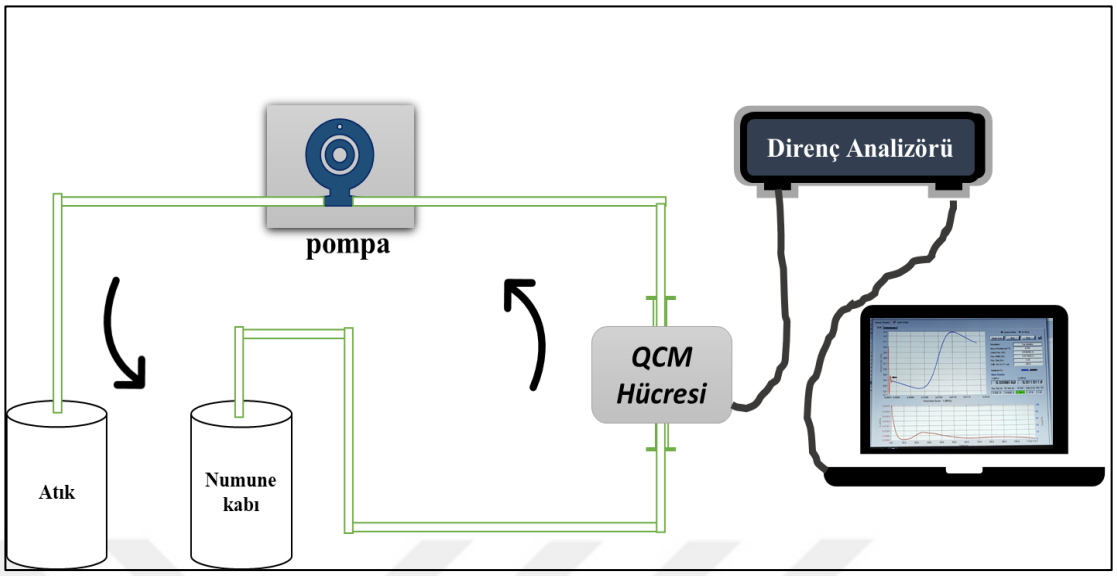
- SAM'lerin inert bir yüzeye tutturulması
- Aktif bir tabaka (EDC / NHS ile) oluşturulması
- Biyo-tanıma (Antikor) elemanları kovalent bağlanması.

Bu aşamadan sonra QCM sensör yüzeyi bloklama yapılarak *E.coli*'nin direkt tespitine hazır olmaktadır.

Tüm tespit sistemi şekil 2. 5'te gösterilmektedir. Sistem numune kabı, Peristaltik pompa, QCM sensör, direnç analizörü ve bilgisayar oluşturulmaktadır.



Şekil 2. 5. Kaplı döngü QCM tespit sistemi (görseldeki şekiller orantılı değildir).



Şekil 2. 6. Açık döngü QCM tespit sistemi (görseldeki şekiller orantılı değildir).

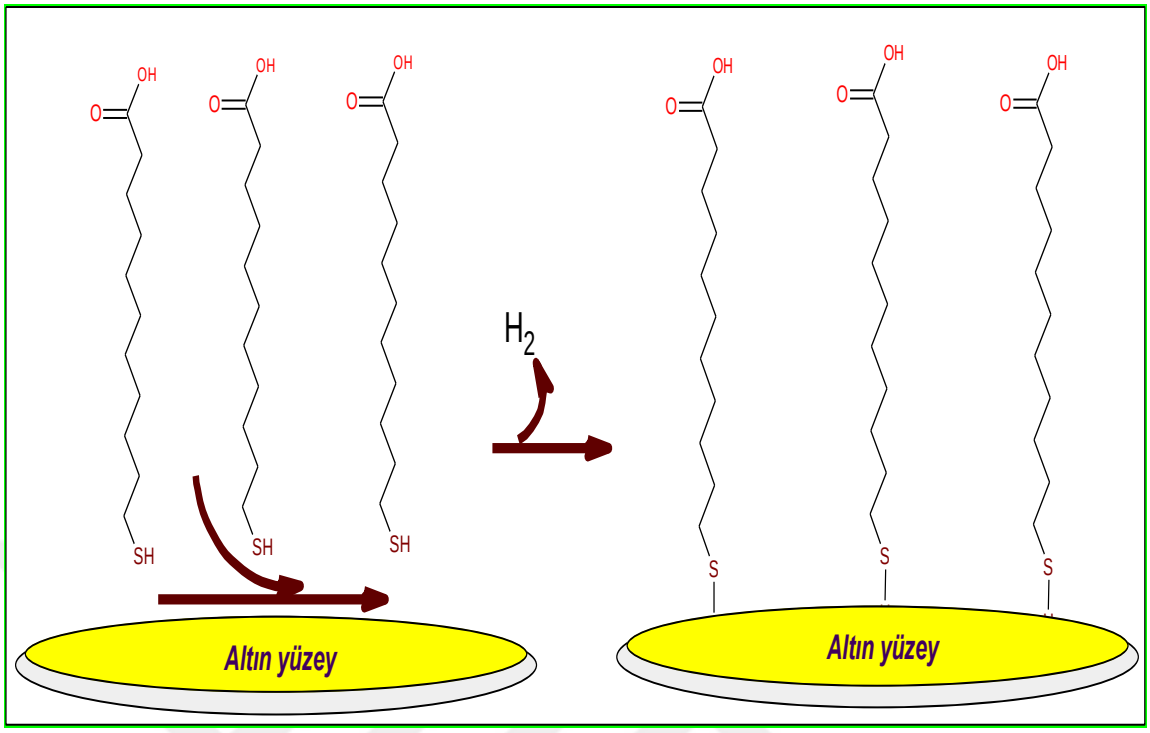
2.4 QCM Sensörü ve Tespit Hücresi Temizlenmesi

QCM sensörü çipleri kullanılmadan önce temizliğinin yapılması gerekmektedir. Sensör çiplerini temizlemek için en az 2 dakika süreyle 10 kat açılmış piranha çözeltisine (1.5 mL sülfürik asit, 0.5 mL hidrojen peroksit) koyulmuştur. Daha sonra sensör çipleri sırayla etil alkol ve saf su ile yıkanmıştır. QCM sensör hücresi içindeki conta, O-ring parçaları ve flow (akış) modülü, yine sırasıyla etil alkol ve saf su ile temizlenmiştir. Ayrıca, kullanılan hortumları temiz tutmak amacıyla hem deneyden önce hem de deneyden sonra sırasıyla etil alkol ve saf su ile 10 dk boyunca açık döngüde şekil 2. 6'da gösterildiği gibi yıkanmıştır.

2.5 QCM Biyosensör Modifikasyonunun İşlemleri

2.5.1 MUA ile QCM Sensörü Kaplanması

Kendiliğinden Oluşan Tek Tabakalar (SAM) QCM sensör yüzeyine işlevsel bir grup eklenmesini sağlanmaktadır. SAM oluşturan kimyasallardan biri 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA)'dir. Şekil 2. 7'de gösterildiği gibi tiyoller ve altın yüzeyler arasındaki reaksiyon Au-S koordinasyon bağlarını oluşturabilmektedir. Ayrışmış hidrojen atomları ya altın yüzeylerinde adsorbe olabilir ya da yüzeyden H_2 şeklinde salınabilmektedir [59]. Bu reaksiyon sebebiyle MUA'nın sülfhidril grubu, MUA katmanının altın yüzeye tutturulmasına imkân vermektedir.



Şekil 2. 7. QCM sensörünün MUA ile kaplanması (görseldeki şekiller orantılı değildir).

2.5.1.1 MUA Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması

11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA) Sigma-Aldrich'den elde edilmiştir. QCM Sensörün yüzey modifikasyonu için 1 mL MUA solüsyonu hazırlanmıştır. 1 mL etil alkol içerisine 0.7 mg MUA eklenerek 3.211 mM MUA çözeltisi hazırlanmıştır. QCM sensörü yüzeyinin morfolojik kalitesi ulaşmak amacıyla 3.211 mM MUA yapılmalıdır. Bu konsantrasyona ulaşmak için 0.7 mg MUA'dan 1 mL'de etil alkol içerisinde çözülmüştür. MUA solüsyonunun pH değeri pH-metre ile yaklaşık 4.5 olarak ölçülmüştür.

2.5.1.2 MUA Kaplama İşleminin Yapılması

Öncelikle QCM sensörü ve hücresi temizlenerek tespit sistemi hazır hale getirilmiştir. MUA solüsyonunu koymadan önce açık döngüde peristaltik pompa vasıtasıyla etil alkol ile ortam hazırlanmıştır. Bu işlem sırasında QCM sensörün rezonans frekans (tespit frekans) aralığına bakılmış ve genellikle 4.94 – 5 MHz aralığında olduğu görülmüştür. Daha sonra, QCM hücresi ve hortumdan etil alkol boşaltılmıştır. MUA çözeltisinden

300 µL pompadan geçirilmeden QCM hücresine konulup bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

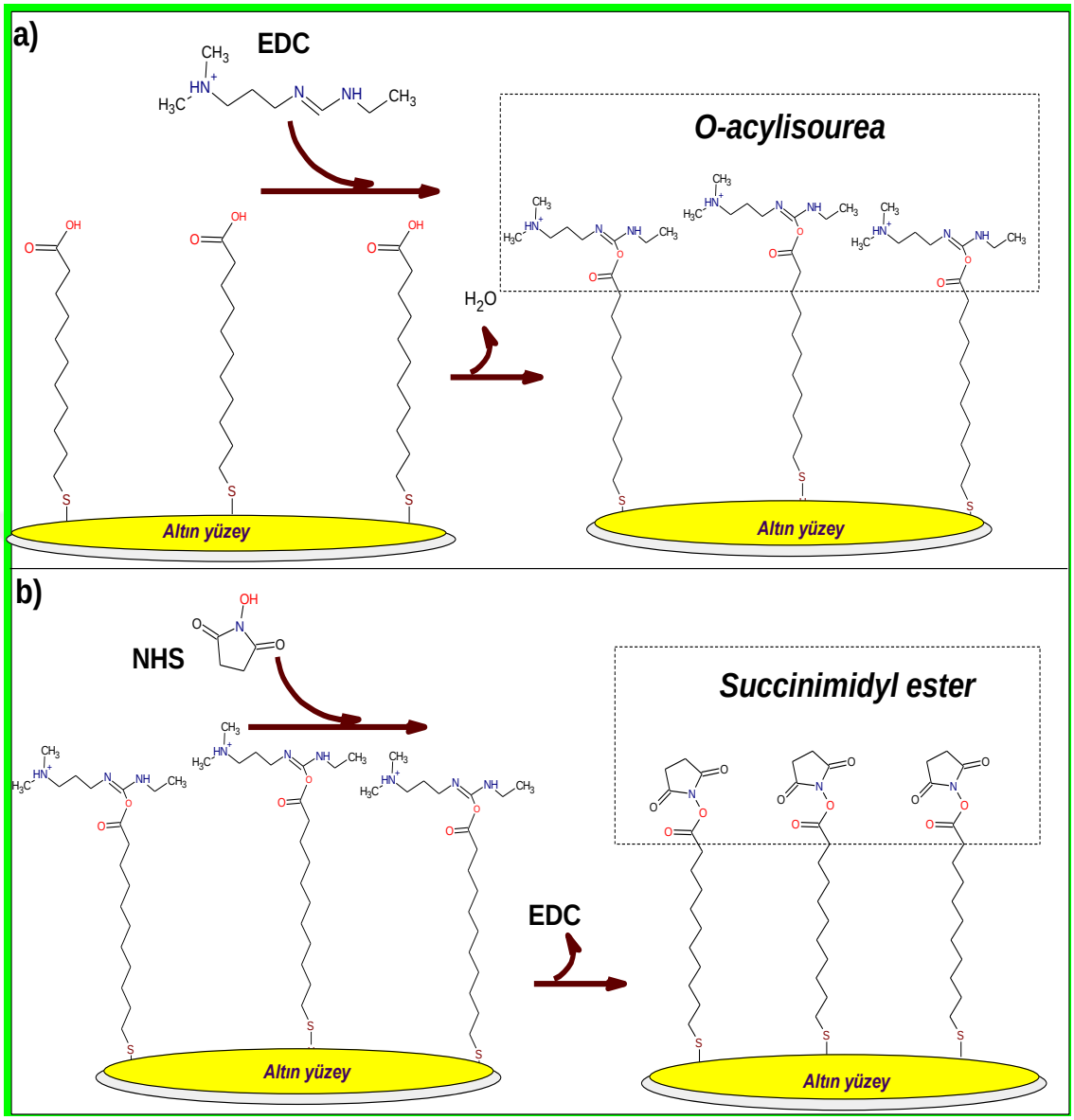
2.5.2 EDC/ NHS Çapraz bağlanma (Crosslinking)

Çapraz bağlanma (Crosslinking), kimyasal olarak kovalent bir bağ ile, iki veya daha fazla molekül birleştirme işlemidir. Çapraz bağlama reaktifleri (veya çapraz bağlayıcılar), proteinler veya diğer moleküller üzerindeki spesifik fonksiyonel gruplara (birincil aminler, sülfhidriller, vb.) kimyasal olarak bağlanabilen iki veya daha fazla reaktif uç içeren moleküllerdir. EDC (N-(3-Dimethylaminopropyl)-N′-ethylcarbodiimide hydrochloride), karboksilat ve amin içeren biyolojik maddelerin konjuge edilmesinde kullanılan en popüler karbodiimittir. EDC, NHS (N-hidroksisülfosüksinimit) veya sulfo-NHS ile birlikte partikül ve yüzey birleşme işlemlerinde uygulanması neredeyse evrenseldir. EDC reaksiyonlarına NHS ilave etmenin avantajı, aktif ara maddenin çözünürlüğünü ve stabilitesini arttırmaktır. Bu nedenle EDC / NHS ile birleşmiş reaksiyonlar genellikle sadece EDC ile elde edilenden daha fazla konjugasyon verimini arttırmaktadır [60].

Tipik bir EDC / NHS reaksiyonu ilk olarak EDC'nin birleşmesi sonucunda şekil 2. 8'de gösterildiği gibi aktif O-asilisourea aramaddelerini oluşturulmaktadır. Daha sonra, NHS'nin eklenmesi, EDC'yi bir süksinimidil esterine dönüştürerek (şekil 2. 8'de gösterildiği gibi) amin-reaktif ara maddeleri stabilize etmektedir. Böylece, bir kovalent amid bağı oluşumu yoluyla biyo-tanıma elemanlarının immobilizasyonunu kolaylaştırmaktadır. [61].

2.5.2.1 EDC / NHS Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması

EDC ve NHS Sigma-Aldrich'den elde edilmiştir. Literatürde EDC ve NHS arasındaki konsantrasyon oranı genellikle 1:1'dir ve 5 mg/mL konsantrasyon kullanılır. Bu deneylerde, EDC ve NHS ayrı ayrı verilmiştir. 1 mL saf suya 5 mg EDC ilave edildiğinde 26.09 mM edilmiştir ve yaklaşık 20 sn boyunca vorteks edilmiştir. NHS çözeltisi için de aynı prosedürler uygulanmış, 1 mL saf suya 5 mg NHS ilave edildiğinde 45 mM edilmiştir ve yaklaşık 20 sn boyunca vorteks edilmiştir.



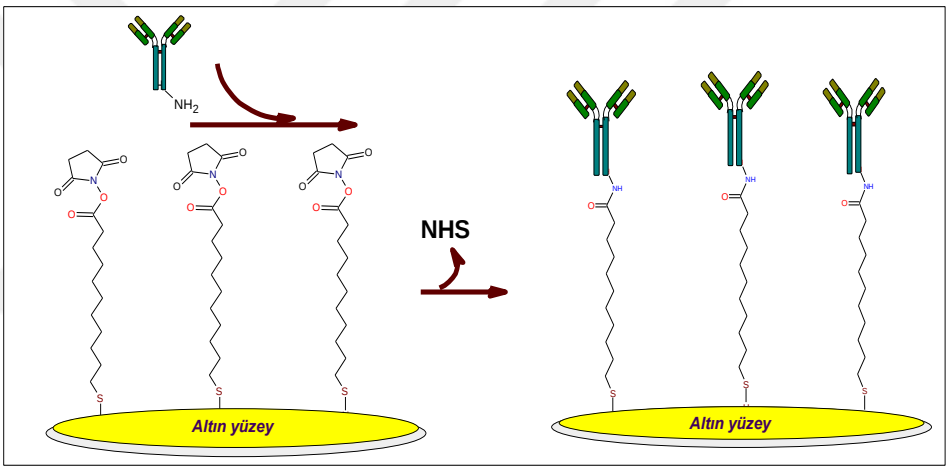
Şekil 2. 8. EDC / NHS reaksiyonu. (a) EDC'nin birleşmesi sonucunda aktif O-asilisourea ara maddelerini oluşturulmaktadır. (b) NHS'nin eklendiğinde EDC'yi bir süksinimidil esterine dönüştürmesi (görseldeki şekiller orantılı değildir).

2.5.2.2 EDC/ NHS Çapraz bağlanma (Crosslinking) Uygulanması

Tespit sestemi oluşturulduktan sonra peristaltik pompa hızı 100 µL/s'ye ayarlandı. Sisteme EDC / NHS vermeden önce kimyasal olmayan yani sadece fiziksel bağları kaldırmak için 10 dk boyunca açık döngüde etil alkol geçirildi. Sonra, kapalı döngü ile 30 dk sürede EDC **s**olüsyonu QCM sensör yüzeyine verildi. Aynı şartlarda NHS solüsyonu verildi fakat NHS solüsyonu vermeden önce sistemden DIW açık döngüde geçirildi.

2.5.3 Antikor İmmobilizasyonu

Antikor immobilizasyonu söz konusu olduğunda antikorların kovalent bağlanmasına dayanan stratejiler (şekil 2. 9) en önde gelendir, çünkü yüksek immobilizasyon yoğunluğu ile hızlı ve yüksek oranda stabil antikor bağlanmasına yol açmaktadır [62]. *Anti-E.coli* Antikor ab25823 test edilen tüm *E.coli* türlerini tanımaktadır. Aşağıdaki *E.coli* türleri antijen preparasyonunda kullanılmıştır: *lysed E.coli* K12, TOP 10F, XS127 / P3, JM109, HB101 ve DH5a ve BL21. Suşlar arasında % 95 homoloji olduğundan, *E.coli*'nin tüm türleri bu antikorla reaksiyona girmektedir [63]. *Anti-E.coli* antikor immobilizasyonu, QCM sensör yüzeyindeki karboksil grubunun antikorun primer amini ile bağlanması yoluyla gerçekleşmektedir.



Şekil 2. 9. Anti-E.coli antikor immobilizasyonu (görseldeki şekiller orantılı değildir).

2.5.3.1 Antikor Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması

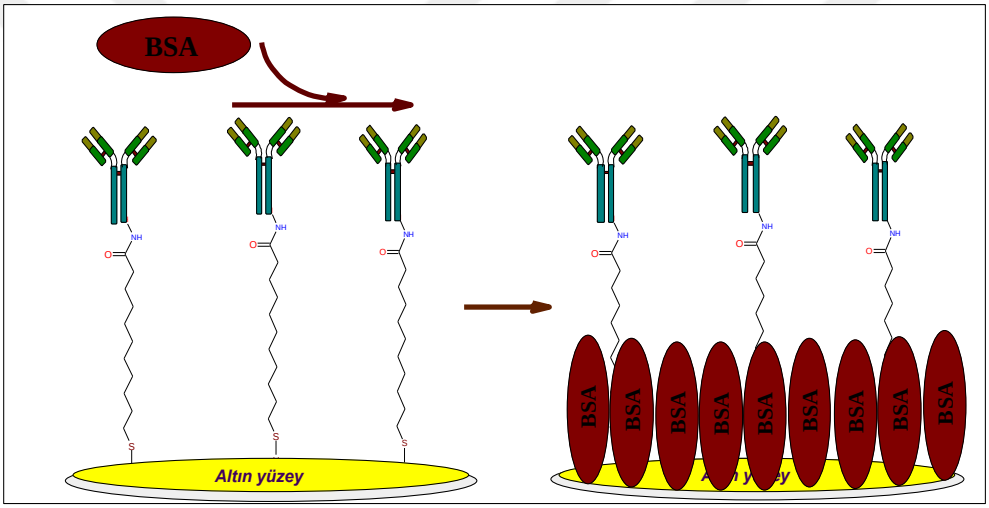
Anti-E.coli Antikor ab25823 Abcam'dan temin edilmiştir. Antikor çözeltisinin hazırlanması için, 1 mL fosfat tamponlu serum (PBS) içerisine daha önce stok haline getirilmiş çözeltiden 100 µl çekilip 10^{14} ab/mL ilave edildikten sonra karışım vorteks edilmiştir. Böylelikle planlanan şekilde 10^{13} ab/mL miktarında *Anti-E.coli* antikor elde edilmiştir.

2.5.3.2 Antikor İmmobilizasyonu Uygulanması

Anti-E.coli antikor çözeltisi 60 dk boyunca QCM sensörü yüzeyine 100 µL/s pompa hızı ile kapalı döngüde uygulanmıştır. Daha sonra, kimyasal olmayan antikor bağlantıları kaldırmak amacıyla 10 dk süreyle açık döngüde PBS geçirilmiştir.

2.6 BSA Bloklama

Tükürük içerisinde spesifik olmayan proteinler bulunduğundan dolayı QCM sensör yüzeyinin bloklanması gerekmektedir. Protein dayalı çeşitli blokerlerin arasında, sığır serum albümin (Bovine Serum Albumin (BSA)) en yaygın kullanılan bloke edici ajanlardan biridir. BSA immünolojik testler üzerinde çalışan klinisyenler ve araştırmacılar arasında evrensel engelleme reaktifi olarak kabul edilmektedir [56]. Şekil 2. 10'da gösterildiği gibi BSA'nın birincil rolü, biyolojik tanıma elemanı immobilizasyonu edildikten sonra kalan boşlukları katı yüzey üzerinde bloke ederek spesifik olmayan bağlanmanın önlenmesidir [64].



Şekil 2. 10. BSA bloklama (görseldeki şekiller orantılı değildir).

2.6.1 BSA Solüsyonunun Hazırlanması

Sığır serum albümin Sigma'dan temin edilmiştir. QCM sensör yüzeyini bloklamak için PBS içerisinde %5'lik BSA kullanılmıştır. %5'lik BSA elde etmek için hassas terazi kullanılarak 0.5 mg BSA maddeden 10 mL PBS solüsyonuna eklenmiştir. Sonra, hazırlanan solüsyon homojenitesi sağlanması amacıyla yaklaşık 15 sn vorteks edilmiştir.

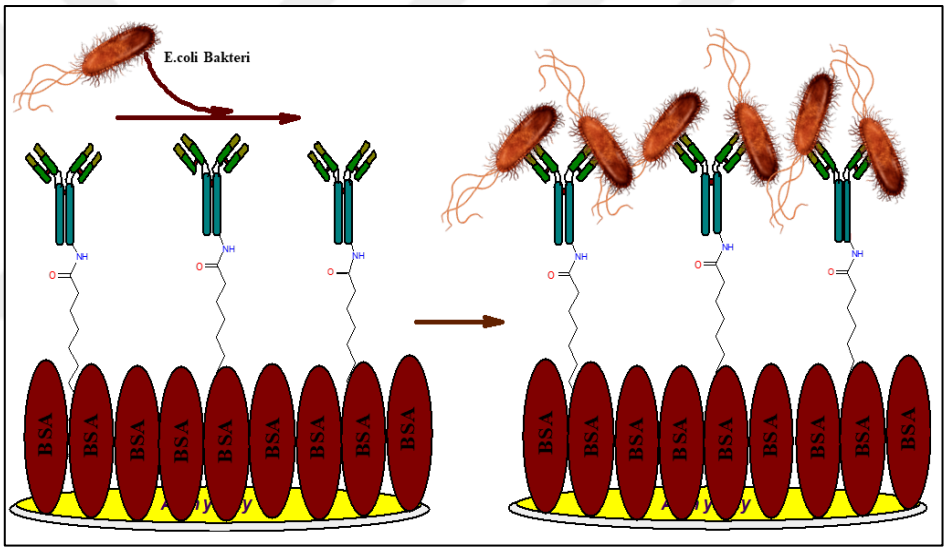
2.6.2 BSA Bloklama İşleminin Uygulanması

Anti-*E.coli* antikor immobilizasyonu sonrasında QCM sensörü yüzeyi PBS içerisindeki %5 oranında 60 dk boyunca sığır serum albüminine (BSA) maruz bırakılmıştır. Hazırlanan BSA solüsyonu QCM sensörü yüzeyine 100 µL/s peristaltik pompa hızı ile

kapalı döngüde uygulanmıştır. Ayrıca, kontrol amacıyla peristaltik pompa durdurup 30 dk beklenmiştir. Sonra, kimyasal olmayan BSA bağlantılarını kaldırmak için 10 dk süreyle açık döngüde PBS geçirilmiştir.

2.7 *Escherichia coli* ATCC 25922 Tespiti

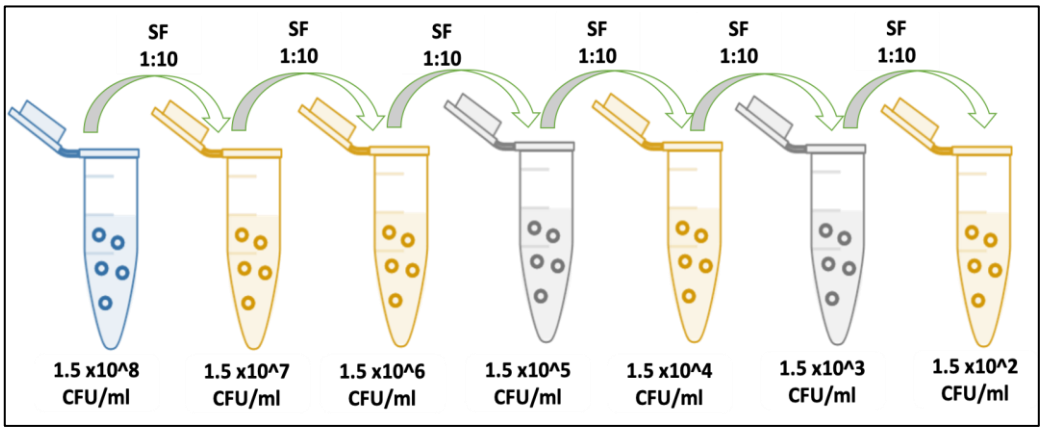
Escherichia coli ATCC 25922 gram negatif ve patojenik olmayan bir bakteridir. *E.coli* bakteri ATCC 25922 şusu, özellikle antikor duyarlılık deneylerinde yaygın olarak kullanılan bir kalite kontrol suşudur. Ayrıca, ATCC 25922 suşu O6 serotipi ve biyotip 1 olduğu için laboratuar çalışması için uygun olduğu düşünülmüş ve bu yüzden tercih edilmiştir [12]. Bu çalışmada, yapay tükürük içerisinde *E.coli* hedef analit olmuştur.



Şekil 2. 11. QCM sensörü ile *E.coli* Bakteri tükrük içersinde tespiti (görseldeki şekiller orantılı değildir).

2.7.1 *E.coli* Bakteri Solüsyonunun (Çözeltisinin) Hazırlanması

E.coli ATCC 25922 suşu Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarı'ndan 0.5 Mcfarland olarak elde edilmiştir. 0.5 Mcfarland bulanıklık standardının optik yoğunluğu, $1.5x10^8$(CFU/ml) koloni oluşturan birimin bir bakteri süspansiyonunun optik yoğunluğuyla karşılaştırılabilmektedir. İstenen konsantrasyona ulaşmak için *E.coli* yapay tükürükte 1:10 seyreltme faktörü (SF) ile seyreltilmiştir. Deneylerde kullanılan *E.coli* bakteri konsantrasyonu 10^2, 10^4, 10^6 ve 10^7 CFU/mL şekil 2. 12'de sarı rengi ile gösterilmektedir.



Şekil 2. 12. E.coli bakteri solüsyonunun konsantrasyonu seyreltme işlemleri.

2.7.2 *E.coli* Bakteri Solüsyonun Verilmesi

Her deneyde, *E.coli* bakteri tespiti aşamasında *E.coli* bakteri çözeltisi 60 dk boyunca QCM sensörü yüzeyine 100 µL/s pompa hızı ile kapalı döngüde uygulanmıştır. Yapay olarak elde edilmiş tükürükteki *E.coli* bakterisi, dört farklı konsantrasyonda (10^7, 10^6, 10^4 ve 10^2 cfu/mL) en az 3 tekrarlı olarak uygulanmıştır.

3. BÖLÜM

BULGULAR

3.1 Araştırma Modeli

Sauerbrey denkleminde gösterildiği gibi, yüzeydeki kütle frekans kaymasından çıkartılabilmektedir. Denklem (3.1.) ile açıklandığı gibi kütleye göre altın yüzey QCM sensörü üzerindeki her bir katmanın molekül miktarı hesaplanabilmektedir:

$$\Delta m = -\frac{A\,\Delta f}{2.26 \times 10^{-6}\, f_o^2} \qquad 3.1.$$

Ayrıca, moleküllerinin miktarları (*N*) aşağıdaki denklemle gösterildiği gibi QCM sensörü yüzeyindeki kütle ile hesaplanabilmektedir:

$$N = \frac{\Delta m}{A\, M_w} \qquad 3.2.$$

Burada,

Δm = kristalin elektrot yüzeyindeki toplam kütle değişimi,

Mw = molekül ağırlığı,

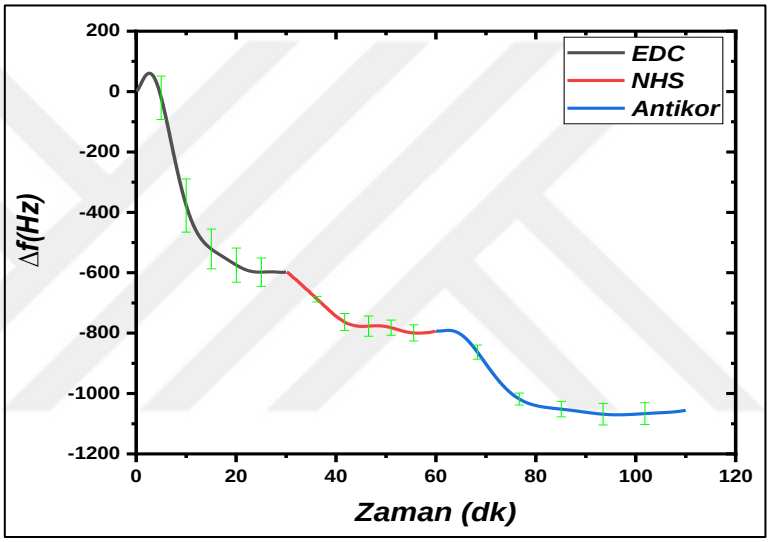
A = Avogadro sabiti (6.023×10^{23} mol^{-1}).

İfadeyi (3.1.) denklem (3.2.) 'e yerine konularak denklem (3.3.) elde edilmektedir. Bu denklemle moleküllerinin miktarları (*N*), frekans kaymasından (Δf) direkt hesaplanabilmektedir [65]

$$N = -2.664 \times 10^{29}\ \frac{A\Delta f}{M_w\, F^2} \qquad 3.3.$$

3.2 QCM Biyosensör Modifikasyonunun Karakterizasyonu

Bu çalışmada, anti-*E.coli* antikorları QCM sensörü yüzeye immobilize edilmesi için SAM yöntemini uygulanmış ve uzun zincirli bir karboksilik olan MUA kullanılmıştır. Ek olarak, EDC ve NHS'nin birlikte eklenmesi MUA tek tabakasını aktive ederek bağlayıcı bileşiklerin stabilitesini geliştirmiştir. Sonra, aktif NHS esterlerini amit bağları ile değiştirerek anti-*E.coli* antikorunu konjuge edilmesi amaçlanmıştır. Her aşamada, elde edilen frekans kaymasına dayanarak kristal yüzeyine yüklenen kütle ve moleküllerinin miktarı hesaplanmıştır.



Şekil 3. 1. QCM Biyosensör Modifikasyon İşleminin QCM ile Takibi.

QCM sensör modifikasyonunun birinci basamağı SAM tabakası oluşturulmasıdır. Bu işlemde sensör yüzeyi daha önceki çalışmalarda da kullanıldığı görülen MUA ile kaplanmıştır. QCM sensörü MUA çözeltisinde bir gece inkübe edilmiştir. Bu nedenle, frekans kayması izlenememiştir. Ancak, EDC, NHS ve antikor immobilizasyon aşamalarından elde edilen sonuçlara göre MUA molekülünü altın elektrot üzerine bağlandığı ve SAM tek tabaka oluşturulduğu anlaşılmaktadır.

İkinci işlem olarak, EDC/NHS ile çapraz bağlaması yapılmıştır. EDC ve NHS aşamaları için işlem 30 dk sürmektedir. Çünkü yapılan deneylere bakıldığında EDC ve NHS bağlanması durumu 30 dakika içerisinde sensör yüzeyi madde ile doyuma ulaştığı için tamamlanmaktadır. EDC çözeltisi QCM algılama sistemine uygulandıktan sonra sensörün rezonans frekansında ortalama (598 ± 47.5) Hz'lik bir kayma izlenmiştir. Bu

değer, denklem (3.3.) uygulandığında QCM sensörü yüzeyine 3.2×10^{15} EDC molekül bağlandığı ifade edilebilmektedir. Benzer şekilde, NHS çözeltisi QCM algılama sistemine uygulandıktan sonra sensörün rezonans frekansında ortalama (199 ± 28.3) Hz'lik bir kayma izlenmiştir. Bu değer, denklem (3.3.) uygulandığında QCM sensörü yüzeyine 1.75×10^{15} EDC molekül bağlandığı ifade edilebilmektedir. Bu veriler göz önüne alındığında, en az aynı miktarda MUA molekülünün de sensör yüzeyine bağlandığı anlamı çıkmaktadır. Çünkü bir EDC / NHS molekülü birden fazla SAM molekülünü aktive edebilmektedir [66].

QCM sensör modifikasyonunda son işlem olarak, anti-*E.coli* antikor immobilizasyonu yapılmıştır. Anti-*E.coli* antikorlarının çözeltisi QCM algılama sistemine uygulandıktan sonra antikorların bağlanmasının neden olduğu frekans kayması 266 ortalama (266 ± 36.2) Hz olmuştur. Bu değer, denklem (3.3.) uygulandığında QCM sensörü yüzeyine 1.79×10^{12} anti-*E.coli* antikor immobilize edildiği gösterilmektedir. NHS ve anti-*E.coli* antikoru arasındaki frekans kayma oranı yüksektir (199/266 ~% 75). Bu, anti-*E.coli* antikor miktarının, sensör yüzeyine bağlandığı NHS sayısından biraz daha az olduğu anlamına gelmektedir. QCM sensörü tüm aşamaların aniliz verileri Tablo'de özetlenmiştir. Tablo 3.1'de, frekans kayması, sensörün yüzeyindeki kütlesi ve moleküllerinin miktarları sunulmaktadır.

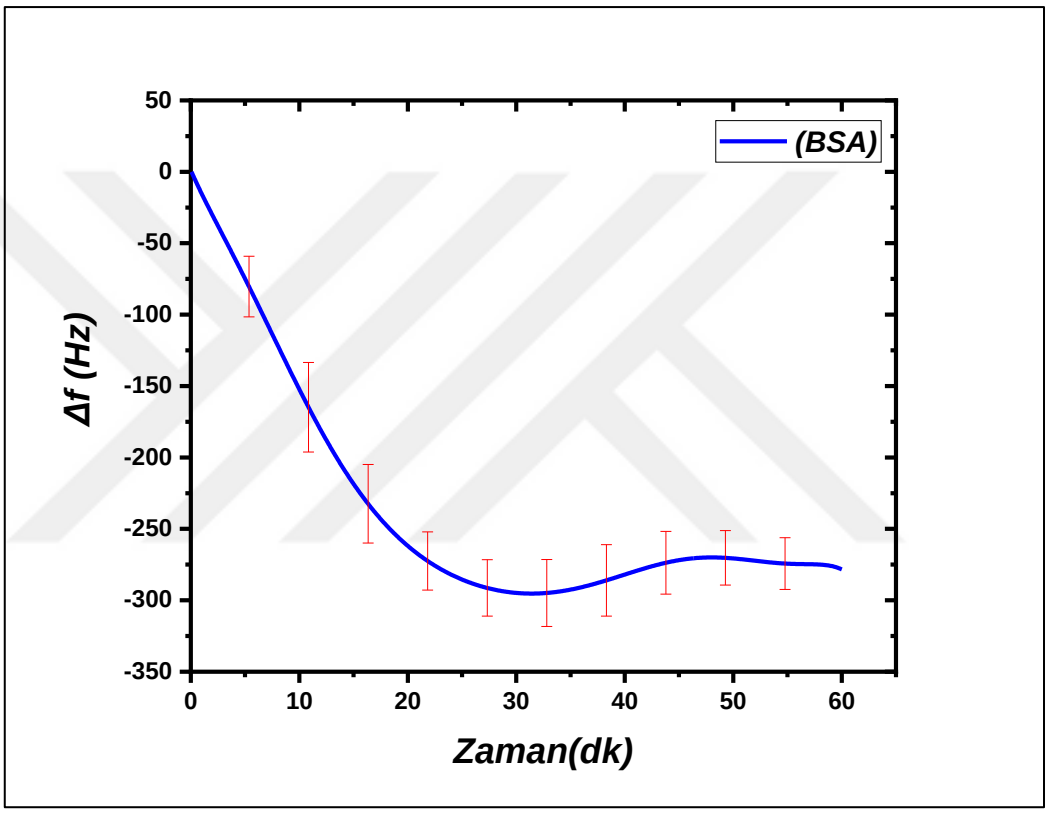
Tablo 3. 1 QCM sensörü yüzey modifikasyonunun her aşamasında frekans kayması ve molekül miktarı değişiklikleri göstermektedir.

Aşamalar	**Δf (Hz)**	**Δm (ng)**	***Mw***	***N***
MUA	-	-	218.36	-
EDC	(598 ± 47.5)	10,166	191.7	3.2×10^{15}
NHS	(199 ± 28.3)	3,383	115.09	1.75×10^{15}
Antikor	(266 ± 36.2)	4,522	150000	**0.79** 10^{12}

3.3 QCM biyosensörün Yüzeyini BSA ile Bloklama

BSA'nın uygulanmasının amacı, gerçek numunede bulunan ve hedef olmayan diğer moleküllerin herhangi bir spesifik olmayan sensör yüzeyindeki bağlantısını

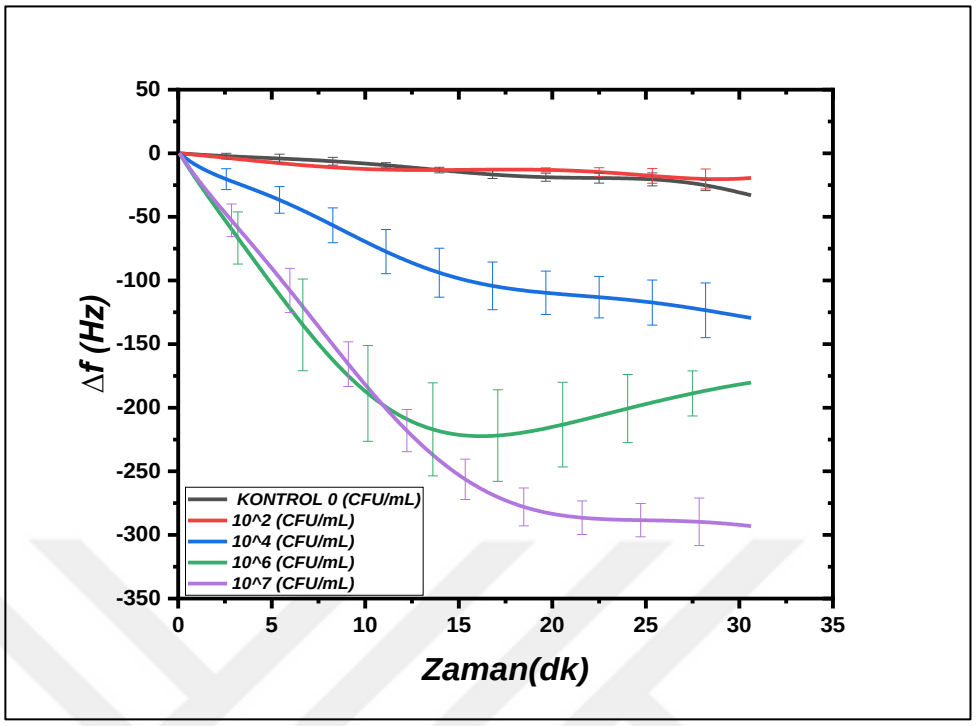
önlenmesidir. Antikor immobilize edildikten sonra BSA bloklama işlemi yapılmıştır. Normalde, sistem ortalama 30 dakika işlem süresi sonucunda doyuma ulaşmaktadır. Fakat, emin olmak için BSA işlemi süresi 60 dakika olarak uygulanmıştır. Şekil 3. 2'de gösterildiği gibi, BSA işlemi sonucunda ortalama (294 ± 20.8) Hz kadar sistemin rezonans frekansında frekans kayması görülmüştür. Bu değer, denklem (3.3.) uygulandığında QCM sensörü yüzeyine 4.5×10^{13} BSA immobilize edildiği işettir.



Şekil 3. 2. BSA Bloklam İşleminin QCM ile Takibi.

3.4 QCM biyosensörü ile *E.coli* ATCC 25922'nin Saptanması

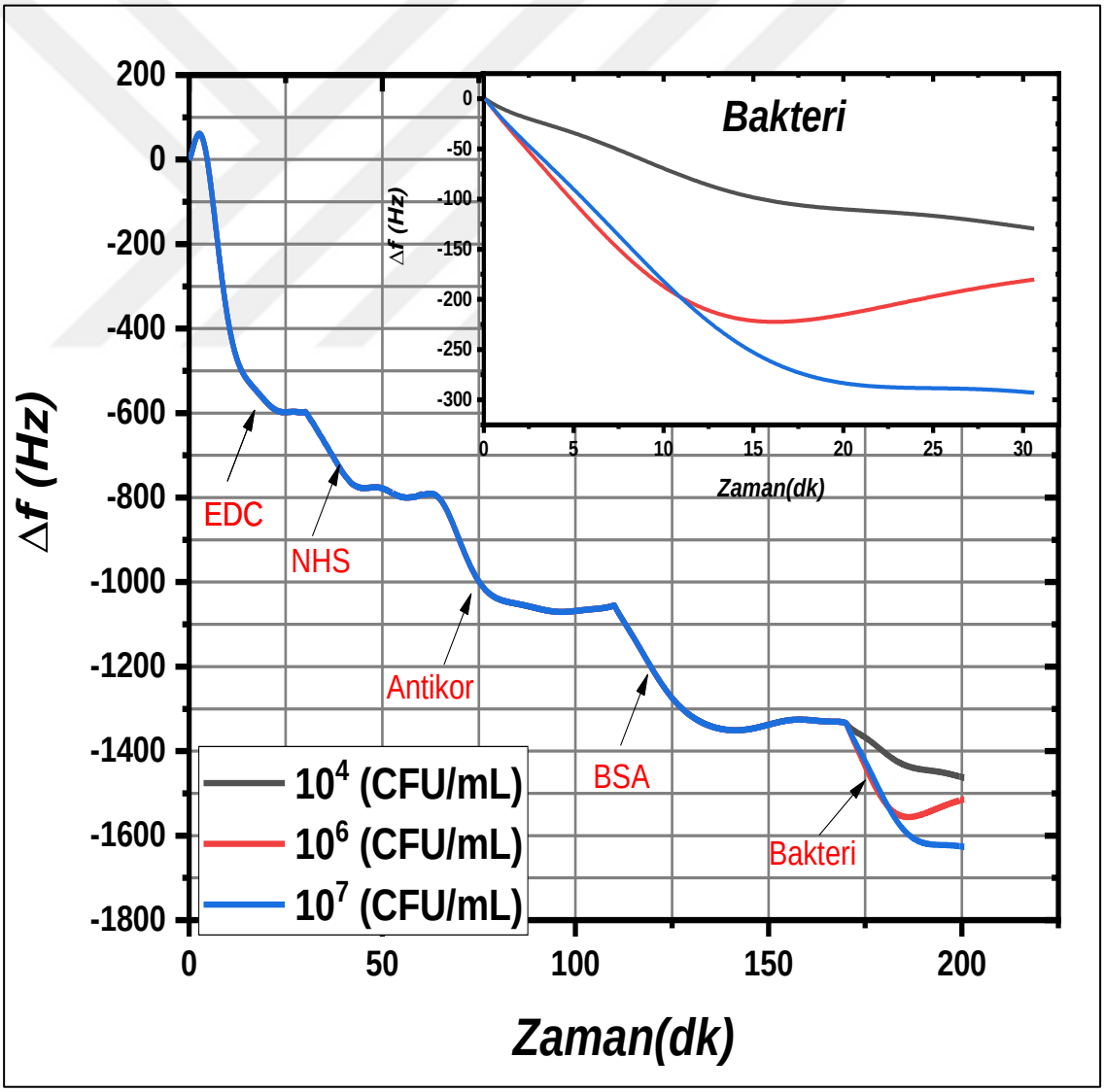
QCM immünosensörü ile *E.coli* ATCC 25922 tüm konsantrasyonunun doğrudan tespitini sağlanmaktadır. 10^0 CFU/mL bakteri içeren BSA çözeltisi, negatif kontrol olarak kullanılmıştır. Antikor immobilizasyon ve BSA bloklama aşamalarından sonra 10^0, 10^2, 10^4, 10^6 ve 10^7 CFU / mL konsantrasyonlarda *E.coli* ATCC 25922, tespit için akış hücresine enjekte edilmiştir. Deneyin belirtilen tüm konsantrasyonlarda *E.coli* ATCC 25922 solüsyonlarının uygulanması sonucunda ortaya çıkan sistemin rezonans frekansındaki değişimler şekil 3. 3'te gösterilmektedir.



Şekil 3. 3. Farklı konsantrasyonlarda *E.coli* ATCC 25922 solüsyonlarının uygulanması sonucunda ortaya çıkan sistemin rezonans frekansındaki değişimler

Sonuçlar elde edildiğinde içerisinde *E.coli* ATCC 25922 bulunmayan BSA solüsyon ile yapılan negatif kontrol deneyinde ortalama (33 ± 6.2) Hz'lik frekans kayması görülmektedir. Buradaki değişim, uygulanan solüsyonda bulunan kalsiyum (Ca), magnezyum (Mg) minerallerinin ve BSA moleküllerin yüzeyde tutunmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, şekil 3. 3'te kırmızı renk ile gösterilen kısım, 10^2 CFU/mL konsantrasyonlu *E.coli* bakteri solüsyonunun uygulandığı zaman ortalama (21 ± 8) Hz'lik frekans kaymasını göstermektedir. Bu deneyin sonucu, negatif kontrol deneyindeki değişimden ayırt edilemediğinden dolayı olumsuz bir sonuç olarak kabul edilmektedir. Çünkü kullanılan sistem için 10^2 CFU/mL *E.coli* bakteri konsantrasyonu çok düşüktür. Başka bir deyişle, bu sistem ve sistemin hassasiyeti, 10^2 CFU/mL bakteri konsantrasyonunda spesifik antikorlar tarafından yakalanan bakteriler için kayda değer bir frekans değişikliği yapmak için yeterli değildir. Şekil 3. 3'te mavi renk ile gösterilen kısımda, 10^4 CFU/mL konsantrasyonda *E.coli* bakteri solüsyonunun uygulandığı zaman ortalama (127 ± 25) Hz'lik frekans kayması gözlenmiştir. Bu değişimin negatif kontrol ve 10^2 CFU/mL konsantrasyonlu *E.coli* bakteri solüsyonunun uygulandığındaki frekans değişimine nazaran daha büyük olduğu için yapılan deneyleri doğrulamaktadır. Benzer bir şekilde, şekil 3. 3'te yeşil renk ile gösterilen kısımda, 10^6 CFU/mL konsantrasyonlu

E.coli bakteri solüsyonunun uygulandığı zaman ortalama (222 ± 35.8) Hz'lik frekans kayması izlenmiştir. Ancak, 10^6 CFU/mL konsantrasyonlu *E.coli* bakteri için üç tekrarlı deneylerinden birisinde QCM sensörün yüzeyi diğer deneylerde olduğu gibi en optimal şekilde modifiye edilememiştir. Bu nedenle standart sapması diğer deneylerden daha fazla olmuştur. Bu değişim, önceki deneylerde bahsedilen frekans kaymasına göre daha fazladır. Çünkü verilen bakteri konsantrasyonu daha yüksektir. Ayrıca, şekil 3. 3'te mor renk ile gösterilen kısım, 10^7 CFU/mL konsantrasyonlu *E.coli* bakteri solüsyonunun uygulandığı zaman ortalama (292 ± 26.5) Hz'lik frekans kayması göstermektedir. Bu sonuç ile anlaşılacağı üzere verilen en yüksek konsantrasyon olduğu için diğer deneylerden daha fazla bir frekans değişiminin görülmesi oldukça mantıklıdır.

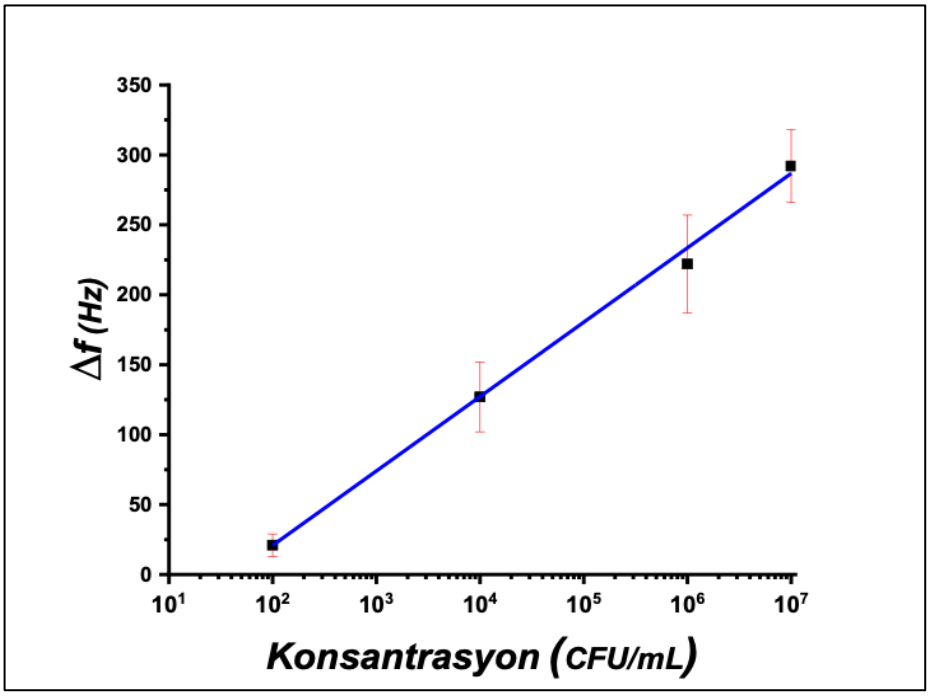


Şekil 3. 4. Deneyler aşamalarının frekans değişimi

E.coli ATCC 25922'nin 10^4,10^6 ve 10^7 CFU/mL örnek çözeltisi ile çalışılırken frekans kayması ayırt edilebilmektedir. Bu, QCM sisteminin 10^4-10^7 CFU/mL'lik bir algılama aralığı ile iyi çalıştığı anlamına gelmektedir. QCM sensörünün yüzeyinin MUA ile kaplanması aşaması haricinde yapılan tüm deney aşamalarının frekans değişimi Şekil 3. 4'te gösterilmektedir.

3.5 *E.coli* Bakteri Reaksiyonunun Standart Eğrisi

Değişik *E.coli* bakteri konsantrasyonlarında yapılan deneylerin sonucunda elde edilen verilerin diferansiyel ölçüm standart eğrisi şekil 3. 5'te gösterilmektedir. Standart eğri çözeltideki hücre konsantrasyonunun kalitatif ve kantitatif analizi için kullanılmasına imkan verebilmektedir. Şekil 3. 5'te, hücre konsantrasyonu ne kadar yüksek olursa, frekansın o kadar fazla değiştiği gösterilmektedir. Burada uygulanan *E.coli* bakteri dozajına göre bir doğrusal artış izlenmektedir. *E.coli* bakterileri spesifik antikorlar tarafından ne kadar çok yakalanırsa, hedef kütle altın elektrodun yüzeyine o kadar fazla kaplanmaktadır. Böylece, ölçüm frekans kayması daha fazla olmaktadır. Bu çalışmada sisteme en düşük verilen *E.coli* ATCC 25922 bakteri konsantrasyonu ile elde edilen olumlu sonuç olarak frekans kayması 127 Hz görülmüştür. Bunun için 10^4 CFU/ mL sistem hassasiyeti, sadece birincil antikorlar kullanılarak doğrulanmıştır.



Şekil 3. 5. Logaritmik eksenlerde doz kıyaslaması.

3.6 Sistemin İstatiksel Yorumu(T-Testi)

Yapılan çalışmada sistemin t-test bilgisi Originlab programında hesaplandığında 5.159×10^{-190} gibi oldukça küçük bir sonuç elde edilmiştir. Sisteme içerisinde *E.coli* bulunmayan solüsyon (kontrol) ile olumlu deneylerin en düşük *E.coli* konsantrasyonunu ihtiva eden solüsyon uygulandığında elde edilen sonuçlar istatistiksel olarak karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerin istatiksel yorumlanırken çift taraflı ve iki değişken bağımsız t-testi yapılmıştır. İstatistik p değeri 0.05 değerinden oldukça küçük olduğu için iki deney arasında anlamlı bir farklılık elde edilmiştir.

4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

4.1 Tartışma

Yapılan çalışmada simüle insan tükürüğü içerisinde *E.coli* ATCC 25922 bakteri suşunun direkt tespiti amaçlanmıştır. Önceki araştırmalar incelendiğinde QCM sensörü kullanarak yapay tükürük içerisinde *E.coli* ATCC 25922 bakteri suşu direkt tespit edilmesi ile ilgili çalışmaya rastlanmadığından sonuçlar birebir olarak değerlendirilememiştir. Ancak, elde edilen verilerin değerlendirilmesi amacıyla farklı suş ve QCM biyosensör modifikasyonu koşullarının kullanıldığı literatürdeki çalışmalar incelenmiştir. QCM biyosensör yüzeyinin modifiye edilebilmesi için çok farklı yöntemler uygulanabilir ve immobilize edilmek istenen resetörler ve yakalanacak olan hedefler için farklı yöntemlerin kullanılması gerekebilmektedir.

İlk olarak, QCM sensörün yüzeyi MUA ile kaplanma aşaması dışında tüm deney aşamaları kapalı döngü akış sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu akış sisteminde, peristaltik pompanın hız 100 µL/s ayarlanarak gönderilen solüsyonun sensör yüzeyi ile en uygun şekilde temas etmesi sağlanmış ve bağlanma olayı eş zamanlı olarak izlenmiştir. Böylece, her aşamanın ilerlemesi incelenmiş ve doğruluğu eş zamanlı izlediğinden dolayı nitelikli sonuçlar elde edilmiştir. Önceki araştırmalarda biyolojik tanımlayıcı elementlerin tayini yapılması için akışkan QCM sistemi kullanılmıştır. Peristaltik pompa hızının seçilmesinde incelenmiş olan bir başka benzer çalışmadan örnek alınmış ve 100 µL/s olarak ayarlanmıştır [47]. Ayrıca, bu çalışmadaki yöntemler kullanılarak yapay tükürük uygulanmıştır. İkinci olarak, yapılan deneylerde QCM sensör modifikasyonu aşamalarından elde edilen sonuçlar literatürdeki çalışmalarla kıyasladığında 2014 yılında bir araştırmada benzer şartlarda yapılmıştır. Yüksek lisans tezi olarak hazırlanan bu çalışmada daha önce de belirtildiği gibi

MUA ile QCM sensörü yüzey kaplama aşaması izlenememiştir. Fakat, her yapılan işlem bir önceki işlem ile direkt olarak ilişkili olduğundan dolayı yapılan her işlem bir önceki işlemin doğrulaması niteliğinde gösterilmiştir. Böylece, kaplama aşaması sonraki işlemlere bakılarak MUA molekülünü sensor üzerine bağlandığı anlaşılmıştır. Ayrıca, bu tez çalışmasında EDC/NHS iki aşamada uygulanırken Vo ve arkadaşlarının araştırmasında ikisi birlikte verilmiştir [57]. Fakat, her iki durumda da NHS molekülü ve EDC molekülünü kimyasal olarak yüzeyden kısmen uzaklaştıracaktır. Böylece, Vo ve arkadaşlarının çalışmasında azalan frekansına NHS moleküllerinin neden olduğu anlaşılmaktadır. Bu tez çalışmasında altın elektrot üzerine bağlanan NHS moleküllerinin miktarı (1.75×10^{15}) Vo ve arkadaşları çalışmasındaki NHS molekül miktarına (2.889×10^{15}) benzerlik göstermektedir. Benzer şekilde, bu tez araştırmasında sensöre immobilize edilmiş antikorların sayısı da (1.79×10^{12}) Vo ve arkadaşlarının çalışmasındaki sayı (4.635×10^{12}) civarındadır. Fakat, bu tez çalışmasında yakalanan NHS ve antikor moleküllerinin miktarı, Vo ve arkadaşlarının çalışmasından daha azdır. Çünkü, Vo ve arkadaşlarının çalışmasında daha yüksek NHS ve antikor konsantrasyonu uygulanmıştır. Başka bir araştırmada, uygulanan konsantrasyondaki küçük farkla NHS moleküllerinin ve antikorlarının neden olduğu QCM sensörü yanıtı, bu tez çalışması ile kıyasladığında çok yakındır [66].

Tablo 4. 1 Kullanılan yöntem tipine ve elde edilen LOD'ye göre bakterilerin saptanması için bazı yöntemler özetlenmiştir.

Bakteri Türü	**Yöntem**	**LOD**	**Yıl**	**Kaynaklar**
E.coli	QCM İmmunosensör	10^4 CFU/mL	2015	[67]
E.coli	MIP Tabanlı QCM	3.72×10^5 CFU/mL	2015	[68]
S. paratyphi	SPR	1.4×10^6 CFU/mL	2015	[68]
E.coli	ESI	10^3 CFU/mL	2017	[69]
E.coli	Potansiyometrik	10^2 CFU/mL	2019	[70]
E.coli	ELISA	1.905×10^3 CFU/mL	2019	[39]
E.coli	QCM İmmunosensör	10^4 CFU/mL	2020	Bu çalışma

Üçüncü olarak, önceki araştırmalar incelendiğinde QCM sensörü kullanarak yapay veya gerçek tükürük içerisinde *E.coli* bakteri direkt tespit edilmesi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında tespit ortamı diğer çalışmalardan farklı olduğundan dolayı elde edilen sonuçlar çok benzer olmayacaktır. Ek olarak, antikorun *E.coli* bakterisine bağlanma aktivitesi birinden diğerine farklılık gösterir. Örneğin, araştırmamızda 10^7 cfu/mL bakteri konsantrasyonunu uygulandığında frekans azalması, Vo ve arkadaşlarının çalışmasından 2 kat daha fazladır. Fakat, yapılan deneylerde elde edilen *E.coli* bakteri algılama hassasiyeti ile literatürdeki başka ortamlarda veya yöntemler ile *E.coli* bakteri algılama hassasiyetleri kıyaslanabilmektedir. Tablo 4.1'de bu tez çalışması hassasiyeti (10^4 cfu/mL) ve bazı çalışmalarda elde edilen verilerin hassasiyetleri ile kıyaslanmasını göstermektedir.

4.2 Sonuç ve Öneriler

4.2.1 Sonuç

Sonuç olarak bu tez çalışmasında QCM sensörü kullanarak simüle insan tükürüğü içerisinde *E.coli* ATCC 25922 bakteri suşu direkt tespit çalışması yapılmıştır. Burada, yüzey modifikasyonu için Kendiliğinden Düzenlenen Tek Tabakalar (SAM) yöntemi kullanılmıştır. MUA molekülleri EDC/NHS varlığında reaktif hale getirilmiştir ve Anti-*E.coli* antikorları 5 MHz AT kesimli QCM sensörü üzerinde immobilize edilmiştir. *E.coli*'nin kimyasal adsorpsiyonu nedeniyle değişen frekansın sonucu QCM biyosensör sistemi ile ölçülmüş ve bu sistem 10^4 -10^7 CFU/mL *E.coli* aralığında umut vadeden sonuçlar vermiştir. Numune içerisindeki *E.coli* bakterisi saptama süresi 10^4 CFU/mL hassasiyet ile yaklaşık 50 dakika olmuştur. Ayrıca, ortam şartları uygun şekilde optimize edilerek 10^2 CFU/mL konsantrasyonu, hassasiyet sınırı olarak tayin edilebilir. Tez çalışması kapsamında yapılan ölçümlerde yukarıdaki literatür taramasında örnek olarak verilmiş olan çalışmalardaki gibi başarılı ölçümler alınmıştır.

4.2.2 Öneriler

- Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) sensörü kullanılarak gerçek insan tükürüğü içerisinde *Escherichia coli* bakterisi direkt tespit edilebilmektedir. Ayrıca, tespit sistemine birden fazla bakteri türü uygulanarakda pozitif kontrol yöntemiyle inceleme yapılabilir.

- İkincil antikorlar, altın kolloidler ve benzeri ile ikincil reaksiyonlar kullanıldığında, sinyal amplifikasyonu iledaha da yüksek hassasiyet beklenilebilir.
- Bu tez çalışması farklı biyolojik sıvılar (serum, plazma, idrar vb.) içerisinde ve aynı şartlarda yapılabilir. Daha sonra, elde edilecek veriler birbiri ile kıyaslanabilir.
- QCM immünosensörü yüzeyi modifikasyonu SAM yöntemi (bu çalışmada) ve moleküler baskılı polimerler (MIP) yöntemi uygulandığında elde edilecek sonuçları karşılaştırılarak incelenebilir.
- Bu çalışmada kullanılan yöntemin seçiçilik, tekrarlanabilirlik ve kararlılık testinin yapılması, gerek bu çalışmanın kalitesine gerek benzer çalışmalara oldukça fayda sağlayabilir.

KAYNAKÇA

1. Yoshizawa, J. M., Schafer, C. A., Schafer, J. J., Farrell, J. J., Paster, B. J., Wong, D. T. W., 2013. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities.

2. Jung, J. Y., Yoon, H. K., An, S., Lee, J. W., Ahn, E. R., Kim, Y. J., … Lim, S. K., 2018. Rapid oral bacteria detection based on real-time pcr for the forensic identification of saliva. **Scientific Reports**,**8**(1), :2–11.

3. Chaitanya, K., 2019. Genome and Genomics: From Archaea to Eukaryotes. **Springer Singapore**.

4. Yang, S., Wang, M., Wang, L., Fu, Z., 2017. A sandwich protocol for chemiluminescent detection of streptococcus mutans utilizing dual-site recognition by rat igg2a and vancomycin. **Sensors and Actuators B: Chemical**,**252**, :1003–1009.

5. ELISA detection methods comparison., 2018. (Web sayfası: **https://www.ukessays.com/essays/biology/advantages-of-direct-detection-of-elisa-biology-essay.php**) (Erişim tarihi: June 5, 2020).

6. Galiana-Simal, A., Muñoz-Martinez, V., Calero-Bueno, P., Vela-Romero, M., Beato-Fernandez, L., 2018. Towards a future molecular diagnosis of autism: recent advances in biomarkers research from saliva samples. **International Journal of Developmental Neuroscience**. Elsevier Ltd.

7. Belstrøm, D., Holmstrup, P., Bardow, A., Kokaras, A., Fiehn, N. E., Paster, B. J., 2016. Comparative analysis of bacterial profiles in unstimulated and stimulated saliva samples. **Journal of Oral Microbiology**,**8**(1), :30112.

8. Johannsen, B., Müller, L., Baumgartner, D., Karkossa, L., Früh, S., Bostanci, N., Mitsakakis, K., 2019. Automated pre-analytic processing of whole saliva using magnet-beating for point-of-care protein biomarker analysis. **Micromachines**, **10**(12), :833.

9. Javaid, M., Ahmed, A., Durand, R., 2016, undefined. (n.d.). Saliva as a

diagnostic tool for oral and systemic diseases. **Elsevier**.

10. Rivas, L., Mellor, G.E., Gobius, K., Fegan, N., 2015. Detection and typing strategies for pathogenic escherichia coli. **SpringerBriefs in Food, Health, and Nutrition**.

11. IStok., 2018. E coli bakteri mikro biyolojik vektör çizim. (Web sayfası: **https://www.istockphoto.com/tr/vektör/e-coli-bakteri-mikro-biyolojik-vektör-çizim-bölümü-etiketli-diyagramı-çapraz-tıbbi-gm957344970-261408680**) (Erişim tarihi: June 5, 2020).

12. Minogue, T. D., Daligault, H. A., Davenport, K. W., Bishop-Lilly, K. A., Broomall, S. M., Bruce, D., 2014. Complete genome assembly of escherichia coli atcc 25922, a serotype o6 reference strain. **Genome Announcements**,**2**(5).

13. Furst, A. L., Francis, M. B., 2019. Impedance-based detection of bacteria. **Chemical Reviews**. American Chemical Society.

14. Washington, D. C. ; L. S., Greenberg, A. E., Beumer, R. R., Te Giffel, R. R., Cox, M. C., 1985. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. **Lett. Appl. Microbiol** (Vol. 10).

15. Hosseini, S., Vázquez-Villegas, P., Rito-Palomares, M., Martinez-Chapa, S. O., 2018. Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA). **Singapore**: Springer Singapore.

16. Bartholomew, R. A., Hutchison, J. R., Straub, T. M., Call, D. R., 2015. PCR, real-time pcr, digital pcr, and isothermal amplification. In **Manual of Environmental Microbiology** (pp. 2.3.2-1-2.3.2-13). Washington, DC, USA: ASM Press.

17. Somma, M., Querci, M., 2010. Bölüm 6: polimeraz zincir reaksiyonu (pcr). gıda örneklerinde genetiği değiştirilmiş organizma analizleri. **World Health Organisation**.

18. Kralik, P., Ricchi, M., 2017. A basic guide to real time pcr in microbial diagnostics: definitions, parameters, and everything. **Frontiers in Microbiology**.

Frontiers Research Foundation.

19. Shen, C.-H., 2019. Amplification of nucleic acids. In **Diagnostic Molecular Biology** (pp. 215–247). Elsevier.

20. Nazir, R., Rehman, S., Nisa, M., Microbiology, U. ali B.-F., 2019, undefined. (n.d.). Exploring bacterial diversity: from cell to sequence. **Elsevier**.

21. Chen, Y., Wang, Z., Liu, Y., Wang, X., Li, Y., Ma, P., Li, H., 2018. Recent advances in rapid pathogen detection method based on biosensors. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**. Springer Verlag.

22. Bhattarai, P., Hameed, S., 2020. Basics of biosensors and nanobiosensors. In **Nanobiosensors** (pp. 1–22). Wiley.

23. Shukla, S., Govender, P., Lipid, A. T.-A. in B., 2016, undefined. (n.d.). Polymeric micellar structures for biosensor technology. **Elsevier**.

24. Furst, A. L., Francis, M. B., 2019. Impedance-based detection of bacteria. **Chemical Reviews**,**119**(1), :700–726.

25. Gutiérrez-Del-Río, I., Marín, L., Ferná Ndez, J., Lvarez, M. A. ´, Millá, S., Ferrero, F. J., Lombó, F., 2018. Development of a biosensor protein bullet as a fluorescent method for fast detection of escherichia coli in drinking water.

26. Mohan, D., Pathak, A., Resmi, P. E., Suneesh, P. V, Satheesh Babu, T. G., 2019. Fluorescence imaging of e. coli using cdse quantum dots. **IOP Conference Series: Materials Science and Engineering**,**577**, :12107.

27. Qin, K., Zhang, D., Ding, Y., Zheng, X., Xiang, Y., Analyst, J. H., 2020. Applications of hydrothermal synthesis of escherichia coli derived carbon dots in in vitro and in vivo imaging and p-nitrophenol detection. **pubs.rsc.org**.

28. Brogioni, B., Berti, F., 2014. Surface plasmon resonance for the characterization of bacterial polysaccharide antigens: a review. **MedChemComm**. Royal Society of Chemistry.

29. Mariani, S., & Minunni, M., 2014. Surface plasmon resonance applications in

clinical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. Springer Verlag.

30. Miguel, N., Pires, M., Dong, T., Hanke, U., Hoivik, N., 2014. Recent developments in optical detection technologies in lab-on-a-chip devices for biosensing applications. **Sensors**,**14**, :15458–15479.

31. Gür, S. D., Bakhshpour, M., Denizli, A., 2019. Selective detection of escherichia coli caused utis with surface imprinted plasmonic nanoscale sensor. **Materials Science and Engineering C**,**104**, :109869.

32. Huang, Y., Wu, Z., Zhao, G., Dou, W., 2019. A label-free electrochemical immunosensor modified with aunps for quantitative detection of escherichia coli o157:h7. **Springer**,**48**(12), :7960–7969.

33. Ding, J., Qin, W., 2020. Recent advances in potentiometric biosensors. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. Elsevier B.V.

34. Lin, D., Pillai, R. G., Lee, W. E., & Jemere, A. B., 2019. An impedimetric biosensor for e. coli o157:h7 based on the use of self-assembled gold nanoparticles and protein g. **Microchimica Acta**,**186**(3).

35. Jeffree, A. I., Karman, S., Ibrahim, S., Karim, M. S. A., & Rozali, S. ,2020. Biosensors approach for lung cancer diagnosis—a review. In **Lecture Notes in Mechanical Engineering** (pp. 425–435). Pleiades Publishing.

36. Borodina, I., Zaitsev, B., Teplykh, A., Karavaeva, O., Burygin, G., Guliy, O., 2019. Acoustic sensor for detection and identification of microbial cells directly in the liquid phase. In **IEEE International Ultrasonics Symposium, IUS** (Vol. 2019-Octob, pp. 575–578).

37. Shi, X., Kadiyala, U., Vanepps, J. S., Yau, S. T., 2018. Culture-free bacterial detection and identification from blood with rapid, phenotypic, antibiotic susceptibility testing. **Scientific Reports**,**8**(1), :1–11.

38. Zhang, H., Huang, F., Cai, G., Li, Y., Lin, J., 2018. Rapid and sensitive detection of escherichia coli o157:h7 using coaxial channel-based dna extraction and microfluidic pcr. **Journal of Dairy Science**,**101**(11), :9736–9746.

39. Wang, C., Xing, K., Zhang, G., Yuan, M., Xu, S., Liu, D., Lai, W. H., 2019. Novel elisa based on fluorescent quenching of dna-stabilized silver nanoclusters for detecting e. coli o157:h7. **Food Chemistry**,**281**, :91–96.

40. Lin, D., Pillai, R. G., Lee, W. E., Jemere, A. B., 2019. An impedimetric biosensor for e. coli o157:h7 based on the use of self-assembled gold nanoparticles and protein g. **Microchimica Acta**,**186**(3), :1–9.

41. Kaushik, S., Tiwari, U. K., Pal, S. S., Sinha, R. K., 2019. Rapid detection of escherichia coli using fiber optic surface plasmon resonance immunosensor based on biofunctionalized molybdenum disulfide (mos 2) nanosheets. **Biosensors and Bioelectronics**,**126**, :501–509.

42. Huang, Z., Peng, J., Han, J., Zhang, G., Huang, Y., Duan, M., Lai, W., 2019. A novel method based on fluorescent magnetic nanobeads for rapid detection of escherichia coli o157:h7. **Food Chemistry**,**276**, :333–341.

43. Johannsmann, D., 2015. Soft and Biological Matter The Quartz Crystal Microbalance in Soft Matter Research Fundamentals and Modeling. **springer**. 10783

44. Alexander, T. E., Lozeau, L. D., Camesano, T. A., 2019. QCM-d characterization of time-dependence of bacterial adhesion. **Cell Surface**. Elsevier B.V.

45. Pohanka, M., 2017. The piezoelectric biosensors: principles and applications, a review. **Int. J. Electrochem. Sci**,**12**, :496–506.

46. Quartz crystal microbalance (qcm) - nanoscience instruments. (n.d.). (Web sayfası: **https://www.nanoscience.com/techniques/quartz-crystal-micro-balance**) (Erişim tarihi: June 14, 2020).

47. Soysaldı, F., 2017. Model Tükürükte Qcm Sensör İle Sentetik Genetik Materyal Tespiti. Erciyes university, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Sayfa sayısı 109.

48. Pohanka, M., 2020. QCM immunosensor for the determination of staphylococcus aureus antigen. **Chemical Papers**,**74**(2), :451–458.

49. Park, H., You, J., Park, C., Jang, K., Na, S., 2018. In-situ and highly sensitive detection of epidermal growth factor receptor mutation using nano-porous quartz crystal microbalance. **Journal of Mechanical Science and Technology**,**32**(4), :1927–1932.

50. Kadirsoy, S., Atar, N., & Yola, M. L., 2020. Molecularly imprinted qcm sensor based on delaminated mxene for chlorpyrifos detection and qcm sensor validation. **New Journal of Chemistry**,**44**(16), :6524–6532.

51. Zhou, L., Lu, P., Zhu, M., Li, B., Yang, P., Cai, J., 2016. Silver nanocluster based sensitivity amplification of a quartz crystal microbalance gene sensor. **Microchimica Acta**,**183**(2), :881–887.

52. Nehra, A., Pandey, K., Singh, K. P., Ahalawat, S., Joshi, R. P., 2017. Determination of *e. coli* by a graphene oxide-modified quartz crystal microbalance. **Analytical Letters**,**50**(12), :1897–1911.

53. Rozmyslowicz, T., 2015. A novel point-of-care bionanosensor for rapid hiv detection and treatment monitoring. **Journal of AIDS & Clinical Research**,**06**(05).

54. Pohanka, M. ,2018. Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and dna sensors and their applications. **Materials**,**11**(3).

55. Kumar Singh, A., Singh, M., 2015. QCM sensing of melphalan via electropolymerized molecularly imprinted polythiophene films. **Biosensors and Bioelectronics**,**74**, :711–717.

56. Sigma-Aldrich. N-(3-dimethylaminopropyl)-n′-ethylcarbodiimide hydrochloride. (Web sayfası: **https://www.sigmaaldrich.com /catalog/ product/ sial/03450? lang=en&region=TR**) (Erişim tarihi: June 6, 2020).

57. Sigma-Aldrich. N-hydroxysuccinimide 98%. (Web sayfası: **https://www. sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/130672?lang=en&region=TR**) (Erişim tarihi: June 6, 2020).

58. Sigma-Aldrich. 11-mercaptoundecanoic acid 95% | sigma-aldrich. (Web sayfası:

https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/450561?lang=en&region=TR) (Erişim tarihi: June 6, 2020).

59. Xue, Y., Li, X., Li, H., Zhang, W., 2014. Quantifying thiol-gold interactions towards the efficient strength control. **Nature Communications**,**5**(1), :1–9.

60. Hermanson, G., 2013. Bioconjugate Techniques. **Academic Press**.

61. Tsai, T. C., Liu, C. W., Wu, Y. C., Ondevilla, N. A. P., Osawa, M., Chang, H. C., 2019. In situ study of edc/nhs immobilization on gold surface based on attenuated total reflection surface-enhanced infrared absorption spectroscopy (atr-seiras). **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**,**175**, :300–305.

62. Vashist, S. K., 2012. Comparison of 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide based strategies to crosslink antibodies on amine-functionalized platforms for immunodiagnostic applications. **Diagnostics**,**2**(3), :23–33.

63. Abcam. Anti-e. coli antibody (ab25823). **Abcam**. (Web sayfası: **https://www.abcam.com/e-coli-antibody-ab25823.html**) (Erişim tarihi: June 14, 2020).

64. Ahirwar, R., Bariar, S., Balakrishnan, A., Nahar, P., 2015. BSA blocking in enzyme-linked immunosorbent assays is a non-mandatory step: a perspective study on mechanism of bsa blocking in common elisa protocols. **RSC Advances**,**5**(121), :100077–100083.

65. Ngo, V. K. T., Nguyen, D. G., Nguyen, H. P. U., Tran, V. M., Nguyen, T. K. M., Huynh, T. P., Truong, T. N. L., 2014. Quartz crystal microbalance (qcm) as biosensor for the detecting of escherichia coli o157:h7. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**,**5**(4), :045004.

66. Wang, L. J., Wu, C. S., Hu, Z. Y., Zhang, Y. F., Li, R., Wang, P., 2008. Sensing escherichia coli o157:h7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based qcm immunosensor. **Journal of Zhejiang University: Science B**,**9**(2), :121–131.

67. Farka, Z., Kovář, D., Skládal, P., 2014. Rapid detection of microorganisms based

on active and passive modes of qcm. **Sensors**,**15**(1), :79–92.

68. Yilmaz, E., Majidi, D., Ozgur, E., Denizli, A., 2015. Whole cell imprinting based escherichia coli sensors: a study for spr and qcm. **Sensors and Actuators, B: Chemical**,**209**, :714–721.

69. Golabi, M., Kuralay, F., Jager, E. W. H., Beni, V., Turner, A. P. F., 2017. Electrochemical bacterial detection using poly(3-aminophenylboronic acid)-based imprinted polymer. **Biosensors and Bioelectronics**,**93**, :87–93.

70. Tian, Y., Liang, T., Zhu, P., Chen, Y., Chen, W., Du, L., Wang, P., 2019. Label-free detection of e. coli o157:h7 dna using light-addressable potentiometric sensors with highly oriented zno nanorod arrays. **Sensors**,**19**(24), :5473.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: AZZAM AL-TAIRI
Uyruğu: Yemen
Doğum Tarihi ve Yeri: 20.11.1992 – Aldhlea
Medeni Durum: Evli
e-mail: altairi.92@hotmail.com
Yazışma Adresi: Mevlana Mah. 75. Yıl Cad. Anaşehir sit sitesi B 10 Blok No: 43. Talas/Kayseri.

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2019 - 2020
Lisans	Teknoloji ve Bilim Üniversitesi (UST), Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı.	2014 - 2015
Lise	Qutaiba bin Muslim, Damt	2010 - 2011

YABANCI DİL

İngilizce

Türkçe

YAYINLAR

1. Al-Tairi, A., Köşker, F. B., Ceran, K., Soylu, M.Ç. (2018). The direct detectıon of escherichia coli bacterıa in simulated saliva based on quartz crystal microbalance (QCM) sensor. *İn Abstract Book of the 5th European Conference on Science Art & Culture,* Ankara – Turkey.

2. Ceran, K., Köşker, F. B., Al-Tairi, A., Soylu, M.Ç. (2018). Evaluation of surface modifications with quartz crystal microbalance sensor for genetic detection. *İn Abstract Book of the 5th European Conference on Science Art & Culture,* Ankara – Turkey.

3. Keskin, M., Köşker, F. B., Al-Tairi, A., Soylu, M.Ç. (2018). Bacteria detection with piezoceramic resonator. *İn Abstract Book of the 5th European Conference on Science Art & Culture,* Ankara – Turkey.