

**KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**Biyoteknoloji Anabilim Dalı**

**ETİKETSİZ YANAL AKIŞ İLE *Listeria monocytogenes*'e**  
**KARŞI APTAMER KAPILI SİLİKA**  
**NANOPARTİKÜLLERİN SERBEST BIRAKILMASI**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**Behiye Büşra TAŞBAŞI**

**KONYA**  
**OCAK, 2020**

**KONYA GIDA VE TARIM ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**ETİKETSİZ YANAL AKIŞ İLE *Listeria monocytogenes*'e KARŞI APTAMER  
KAPILI SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN SERBEST BIRAKILMASI**

**Behiye Büşra TAŞBAŞI**

**Tez Danışmanı: Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP**

Biyoteknoloji Anabilim Dalı

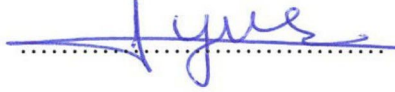
**Meram-KONYA  
OCAK, 2020**

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.




Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP (Danışman)

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.



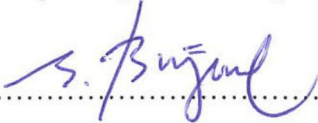
Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.



Dr. Öğr. Üyesi Bilge GÜVENÇ TUNA

Bu tezi okuduğumu ve tezin Yüksek Lisans derecesi için yeterli, alanına uygun ve istenilen niteliklere sahip olduğuna kanaat getirdiğimi onaylarım.



Prof. Dr. Sencer BUZRUL

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Behiye Būşra TAŞBAŞI tarafından yüksek lisans tezi olarak sunulan sunduğum “ETİKETSİZ YANAL AKIŞ İLE *Listeria monocytogenes*'e KARŞI APTAMER KAPILI SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN SERBEST BIRAKILMASI” başlıklı bu çalışma KGTÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliđi ile KGTÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 13/01/2020 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

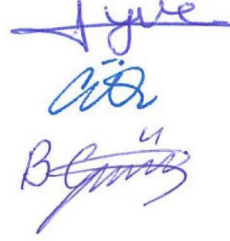
**Jüri Üyeleri:**

**İmza:**

**Jüri Başkanı:** Doç. Dr. Mahmut Deniz YILMAZ

**Raportör Üye:** Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP

**Üye:** Dr. Öğr. Üyesi Bilge GÜVENÇ TUNA

Three handwritten signatures in blue ink, corresponding to the names listed in the text. The first signature is for Mahmut Deniz Yılmaz, the second for Veli Cengiz Özalp, and the third for Bilge Güvenç Tuna.

**ÖZET****ETİKETSİZ YANAL AKIŞ İLE *Listeria monocytogenes*'e KARŞI  
APTAMER KAPILI SİLİKA NANOPARTİKÜLLERİN SERBEST  
BIRAKILMASI**

TAŞBAŞI, Behiye Büşra  
Yüksek Lisans Tezi, Biyoteknoloji Bölümü  
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP  
Aralık 2019, 72 Sayfa

*Listeria monocytogenes* gıda kaynaklı patojen mikroorganizmalar arasında en yüksek ölüm oranlarına sahip bakterilerdendir ve özellikle çocuklar, yaşlılar, hamile kadınlar ve immün sistemi zayıf olan hastalar için yaşamsal tehdit oluşturabilmektedir ve bu nedenle bu çalışmada geliştirilen biyosensör için model organizma olarak kullanılmıştır. Aptamerler, patojenik bakterilerin yüzey antijenleri dahil olmak üzere yüksek afiniteli ve özgüllükle hedeflere bağlanan kısa, tek sarmallı oligonükleotitlerdir ve hastalık teşhisi veya tedavisinde kullanılma potansiyelleri bulunmaktadır. Yanal akış kromatografisi formatındaki biyosensörler, maliyeti düşük olması ve anlık sonuçlar için kolay yorumlanması nedeniyle çok sık kullanılan ve araştırılan bir biyosensör çeşididir. Yanal akış sistemleri bu ve bunun gibi gıda patojenlerinin hızlı tespiti için ucuz ve kolay bir yöntem olduğu için sıklıkla tercih edilmektedir. Bu çalışmada patojen *L.monocytogenes* (ATCC7644) suşunun tespiti için aptamer kapılı mezoporöz silika parçacıklar ile yanal akış sistemi kullanılmıştır. Mezoporöz silika nanopartiküller içindeki sinyal moleküllerinin salınımı aptamer kapı yapıları ile düzenlenmiştir. Sinyal moleküllerini içeren nanopartiküller kongujat pedine sabitlenmiş ve aptamer-hedef etkileşiminin yüksek duyarlılık ile tespit edilebilmesi amaçlanmıştır. Doğranmış tavuk eti numunesinin 1 ml'sinde 5 dakikada 53 *L.monocytogenes* hücrelerine kadar tespit edilebildiği çalışmada elde edilen veriler doğrultusunda gösterilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer, Biyosensör, *Listeria monocytogenes*, Silika Nanopartikül

**ABSTRACT****LABEL-FREE LATERAL FLOW ASSAY FOR *Listeria monocytogenes* BY  
APTAMER-GATED  
RELEASE OF SIGNAL MOLECULES**

TAŞBAŞI, BEHİYE BÜŞRA  
MSc in Biotechnology Program  
Supervisor: Prof.Dr. Veli Cengiz ÖZALP  
November 2019, 72 pages

*Listeria monocytogenes* is food patojen bacteria has the highest death rate among borne pathojenic microorganisms and can be a life threatening threat especially for children, the elderly, pregnant women and patients with weak immune systems and is therefore used as a model organism for the biosensor developed in this study. Aptamers are short, single-stranded oligonucleotides that bind to targets with high affinity and specificity, including surface antigens of pathogenic bacteria, and have the potential to be used in the diagnosis or treatment of disease. Biosensors in lateral flow chromatography format are a widely used and researched type of biosensor because of their low cost and easy interpretation for instant results. Lateral flow systems are often preferred because they are an inexpensive and easy method for the rapid detection of such and similar food pathogens. In this study, aptamer gated mesoporous silica nanoparticles and lateral flow system were used for the detection of pathogen *L. monocytogenes*(ATCC7644) strain. The release of signal molecules in mesoporous silica nanoparticles is regulated by aptamer gate structures. The nanoparticles containing the signaling molecules were fixed to the conjugate pad and it was aimed to detect the aptamer-target interaction with high sensitivity. This strip biosensor can determine *L. monocytogenes* in minced chicken matrix less than 5 min with a limit of detection (LOD) of 53 cells in one mL of samples.

**Keywords:** Aptamer, Biosensor, *Listeria monocytogenes*, Silica Nanoparticle

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez danışmanın olan sayın Prof. Dr. Veli Cengiz ÖZALP'a tüm laboratuvar çalışmaları ve tez yazım süresi boyunca sürekli destekleri ve motivasyonları için teşekkürü borç bilirim. Yüksek lisans süreci boyunca maddi ve manevi destekleri ve yol göstermeleri benim için çok kıymetli ve verimli bir süreç geçirmemi sağladı.

Laboratuvar çalışmalarında ve tez yazım süreci boyunca yardımlarını asla esirgemeyen değerli hocalarım Mert SUDAĞIDAN ve Dr. Buket ÇAKMAK GÜNER'e,

Deneyisel olarak birlikte çalıştığımız ve birlikte öğrendiğimiz tez yazım sürecim boyuncada desteklerini bir an olsun esirgemeyen sevgili laboratuvar arkadaşım Elif Esmâ ACAR ve Mediha Nur Zafer YURT'a

Deney süreçlerimi geçirdiğim ve alt yapısını kullandığım KİT-ARGEM'e ( Yeni Nesil Gıda Kit ve Referans Madde Araştırma ve Geliştirme Merkezi)

1150065 nolu proje ile destek aldığım TÜBİTAK'a

Ve son olarakta tüm hayatım boyunca maddi manevi desteklerini benden bir an olsun esirgemeyen her kararında ve hayatımdaki tüm süreçde en büyük desteğim olan aileme teşekkür ederim.





**YEMİN METNİ**

Yüksek Lisans Tezi olarak sunduğum “ETİKETSİZ YANAL AKIŞ İLE *Listeria monocytogenes*'e KARŞI APTAMER KAPILI SİLİKA NANOPARTİKÜLER KULLANARAK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ ”adlı çalışmanın tarafımdan bilimsel ahlak ve geleneklere aykırı düşecek bir yardıma başvurmaksızın yazıldığını ve yararlandığım eserlerin bibliyografyada gösterilenlerden oluştuğunu, bunlara atıf yapılarak yararlanılmış olduğunu belirtir ve bunu onurumla doğrularım.

13/01/ 2020

Behiye Büşra TAŞBAŞI



**İÇİNDEKİLER**

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	v
ABSTRACT .....	vi
TEŞEKKÜR .....	vii
İÇİNDEKİLER.....	x
ŞEKİLLER LİSTESİ .....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR .....	xiv
1. GİRİŞ .....	1
2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI .....	4
2.1 Biyosensör Sistemleri.....	4
2.1.1 Biyoreseptörler.....	5
2.1.2 Dönüştürücüler.....	8
2.1.2.4 Yanal akışlı biyosensörler.....	10
2.1.3 Biyosensörlerin uygulama alanları ve kullanımları .....	10
2.2 Nanopartiküller .....	17
2.2.1 Silika Nanopartiküller .....	18
2.3 Aptamer .....	20
2.3.1 Aptamer avantajları .....	23
2.3.2 Aptamerlerin Dezavantajları.....	24

2.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	25
2.4.1 <i>L. monocytogenes</i> tanısında klasik yöntemler .....	28
3. YÖNTEM.....	31
3.1 Silika Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu .....	32
3.2 Aptamer Kapılı Nanopartiküllerin Sentezi.....	33
3.3 Bakteriyel Büyüme .....	33
3.4 SPR Deneyleri .....	34
3.5 Serbest Bırakma Deneyleri.....	35
3.6 Yanal Akış Strip Denemeleri.....	36
3.7 Strip Deneyleri ve Gıda Örnekleri .....	36
3.8 İstatistiksel Analizler.....	37
4.BULGULAR .....	38
4.1 SPR ile Afinite Analizleri.....	38
4.2 Silika Nanopartikül ve Aptamer Analizleri .....	41
6.TARTIŞMA ve SONUÇ .....	49
7. KAYNAKLAR DİZİNİ .....	54

## ŞEKİLLER LİSTESİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 Yanal akış strip test sistematik gösterimi.....	1
2.1 Biyosensörün temel kısımları.....	4
2.2 Biyoresptör çeşitleri.....	5
2.3 Ticari biyosensörler.....	16
2.4 Mezoporöz Silika Nanopartikül.....	18
2.5 Aptamerlerin bağlantı konfigürasyonları.....	21
2.6 SELEX döngüsü.....	22
2.7 Amerika Birleşik Devletlerindeki Bakteri Kaynaklı Salgın ve Hastalıklar Tablosu.....	27
2.8 Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar.....	30
3.1 Çalışmada kullanılan aptamer dizileri.....	31
3.2 Altın çip üzerinde immobilizasyon katmanları.....	35
4.1 <i>L. monocytogenes</i> 'e hedeflenmiş aptamerler A15 ve A15HP' nin SPR ile afinite analizi.....	39
4.2 <i>L. monocytogenes</i> , <i>L. innocua</i> ve <i>E. coli</i> hücrelerinin maksimum bağlanma sonuçları.....	40
4.3 Mezoporöz silika nanopartikül karakterizasyonu.....	41
4.4 Kapılı ve kapısız aptamer ile TMB salınımı.....	42
4.5 TMB'nin farklı diziler ile salınımı.....	43
4.6 Aptamer kapılı nanopartiküller ve sadece TMB ile strip denemeleri.....	44
4.7 Strip deneylerindeki yaoğunluk farklarının grafik gösterimi.....	45

4.8 Doğranmış tavuk örnekleri ile aptamer kapılı silika nanopartiküller ile bakteri varlığının tespit edilmesi.....	46
---	----



**SİMGELER VE KISALTMALAR****Simgeler****Açıklama**

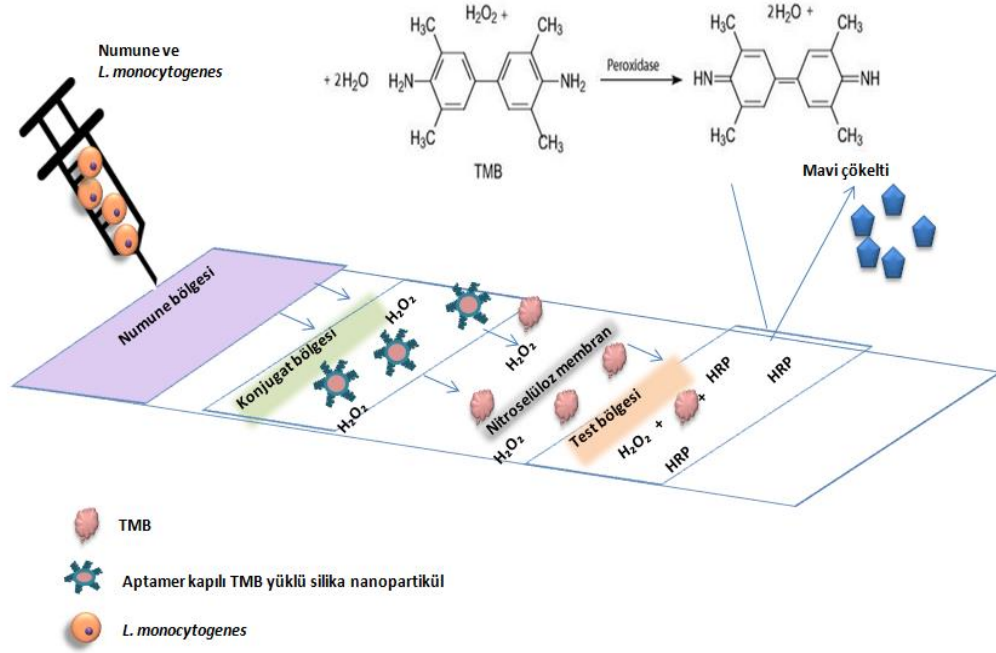
° C	Santigrat Derece
µg	Mikrogram
g	Gram
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojenperoksit
HCl	Hidroklorik asit
Hg <sup>+2</sup>	Civa
KCl	Potasyum Klorür
M	Molar
ml	Mililitre
NaCl	Sodyum Klorür
NaOH	Sodyum Hidroksit
nM	Nano molar
nm	Nanometre
nt	Nükleotit
O <sub>2</sub>	Oksijen
SiO <sub>2</sub>	Silisyumdioksit

**Kisaltmalar****Açıklama**

AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
BET	Brunnauer, Emmett ve Teller
BOD	Biyolojik Oksijen İhtiyacı
CFU	Colony Forming Units

CTAB	N-setiltrimetilamonyum bromür
DLS	Dinamik Işık Saçılımı
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EFSA	European Food Safety Authority
HCG	Human Chorionic Hormon
HRP	Horse Radish Peroxidase
ILTEK	İleri Teknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
Kd	Ayrışma Sabiti
kob/g	Koloni oluşturan Birimi
LFA	Lateral Flow Assay
LOD	Limit of Detection
PBS	Phosphate Buffered Saline
ppb	Parts Per Million
Rmax	Maksimum bağlanma değeri
RNA	Ribo Nükleik Asit
SELEX	Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment
SPR	Surface Plasmon Resonance
TEM	Transmisyon Elektron Mikroskobu
TEOS	Tetraetoksisilan
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine
TSA	Trypton Soya Agar

## 1. GİRİŞ



Şekil 1.1: Yanal akış strip test sistematik gösterimi

Biyosensörler hızlı, ucuz ve kolay tespit yapabilen ve sıklıkla kullanılan sensör sistemlerdir. Farklı alanlarda kullanılabilmesi yanında hedefe özgü ürünler tasarlamaya imkan tanınması bakımından biyosensörler bir çok farklı versiyonu ile üzerinde çalışılan bir konu olmuştur. Biyosensörlerin popüler olmasının en temel sebeplerinden biri de, basit talimatlara uyarak herhangi bir uzmanlık gerektirmeksizin herkes tarafından kullanılabilir olmasıdır. Ticari olarak da bu kadar önemli olan biyosensör sistemlerinin birçok farklı uygulama ile tasarlanabilmesi, biyosensörlerin günlük hayatımızda sağlığımızın takibini sağlaması ve hayatımızı kolaylaştırması yeni biyosensörlerin geliştirilmesinin önemini ve gerekliliğini arttırmıştır.

Yanal akış testleri ile kağıt yüzeyler kullanarak strip formu biyosensörler kolay kullanımı ve hızlı sonuç vermesi ile en sık kullanılan biyosensör çeşitlerindedir.



Gebelik testleri bu biyosensörün en bilinen ve en sık kullanılan örneklerinden biridir. Yanal akış strip testleri görsel ve sabit sonuçlar verdiği için uygulaması basit, güvenilirliği ve doğruluğu yüksek olduğu için sıklıkla tercih edilen bir biyosensör sistemidir.

Aptamerler yüksek spesifite ile istenilen hedefe yönelik seçilebilmesi gibi avantajları olan DNA ya da RNA molekülleridir. Bu moleküller kısa (2-100) nükleotit uzunluklarındadır. İnorganik ya da organik birçok farklı moleküle karşı DNA bilgisiyle ya da direkt olarak hedef molekül ile muamele yapılarak seçilebilmeleri ve seçim sürecinde birçok farklı yolun izlenilebilmesi aptamerlerin en büyük avantajlarındanıdır.

*L. monocytogenes* sıklıkla görülen bir gıda patojeni olmamakla birlikte ölüm oranı bazı hasta grupları için en yüksek olan bakterilerdendir. Yaşlılar, çocuklar, hamile kadınlar ve immün sistemi zayıf olan insanlar için çok ölümcül sonuçlar doğuran bir bakteri olabilmektedir. *L. monocytogenes*'in zorlu şartlarda özellikle düşük sıcaklıklarda yaşamsal faaliyetlerini devam ettirebilmesi ve biyofilm oluşturması, bu bakteriyi endüstriyel sistemler için de bulaştığı zaman uzaklaştırması çok zor bir mikroorganizma haline getirmektedir. *L. monocytogenes*'in gıda içerisinde hızlı çoğalabilmesi ve tespitinin zaman alması toplum sağlığı için risk oluşturabilmektedir. Bu çalışmamızda *L. monocytogenes*'in hızlı, doğru ve düşük miktarlarda tespit edilebilmesi amacıyla aptamer kapılı silika nanopartiküller yanal akış sisteminde kullanılmıştır. Aptamer kapılı silika nanopartiküller ile sinyal moleküllerinin salınımı düzenlenmiştir.

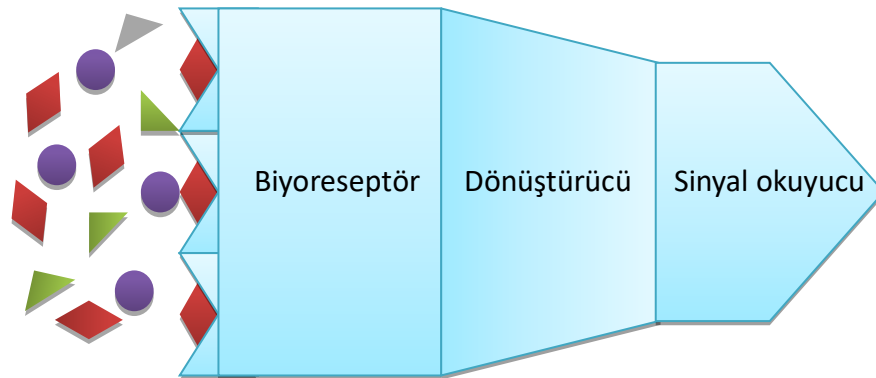
Bu çalışmada yanal akış sisteminde, aptamer kapılı silika nanopartiküller konjugasyon pedine sabitlenerek yüksek duyarlılıklı ve seçicilikli bir biyosensör sistemi tasarlanmıştır. Silika nanopartiküller yüzey modifikasyonunun kolaylığı nedeniyle seçilmişlerdir. Aptamer kapılı silikananopartiküller kullanılarak yapılan bu biyosensör sistemi *L. monocytogenes*'in tespitinde yüksek hassasiyet ve özgüllük göstermiştir. Doğranmış tavuk etinin 1ml numunesinde 5 dakikada 53 hücrelik bir tespit limitine (LOD) ulaşılmıştır.



## 2. LİTERATÜR ARAŞTIRMASI

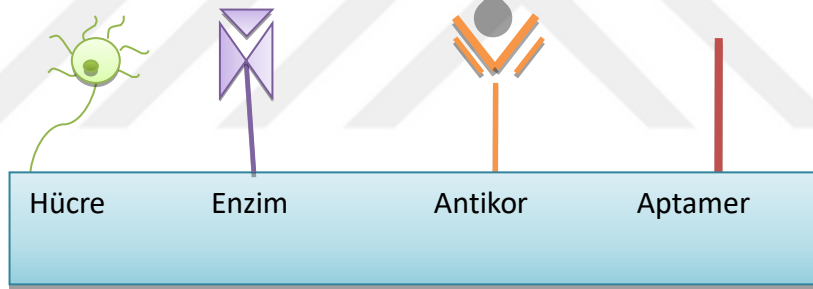
### 2.1 Biyosensör Sistemleri

Günümüzde Biyosensör tanımı "International Union of Pure and Applied Chemistry" (IUPAC) tarafından "kimyasal bir son ürüne karşı verilen biyolojik yanıtları optik, elektrokimyasal ya da termal sinyal sistemlerine dönüştürerek ölçen sistemlerdir" diyerek yapılmıştır (Asal vd.,2018). İlk biyosensör sistemleri ve tanımlamaları Leland C Clark Jnr (1918–2005) tarafından yapılmıştır. İlk biyosensör sistemi (1956) kandaki O<sub>2</sub> derişiminin bir elektrot ile ölçümü ile başlamıştır. Clark bu sistemi "Clark elektrodu" olarak tanımlamıştır. Leland Clark "biyosensörün babası" olarak da bilinmektedir. Leland C Clark ve Champs Lyon 1962'de kandan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ile glikoz analizi yapmıştır. 1977'de ise ilk kez biyosensör tanımı yapılmıştır (Şentürk vd., 2018).



Şekil 2.1: Biyosensörün temel kısımları

Biyosensörler yakın tarihte keşfedilmesine rağmen bu süreçte hızlı bir gelişim ve farklı alanlarda kullanım potansiyeli göstermişlerdir. Biyosensörler hızlı, doğru, ucuz ve kolay kullanımı açılarından kullanıcılar tarafından sıklıkla tercih edilmektedir. Biyosensörler temelde bir biyoreseptör, dönüştürücü ve sinyal okuma kısımlarından oluşmaktadır (Şekil 2.1). Biyoreseptör kısmı enzimler, antikorlar, nükleik asitler, monoklonal antikorlar, yapay iyon kanalları, hücreler, dokular ve aptamerlerden oluşabilir (Şekil 2.2). Dönüştürücü kısmı gelen örneğe karşı verilen yanıtın ölçülebilir sinyal çeşitlerine dönüştürüldüğü alandır. Sinyal okuma kısmı verilen yanıtın görsel olarak görünür kılındığı yerdir. Biyosensör sistemleri biyoreseptör ve dönüştürücü kısımlarının farklı fiziksel ve kimyasal çalışmalarına göre adlandırılır.



**Şekil 2.2:** Biyoreseptör çeşitleri

### 2.1.1 Biyoreseptörler

Biyoreseptör çeşitlerine ve kullanımına göre biyosensörler farklılaşabilir. En sık kullanılan biyoreseptörlerden bazıları enzim temelli, antikor/antijen temelli, tüm hücre temelli ve aptamer temelli biyoreseptörlerdir.

### **2.1.1.1 Enzim temelli biyoreseptörler**

Biyosensör sistemlerinde kullanılan ilk sistem enzim temelli sistemdir. 1962’de Clark ve Lyons ve 1967’de Updike ve Hick kandan glukoz tayinine yönelik olarak glikoz oksidaz enzim kaplı elektrotları kullanmışlardır (Kökbaş vd., 2013). Enzim ve analit arasındaki süreç ile uygulama yapan biyosensörlere enzimatik biyosensör de denilir. İlk kullanılan ve iyi bilinen bir molekül olması nedeniyle enzim temelli biyoreseptörler oldukça sık kullanılmaktadır. Enzim analit affinitesi yüksektir. Biyoreseptör olarak enzim kullanımından dolayı oluşan pH, ısı, analit yoğunluğu ve diğer çevresel koşullardan etkilenirler (Asal vd., 2018). Enzim temelli biyoreseptörler ile ilaç aktif maddesi, gıda, vitamin, mineral ve antibiyotik gibi küçük moleküllü organik ve anorganik maddeler tespit edilebilir (Neethirajan vd., 2018).

### **2.1.1.2 Antikor temelli biyoreseptörler**

Antikor bağışıklık sisteminin önemli bir parçasıdır. Antijenler ise vücutta antikor üretimini teşvik eden yabancı ya da vücudun yabancı algıladığı yapılardır. Antijen ya da antikor temelli biyosensörler immünosensörler olarak da adlandırılırlar. Antijen veya antikorlar ile yüksek spesifiklikte bağlanma sağlayan sensörler yapılmaktadır. Bu biyoreseptörlerin dezavantajı her moleküle karşı elde edilmesi ve stabilizasyonunun zor olmasıdır (Asal vd., 2018). İmmünosensörlerin yüksek üretim maliyeti, karmaşık sistemleri ve uzman kullanıcı ihtiyacı ve oda sıcaklığında muhafaza edilememesi gibi dezavantajları vardır. İmmünobiyosensörler virüsler ve patojen mikroorganizmalar gibi immün yanıt oluşturan canlılara karşı kullanılabilir.

### **2.1.1.3 Tüm hücre temelli biyoreseptörler**

Bu biyoreseptörlerde bir ya da birden çok canlı hücre çeşidi kullanılabilir. Canlı ya da cansız hücrelerin sabitlenmesi ve ortamdaki analite karşı verdiği tepkilere göre biyosensör tasarlanabilir. Tüm hücre biyoreseptörlerin avantajı olumsuz şartlara dayanıklı olmaları ve geniş aralıklarda kimyasal sentezleyebilme kapasiteleridir. Tüm hücre biyoreseptörlerde orijinal mikroorganizma ya da genetik modifiye mikroorganizmalar kullanılabilir. Tüm hücre sensörlerdeki dezavantaj istenilmeyen metabolitlerin oluşabilmesi ve düşük özgül aktivite gibi durumlardır. Tüm hücre biyoreseptörler toksik, mutajenik maddelere karşı ve BOD (biyolojik oksijen ihtiyacı) analizi için kullanılabilirler (Nivens vd., 2004)

### **2.1.1.4 Aptamer temelli biyoreseptörler**

Reseptör olarak tek zincirli DNA ya da RNA parçalarının kullanıldığı sistemlerdir. Bu biyoreseptör sistemleri ortamdaki immobilize haldeki tek zincirli DNA'nın analite tutunmasını ve sinyal vermesi üzerine çalışmaktadır (Asal vd., 2018). Aptamer temelli biyoreseptörün en önemli avantajı birçok farklı hedef molekülüne yönelik olarak tespit edilmesi ve standart olarak sentezlenebilmesidir. Aptamerler kolay kullanımı, oda sıcaklığında muhafaza edilebilmesi ve düşük üretim maliyeti gibi avantajlara da sahiptir. Aptamerler, SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) ile ilaç ve kimyasal ham maddelerine, proteinlere, küçük-

büyük moleküllere ve hücrelere göre hedeflenip seçilebilmektedir (Hong ve Sooter 2015).

## **2.1.2 Dönüştürücüler**

Dönüştürücüler oluşturulan biyolojik yanıtı karşı oluşan sinyal moleküllerinin okunabilir ya da gözlemlenebilir forma dönüştürüldüğü sistemlerdir. En sık kullanılan dönüştürücü formları optik tabanlı, elektrokimyasal tabanlı, kağıt tabanlı biyosensörler en sık kullanılan biyosensör dönüştürücü sistemleridir.

### **2.1.2.1 Optik tabanlı biyosensörler**

Optik dönüştürücülü biyosensörlerde analit ile biyoreseptör kısmının bağlanması sonucu optik bir sinyal ile yanıt oluşturulur. Analit ile biyosensörü reaksiyonu sonucu oluşan konsantrasyon değişimi, kütle değişimi, ışık değişimi gibi farklı sinyalleri optik sinyallere dönüştürerek çalışır. Bu optik sinyal; görünür ışık, kızılötesi, yüzey plazmon rezonansı (SPR), biyolojik ışıldama, kimyasal ışımaya ya da fotoemiyon şeklinde olabilir (Şentürk vd., 2018). SPR analizi altın yüzey üzerine istenilen biyoreseptörün immobilize edilmesi ile akış verilen analitin sinyal olarak takibi sayesinde yapılmaktadır. SPR ile patojen bakteri tespiti, protein tespiti, küçük ve büyük moleküllerin etkileşimleri izlenilmektedir. Optik tabanlı biyosensörler yüksek hassasiyetleri sayesinde kullanım avantajı sağlamaktadır (Syam vd., 2012).

### **2.1.2.2 Elektrokimyasal tabanlı biyosensörler**

Elektrokimyasal tabanlı biyosensörler ilk kullanılan sensör tipinin de dönüştürücüsüdür. Uzun zamandır kullanılan ve üzerinde en çok çalışılan dönüştürücü sistemlerinden biridir. Elektrokimyasal tabanlı biyosensörler genelde enzim biyoreseptörler ile birlikte kullanılmaktadırlar. Biyoreseptöre tutunan analit enzimsel süreç ile dönüştürülür, dönüşüm sonrası elektrokimyasal dönüştürücü tarafından madde derişimi sinyale dönüştürülür (Kökbaş vd., 2013). Elektrokimyasal tabanlı sensörler; amperometrik/voltmetrik, potansiyometrik ya da kondüktrometrik (yarı iletken) esaslı olabilmektedir. Reaksiyon sırasında elektrik potansiyelinin üretilmesine neden olan biyoreseptörler potansiyometrik dönüştürücüler ile kullanılırlar. Reaksiyon sırasında elektron üretimine neden olan biyoreseptörler amperometrik dönüştürücüler ile kullanılırlar. Optik yöntemlere göre elektrokimyasal yöntemler bazı numunelerde çalışma kolaylığı sunmaktadır. Elektrokimyasal yöntemlerin dezavantajı ise spesifik seçilimin düşük olmasıdır (Malekghasemi, 2015).

### **2.1.2.3 Termal tabanlı biyosensörler**

Bu tip biyosensörlerde dönüştürücü reaksiyon sırasında oluşan ısı farklarını kullanarak sinyal oluşturur. Genellikle enzim biyoreseptörler ile birlikte kullanılırlar. Reaksiyon sonucu oluşan ısı farkı analit yoğunluğu ile karşılaştırılarak sinyal oluşturulur. Genellikle pestisit ve patojenikbakterilerin analizlerinde kullanılırlar (Syam vd., 2012).



#### **2.1.2.4 Yanal akışlı biyosensörler**

Yanal akışlı biyosensör sistemlerinde genellikle selüloz kağıt kullanılmaktadır. Kağıt doğal yapısı gereği hidrofildir ve sıvı matriks üzerinde taşınır. Kağıt tabanlı biyosensörler nükleik asit, metal iyonları, patojen mikroorganizma ve kök hücre tespiti gibi farklı moleküllerin ve yapıların tespiti için kullanılabilir. Yanal akışlı biyosensörlerin en büyük avantajı karmaşık ve pahalı cihazlar yada uzman kullanıcılar gerektirmeksizin kolay, hassas ve hızlı görsel tespit yapabilmesidir. Yanal akış sistemleri günlük hayatta gebelik testi ve strip testler olarak sıklıkla kullanılan testler olarak karşımıza çıkmaktadır.

Yanal akış sistemlerinde aptamerlerin kullanılması durumunda sistem yanal akış aptasensörü (LFA) olarak adlandırılır. Aptamerlerin yanal akış sistemlerinde kullanılması ile spesifiklik ve hassasiyet artırılabilir. Aptamerler hedefe göre seçilip sentezlenebildiği için kullanım alanı genişleyebilmektedir (Wu vd., 2019).

#### **2.1.3 Biyosensörlerin uygulama alanları ve kullanımları**

Biyosensörler medikalde, çevre ve ekosistemde, endüstriyel üretim süreçlerinde, giyilebilir teknolojilerde, tıpta, eczacılıkta ve savunma sanayisigibi birçok alanda kullanılabilir. Biyosensörlerin en büyük kullanım avantajı hızlı, spesifik ve yerinde yapılan uygulama testlerine olanak sağlamasıdır (Dong ve Chen, 2002).Biyosensörler ile ilgili gerçekleştirilmiş çok sayıda çalışma bulunmaktadır. Bu

çalışmalar haricinde günümüzde ticari olarak kullanılan birçok biyosensör de vardır (Justino vd., 2017).

Biyosensörlerin bu kadar hızlı bir şekilde kullanılmasına sebep olan üstün özellikleri spesifik bağlanma başarısı, katalitik verimleri, elektron transferleri gibi durumlardır. Biyosensörlerin dezavantajları ise pH, sıcaklık, oksitleyici ajanlar ve enzimatik bozulmalardır. Dezavantajların üstesinden gelmek için hedeflenmiş tasarım değişiklikleri, protein ve nükleik asitlerin yönlendirilmiş evrimi, kararlılık geliştirme çalışmaları yapılmaktadır.

İdeal bir biyosensörde bulunması gereken özellikler; duyarlılık, seçicilik, ölçüm aralığı, ölçüm zamanı, tutarlılık, cihaz ömrü, kararlılık ve kullanıcı dostu olması olarak sınıflandırılabilir. Duyarlılık testin analitteki en düşük değişime cevap verebilmesidir. Seçicilik testin sadece hedeflenen analize özgünlüğü ve diğer benzer analitlere cevap vermemesi durumudur, aynı zamanda seçicilik içinde test karıştırma, pH ve sıcaklık gibi parametrelerden etkilenmemelidir. Ölçüm aralığı, testin en düşük ve en yüksek analit konsantrasyonlarında çalışabildiği aralıktır. Ölçüm zamanı, testin analite cevap verdiği minimum aralıktır. Tutarlılık, testin sonuçlarının her ölçümde aynı standartta çalışması, elektriksel parazitlerden ve diğer dış koşullardan etkilenmemesi durumudur. Cihaz ömrü, kullanılan test yönteminin bir hataya sebep olmadan çalıştığı en uzun süredir. Kararlılık, belirli bir sürede testin normal depolama ve kullanım koşullarında duyarlılığında yaşanan değişimlerdir. Testin kullanıcı dostu olarak taşınabilir, küçük, biyoyumlu, kullanımı kolay ve kullanışı basit bir ara yüze sahip olması, uygun fiyatlı olması ve kalifiye eleman gerektirmemesi gibi özelliklere sahip olması gerekir. Tüm bu

özelliklerden yana başarılı olan bir biyosensör aynı zamanda bir pazara ve kullanıcılar tarafından benimsenmeye ihtiyaç duyar.

Literatürdeki biyosensör uygulamaları ve denemelerinden bazıları:

Liu vd., (2017) yaptıkları çalışmada gıda örneklerinde kanamisin varlığını tespit edebilmek için aptamer ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller kullanmışlar. Çalışmada DNA kaplı gümüş nanopartiküller sinyal molekülü olarak kullanılmıştır. Bu çalışmada yanal akışlı strip test yöntemi ile deney 10 dakikalık inkübasyon süresinde tamamlanır ve görsel tespit limiti 35nM'dır.

Wang vd., (2017) *L. monocytogenes* tespitine yönelik çoklu çapraz yer değiştirmeli (MCDA) etiketli altın nanopartiküller kullanarak yanal akış biyosensör denemeleri gerçekleştirmişlerdir ve çalışmada yanal akışlı biyosensörün diğer test edilen patojenlerden *L. monocytogenes*'i ayırdığını tespit etmişlerdir.

Pisamayarom vd., (2017) *L. monocytogenes*'in tüketime hazır deniz ürünlerinde tespitine yönelik yaptıkları çalışmada, *L. monocytogenes*'in *hlygeni* DNA amplifikasyonu ve SYBR GOLDTM yoluyla floresan sinyal tespiti ile amaçlanmaktadır. 4,5 saatlik test süresinde 50g numunede en az 100 hücreye kadar tespit ettiği raporlamışlardır.

Savaş, (2018) altın nanopartikül işaretli biyosensör ile *Escherichia coli*'yi hızlı ve duyarlı tespiti üzerine elektrokimyasal biyosensör üzerine çalışmıştır. Bu çalışmada enzim ile immobilize edilmiş sekonder antikorlar, enzim ve sekonder antikor ile modifiye edilmiş altın nanopartiküller ile değiştirilerek kullanılmıştır. Daha öncesinde 50 CFU/ml olarak rapor edilen tespit değerinin çalışma sonrası 38 CFU/ml'ye düşürüldüğü rapor edilmiştir.

Borsa vd., (2016) yaptıkları çalışmada kan örneklerinden *Staphylococcus aureus* tespiti için silika nanopartikül-oligonükleotitli konjugatlar üzerine çalışmışlardır. *S.aureus* bakterilerinden salgılanan spesifik bir nükleazın aktivitesi tespit edilmiştir. Kan numunelerinden floresans miktar tayini için silika nanopartiküller kullanılmış ve tam kanda 682 CFU seviyesine kadar *S. aureus* hücrelerinin spesifik tespiti yapılabildiği rapor edilmiştir.

Tominaga., (2019) yanal akış strip testleri kullanarak koliform bakterilerin tespiti üzerine yaptığı çalışmada, 7 ayrı koliform bakterisinin 3 ayrı gıda örneğinden (tavuk, sığır ve domuz eti) 8 saatlik inkübasyon sonrası tespit edildiği gösterilmiştir. Çalışmada nitroselüloz membran ve kolloidal nanopartiküller kullanılmıştır.

Tombelli vd., (2004) HIV-1 Tat proteininin tespiti için RNA aptamer bazlı biyosensörler tasarlamışlardır. SPR analizi ile altın yüzeye immobilize edilmiş kuvars kristalleri ile biyotin bağlı primerlerin avidin afinitesinden faydalanarak çalışılmıştır. RNA aptamerlerinin HIV-1 Tat'a çok benzeyen Rev proteinine afinite göstermediği bildirilmiştir.

Li vd., (2007) yaptıkları çalışmada elektrogenere kemilüminesans aptamer (ECL AB) bazlı biyosensör ile kokain tespitine yönelik çalışmışlardır. Altın elektrot üzerine immobilize edilmiş aptamerler (ECL AB) ile  $1.0 \times 10^{-9}$  M en az tespit sınırı (LOD değeri) olduğu bildirilmiştir.

Zhang vd., (2012) yaptıkları çalışmada sulu ortamdaki civa varlığını tespit etmek için DNA kapaklı mezoporöz silika nanopartiküller kullanmışlardır. Sulu ortamda  $Hg^{+2}$  iyonlarının varlığında DNA aptamerleri gözeneklerden kurtulurlar ve floresan sinyali takibi ile sistem çalışır. Sistemin 20 dakikadan az sürede 4 ppb'ye kadar tespit edebildiği rapor edilmiştir.

Bayramoglu vd., (2018) aptamer ile özelleştirilmiş manyetik silika kullanarak süt örneklerinde *Salmonella* tespiti üzerine çalışmışlardır. Yapılan çalışmada manyetik parçacıklar ve silika MCM-41 silika nanopartiküller kullanılmıştır. Bu yöntem ile süt örneklerinde  $10^3$  CFU/ml konsantrasyonuna kadar floresan ölçüm yapılmıştır.

Özalp vd., (2013) 'nin çalışmasında enzimler poliakrilamid matrisinde korunup tutunmaktadır. Yanal akış biyosensör kullanarak hidrojen peroksit konsantrasyon ölçümü için hızlı ve hassas bir çözüm olarak görülmüştür.

Akademik olarak biyosensörler sıklıkla araştırılan bir konu olmasının yanında ticari olarak da büyük bir öneme sahiplerdir. Günlük hayatın içinde birçok alanda kullanılan biyosensörler vardır.

Kandan şeker ölçümü yapan cihazlar ile çok az bir miktar (0.3 µl) çok hızlı sürelerde (1 dakikadan az) ve kolay şekilde ölçüm yapabilmektedir (Şekil3-A)(Yasa, 2019).

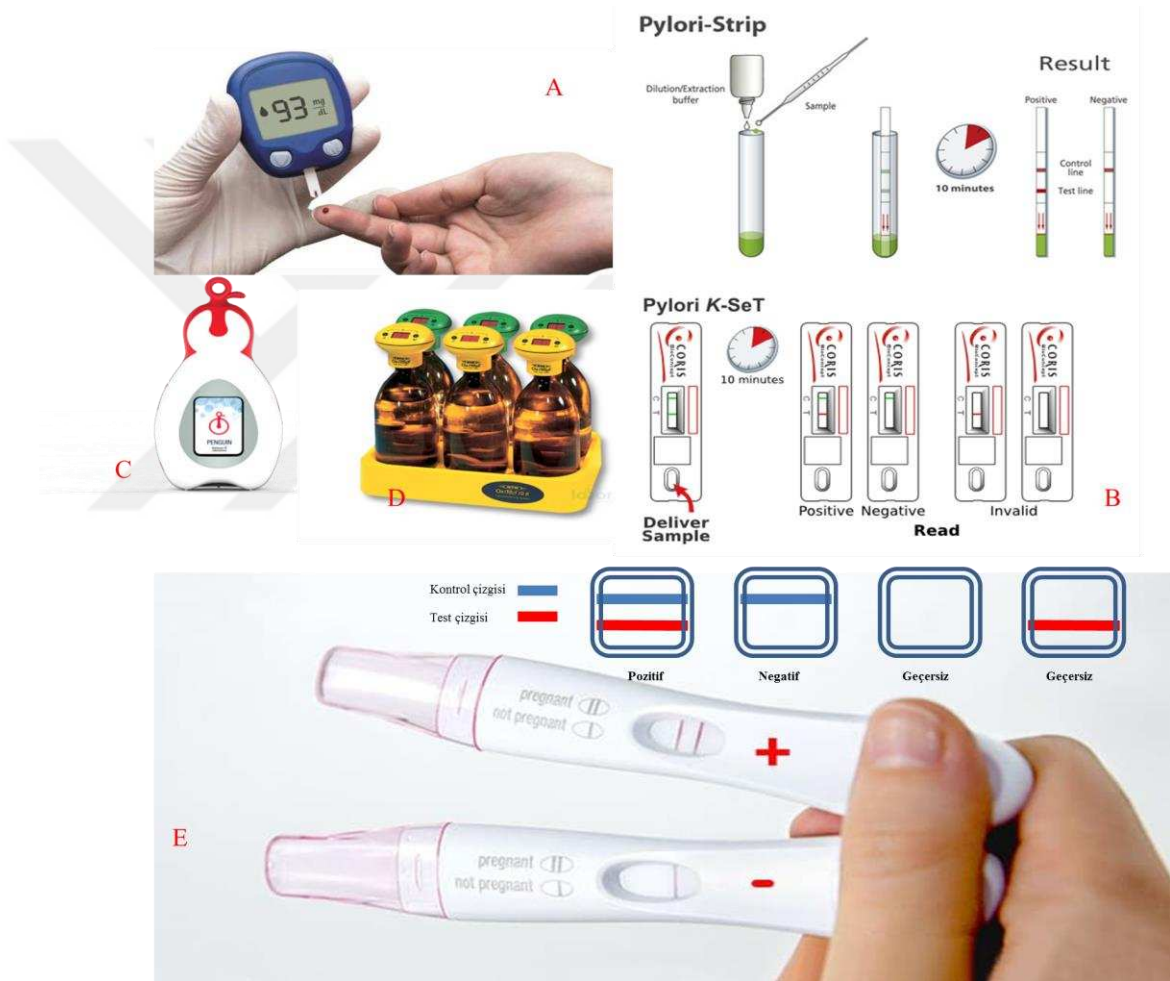
Pylori K-SeT strip testi ile mide de yaşayan ve mide ülseri başta olmak üzere kanser de dahil birçok hastalığa sebebiyet veren *Helicobacter pylori*'nin hızlı ve yüksek seçicilik ile tespit ve tedavisi sağlanabilmektedir (Şekil3-B)(Crealys, 2019).

Penguin sensör sistemi et, kanatlı hayvan, balık ve mandıra ürünlerinde antibiyotik varlığını tespit etmek üzerine analiz yapabilmektedir. Bu biyosensör aynı zamanda meyve sebzelerde pestisit analizi ve tüm gıda ürünlerinde pH, tuzluluk ve şeker analizi de yapabilmektedir (Şekil3-C)(Biosensor, 2019).

BOD (Biyolojik oksijen ihtiyacı) analizi sistemleri ile atık sulardaki organik kirliliğin ölçümü hızlı bir şekilde yapılabilmektedir. Klasik yöntemler ile 5 gün süren analizler tüm hücre biyosensör sistemi ile ölçüm süresi 15 dakikaya düşürülebilmektedir. Biyoresptör olarak *Trichosporon cutaneum*, *Pseudomonas*, *Clostridium* ve *Bacillus* türlerini biri ya da birden çoğu karışık olarak kullanılabilir (Şekil3-D)(Sentez, 2019).

Gebelik testleri ile idrardaki HCG (Human Chorionic Hormon) isimli hormon ile strip test formatında hızlı ve kolay bir kullanım şekli ile tüketiciler tarafından sıklıkla kullanılan bir biyosensör örneğidir (Şekil3-E)(Eserdağ, 2019).

Nanocanary toksitite ölçümü ile karbon nanomateryallerin içindeki canlı hücreler ile toksik gaz salınımına karşı verilen cevabı ölçecek bir biyosensör sistemi çalışmaktadır. Biyosensör maden ya da inşaat sahası toksik alanlarda erken tespiti amaçlasa da gelecekte hücrelerin ilaca verdiği tepkileri ölçmek, ilaç dozajlama ve hayvan deneylerinin önüne geçmek için de kullanılabilceği düşünülmektedir (Pacific, 2019).



**Şekil 2.3:** Ticari biyosensörler: A) Şeker ölçüm cihazı, B) Pylori K-Set, C) Penguin biyosensör, D) BOD analiz cihazı, E) Gebelik testi.

## 2.2 Nanopartiküller

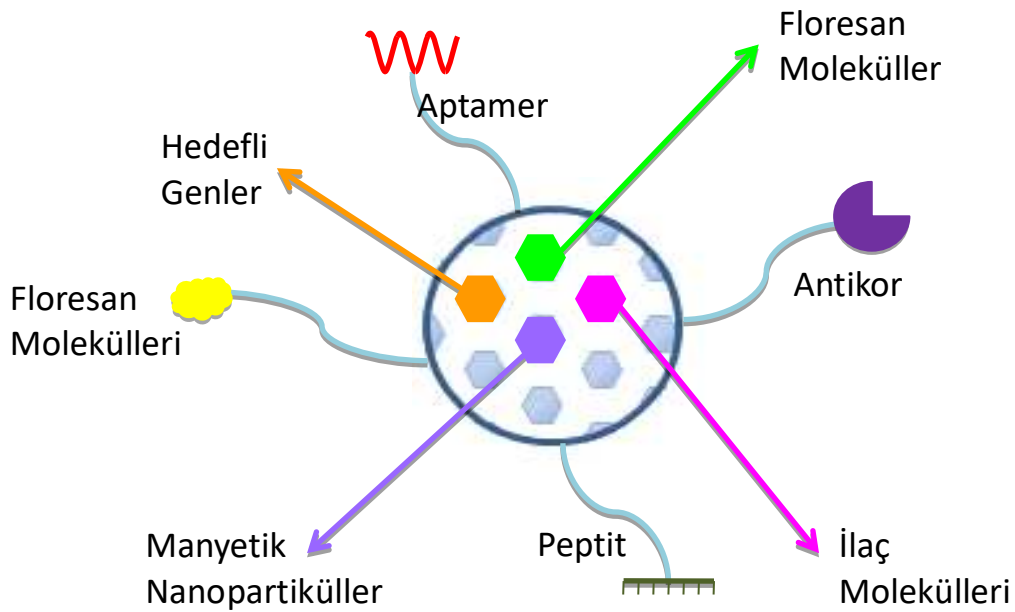
Nanopartiküller boyutları 1-100 nm ( $1\text{nm}= 10^{-9}\text{metre}$ ) arasında değişen yapılardır. Nano kelimesi Latince cüce anlamına gelmektedir ve son yıllarda en fazla çalışılan konulardan biridir. Nanoteknolojinin son yıllarda üzerine en çok çalışılan konulardan biri olmasının nedenlerinden biri malzemelerin nano boyutta farklı özellik ve yapılar göstermesidir. Nanoteknolojik çalışmalarda minimum boyutta ve miktarda malzeme ile çalışıldığı için atık miktarı ve çevreye verdiği zarar bu yönden en az miktara indirilebilir. Nanoboyuttaki malzemelerin avantajlarından biri de hedef moleküllere yönelik yüksek duyarlılık ve özgüllükte, hızlı ve hassas seçimi yönünden kimyasal olarak yönlendirilebilir olmasıdır (Ercan vd., 2012). Nanopartiküller ilaç geliştirme ve kontrollü salınımı,teşhis ve tedavi ajanları,yüzey aktif maddeler, süper iletkenler, hafif ve dayanıklı malzeme üretimi, hasta takip cihazları ve biyosensör tasarımı gibi birçok farklı alanda kullanılabilir (Özalp ve Schäfer, 2011).

Nanoboyutta yapılan çalışmalarda maddenin nanoboyuttaki elektrik yapısı, iletkenliği, reaktivitesi, yüzey polimorfizmi ve toksik etkisi gibi birçok farklı boyuttan incelemek ve bu özelliklerin iyi ayarlanabilmesi gerekmektedir. Nanomalzemelerin vücutta ya da çevrede parçalanma süreleri ya da parçalanmadan önce ya da sonra birikim yaptıkları noktalar önceden tespit edilmeli ve toksik etkisinin önüne geçilmelidir.



### 2.2.1 Silika Nanopartiküller

Mezoporöz silika nanopartiküller, geniş bir hacme ve yüksek dereceli gözenekli dış yüzeye sahiptir. Bunun sayesinde farklı hedef moleküllerde kullanılmak için umut vadeden nanopartiküllerdendir. Bu tarz boşluklu nanopartiküller ilaç taşıma, hedefleme, kimyasal madde taşıma, floresan madde taşıma gibi farklı özellikler için kullanılabilir. Nanopartiküldeki maddelerin salınımı fiziksel uyarımla, kimyasal uyarılarla ya da biyokimyasal özellikli yapılar ile kontrol edilebilir (Sancenón vd., 2015). Mezoporöz silika nanopartiküller sentez ve modifikasyon kolaylığı sebebiyle sıklıkla kullanılan nanomalzemelerdendir. Biyokimyasal uyarılar ile kontrol edilen yapıların nükleaz kararsızlıkları gibi ya da dışarıdan kaynaklanabilecek başka dış etkenlere karşı korunması için de nanopartiküllerin içine gömülen sensör sistemleri de tasarlanmıştır. Bu sistemler gerçek zamanlı metabolit ölçümü için de kullanılmaktadır (Nielsen vd., 2010).



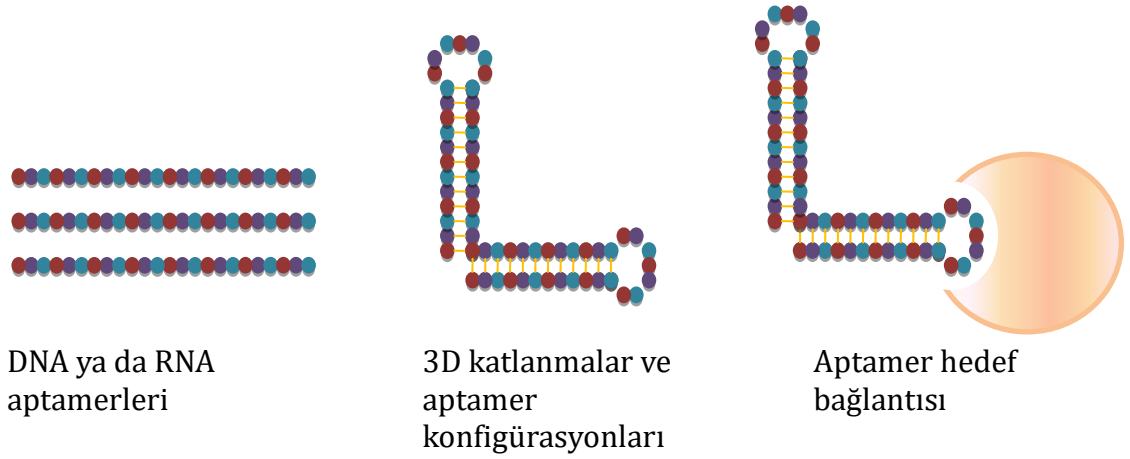
Şekil 2.4: Mezoporöz silika nanopartikül

Kapılı nanopartikül sistemleri kimyasal uyarılara karşı verilen cevaptan faydalanarak içindeki molekülü gözeneklerden kontrollü olarak boşaltmasını düzenleyen sistemlerdir. Bu sistemlerde temelde taşıma işleminin yapıldığı malzeme ve taşınan malzemenin salınımını düzenleyecek olan moleküller yer alır. Bu çalışmamızda da kullandığımız gibi kapılı moleküller açılma mekanizmaları ve kontrollü salınım sağlamaları açısından avantajlıdır (Aznar vd., 2016).



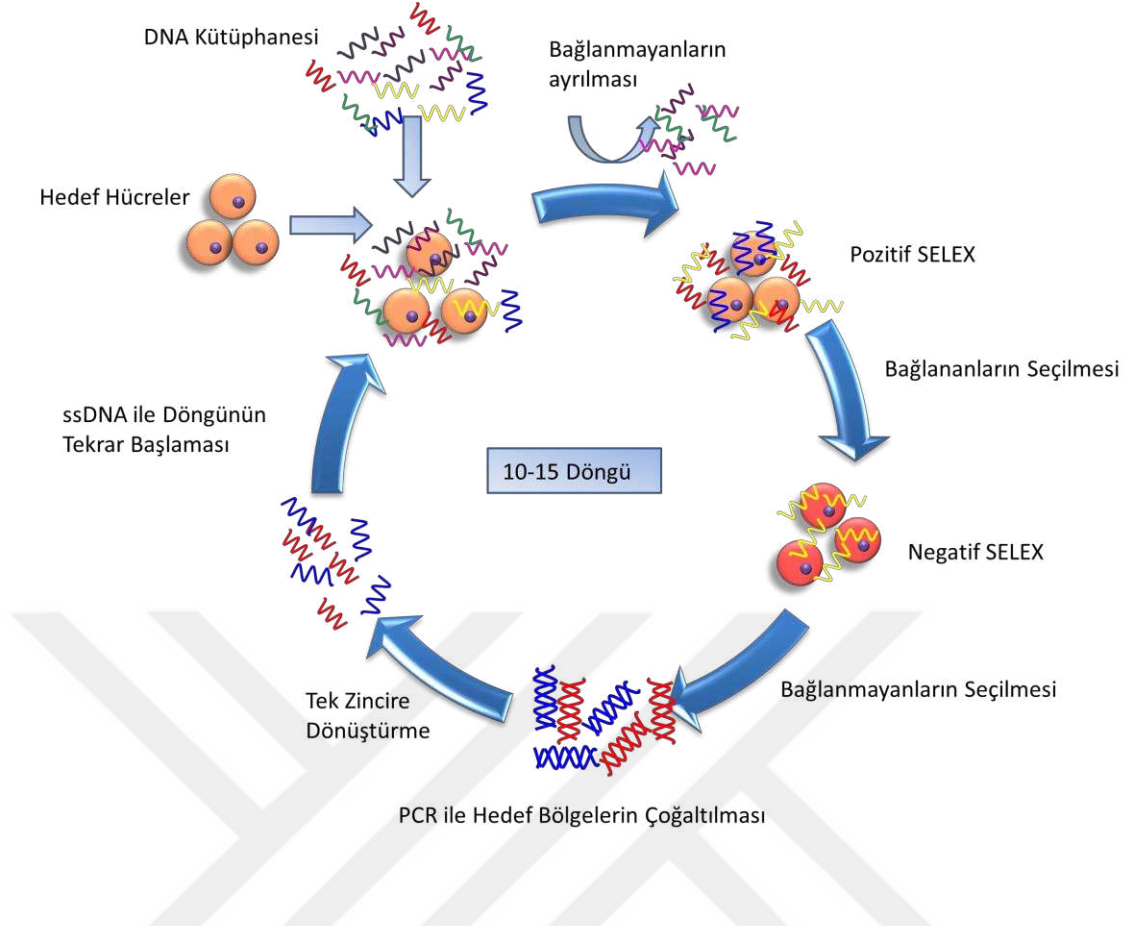
### 2.3 Aptamer

Spiegelman ve çalışma arkadaşları 1960’larda ilk evrimsel nükleik asit deneylerini tanımlamışlardır (Mayer, 2009). İlk aptamer çalışmaları ise 1990’da 3 farklı çalışma grubu tarafından (Robertson ve Joyce, 1990; Tuerkve Gold, 1990; Ellington ve Szostak, 1990) eş zamanlı olarak evrimsel seçilimle ayrılan bu moleküller Latince “uygun” anlamına gelen aptamer olarak isimlendirilmiştir (Bayraç, 2014). Aptamerler kısa (20-100 nt) ve tek zincirli, farklı hedeflere yüksek özgüllük ile bağlanabilen DNA ya da RNA parçacıklarıdır. Aptamerler spesifik hedeflerine karşı iyi tanımlanmış oligonükleotitlerdir. Hedefleri ile bağlandıkları zaman konformasyonel bazı değişiklikler gösterirler (Şekil 2.5). Konformasyonel değişiklikler göstermeleri hedef molekül için yüksek afinite göstermelerini sağlar bu da kullanım alanlarının genişlemesinin temel sebeplerindendir (Mayer, 2009). Aptamerler *in vitro* olarak hedeflenen moleküle karşı seçilebilmesi ile antikorlar ve enzimler gibi doğal reseptörler olarak kullanılan reseptörlere kıyasla daha önce görülmemiş avantajlara sahiptir. Aptamerler, iyonlar, küçük moleküller, büyük moleküller, aminoasitler, tüm bitki hücresi, tüm hayvan hücresi, tüm bakteri seçimi, ilaç ekten maddesi, kimyasal kökenli maddelere kadar birçok farklı boyut ve yapıdaki hedeflere karşı seçilebilmektedirler (Wu vd., 2019). Aptamerler özellikle patojen bakterileri, inorganik iyonları ilaç ve kimyasal kökenli malzemeleri ayırt etme konusunda diğer reseptörlere göre daha avantajlı olabilmektedir (Majdinasab vd., 2018).



**Şekil 2. 5:** Aptamerlerin bağlantı konfigürasyonları

İlerleyen yıllarda evrimsel seçim işlemleri SELEX yani üstsel zenginleştirme ile ligantların sistematik evrimi şeklinde isimlendirilmiştir (Şekil2.6). SELEX 10-15 döngü şeklinde yapılan ve tamamen rastgele bir kütüphane ( $10^3$ - $10^5$ ) ile başlanılan ve her SELEX döngüsünde daha spesifik bağlanmaların seçilip spesifik olmayanların uzaklaştırıldığı bir sistemdir (Pan vd.,2018). Aptamerler elektrokimyasal sistemler, yanal akış strip sistemleri ve optik tabanlı görüntüleme sistemleri gibi birçok farklı reseptör sistemi ile kullanılabilir. Bu sayede farklı kullanım alanlarına ve süreçlerine yönelik sistemler tasarlanabilir (Majdinasab vd., 2018). SELEX temelde hedef moleküller ile kütüphanenin bağlanması, bağlanan moleküllerin çoğaltılması, çoğalan ürünlerin tekrar tek zincire dönüştürülmesi şeklinde ilerler. Tek zincire dönüştürülen moleküller tekrar hedef ile bağlanır ve döngü bu şekilde tekrarlanmış olur.



Şekil 2.6: SELEX döngüsü

SELEX ile aptamer üretimi ile ilgili bazı literatür çalışmaları;

Duan vd. (2013) yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'e karşı SELEX yöntemi ile aptamer sentezi yapıldığı rapor edilmiştir. SELEX seçimleri sonunda 48.74 nM ayrışma sabitli (Kd) aptamerler izole edilmiştir. Aptamerler sandviç tipi bir floresans tayini ile tespit edilmiş ve 75 CFU/ml tespit sınırına (LOD) sahip olduğu gösterilmiştir.

Kim vd. (2010) ibuprofene karşı yaptıkları çalışmada SELEX metodu ile seçim yapmışlar ve rastgele DNA kütüphanesinden 5 diziyi seçmişlerdir. Bu dizilerden 2'sinin sadece ibuprofene özgü aptamerler oldukları afinite parametreleri ile gösterilmiş, bu 2 aptamerin profen grubu başka bir etkene ilgisi olmadığı da bildirilmiştir.

Bayraç ve Kandemir, (2018) domuz jelatinine karşı yaptıkları aptamer çalışmasında SELEX metodu ile aptamer seçimi kullanmışlar ve seçilen aptamerleri MiSeq dizileme ile inceleyip en yüksek orandaki aptamerlerin balık ve sığır jelatinine düşük affinitesi varken domuz jelatinine yüksek afinitesi olduğu bu yüzden tespit için kullanılabilecek potansiyel ajan olduğu söylenilmiştir.

### 2.3.1 Aptamer avantajları

- İstenilen birçok hedefe yönelik olarak *in vitro* olarak seçilebilirler.
- Aptamerler hedefe yönelik seçilebildiği için yüksek özgüllük ve bağlanma afinitesine sahiptirler.
- Bir kez seçilen aptamerler ticari olarak aynı saflıkta üretilebilirler.
- Sabit bir üretim saflığına sahip oldukları için tekrarlanabilirlikleri yüksektir.
- Aptamerler denatürasyona karşı dayanıklıdırlar bu sayede uzun süreli raf ömürleri vardır.
- ssDNA(tek zincirli DNA) ya da RNA molekülleri oldukları için kimyasal olarak stabillerdir.
- Aptamerler kimyasal olarak sentezlendikleri için modifikasyon yapmak kolaydır.
- Aptamerler genellikle hedeflerine bağlandıkları zaman konformasyonel değişikliklere uğrarlar bu da yüksek hassasiyet ve seçicilik sağlar.
- Aptamerler canlılarda bir immün yanıtta sebep olmaz.

- Aptamerler kimyasal olarak sentezlenen moleküller oldukları için düşük maliyetlidirler.

### 2.3.2 Aptamerlerin Dezavantajları

- Biyolojik moleküller olduğu için nükleaz aktivitesinden etkilenebilirler.
- Biyolojik malzemeler olduğu için ısı ile sterilizasyon yapılamaz.
- Araştırmalar yakın tarihli olduğu için her hedefe yönelik aptamer literatürde bulunmayabilir.



## 2.4 *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* fakültatif, Gram pozitif, sporsuz, patojen bir bakteridir. *Listeria* grubu 10 alt türden oluşmaktadır bunlar; *L. fleischmannii*, *L. grayi*, *L. innocua*, *L. ivanovii*, *L. marthii*, *L. rocourtiae*, *L. seeligeri*, *L. weihenstephanensis*, *L. welshimerive* *L. monocytogenes*. Bu türlerden sadece *L. monocytogenes* insanlar ve hayvanlar için patojendir (Vicario, 2015).

*L. monocytogenes* sindirim sistemi yoluyla vücuda alınır ve buradan dolaşım sistemine geçer. Dolaşım sisteminden sonra kan beyin bariyerini aşabilir ya da plasenta bariyerinden geçebilir. *L. monocytogenes* küresel gıda kökenli salgınlar, sporadik vakalarla ilişkisi bakımında önemli bir patojendir (Desai vd., 2019). Bu patojen bakteriler, listeriozis denilen bir hastalığa sebep olurlar ve bu hastalık kusma, ishal, hafif grip belirtileri, hafif mide rahatsızlıklarından ciddi menenjitte, invaziv hastalıklara hatta ölümlere sebep olabilecek bir etkiye sahiptir (Ferreira vd., 2014). Gıda kökenli salgınlarda sıklıkla görülmemesine rağmen yaşlılar, hamileler, bebekler ve bağışıklık sistemi düşük olan hastaları (kanser, lösemi, AIDS, diyabet, karaciğer veya böbrek hastaları immün sistem baskılayan ilaç kullanan hastalar, organ nakli olan hastalar) daha çok etkilemektedir (Gandhi ve Chikindas, 2007).

*L. monocytogenes* gıda kaynaklı bir patojen bakteri olup ayrıca insanlar ve hayvanlar için bulaşıcıdır. *L. monocytogenes* düşük sıcaklıklarda, asidik ortamlarda ve yüksek tuz konsantrasyonlarında gelişebilme kapasitesine sahiptir. *Listeria* türleri olumsuz koşullar altında bile yaşamsal faaliyetlerini koruyabildiği için yoğurt,



dondurma, peynir, et, jambon, somon fme, kümes hayvanları, deniz ürünleri paketlenmiş salatalar, sebze ürünleri, bebek mamaları ve ek gıda maddeleri ve tüketime hazır gıdalar için büyük bir risk faktörü oluşturmaktadır. Gıda rnlerine *Listeria* bulaşması gıda kaynaklı olabildiği gibi fabrikasyon ve depolama süreci kaynaklıda olabilmektedir (Taylor vd., 2019). *Listeria* türleri biyofilm oluşturma, dezenfektanlara karşı direnç, buzdolabı gibi düşük derecelerde yaşama ve ısıl direnç gösterme gibi olumsuz şartlarda hüresel faaliyetlerini göstermesi bu mikroorganizmaların gıda endüstrisinde önüne geilmesindeki en büyük etkenlerdir (Rodriguez-Lopez vd., 2018).

Türkiye’de yapılan bir çalışmada kesimhane ve perakende satış yapılan 3 ayrı ildeki farklı noktalardan alınan 500 tavuk örneğinin %21’inde *L. monocytogenes* tespit edildiği bildirilmiştir. Tespit edilen *L. monocytogenes* suşlarının büyük bir kısmı majör sporadik enfeksiyonlara sebebiyet veren serolojik grup 1/2a ‘ya ait oldukları gösterilmiştir (oban vd., 2019).

Tüketime hazır gıdalarda *L. monocytogenes* kontaminasyonunu önlemek için yapılacak bazı nlemler Dünya Sağlık rgt Tarafından belirlenen kılavuz ile belirtilmiştir (Luber, 2011).

Bunlar;

- 1) retim ve paketleme servisinin tasarımı yeterli ve uygun olması,
- 2) Gıda retim ve paketleme gibi hatlarda gerekli hijyen kurallarına uyulması gerektiği,
- 3) Tüm fabrikada yeterli bakım, onarım, temizlik gibi süreçlerin planlı ve düzenli olarak yürütülmesi,

- 4) Çalışan tüm personelin kişisel hijyen ve kurallara uygun çalışmasının takip edilebilir olması,
- 5) Nakliye ve paketleme sürecinin kurallara uygun ve bulaşmaların önüne geçecek şekilde olması,

Etiyoloji ile (doğrulanmış ve şüpheli) gıda kaynaklı salgınları, salgınlarla ilgili hastalıkları, hastaneye yatışları ve ölüm sayıları Gıda Kaynaklı Hastalık ve Salgınları Gözetleme Sistemi Amerika Birleşik Devletleri ve Porto Riko 2009-2015

Etiyoloji	Salgınlar				Hastalıklar				Ölüm			
	Onaylı	Şüpheli	Toplam	%	Onaylı	Şüpheli	Toplam	%	Onaylı	Şüpheli	Toplam	%
<b>Bakteriler</b>												
<i>Salmonella</i>	896	53	949	23	23,662	510	24,172	30	29	0	29	20
<i>Escherichia coli</i> , Shiga toxin-producing (STEC)§	191	12	203	5	2,378	87	2,465	3	12	1	13	9
<i>Campylobacter</i>	155	46	201	5	2,095	214	2,309	3	1	0	1	1
<i>Clostridium perfringens</i>	108	90	198	5	5,132	2,702	7,834	10	4	0	4	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	35	40	75	2	1,255	426	1,681	2	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i>	23	42	65	2	551	288	839	1	0	0	0	0
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	35	14	49	1	227	53	280	0	0	0	0	0
<i>Shigella</i>	32	7	39	1	1,193	33	1,226	1	1	0	1	1
<i>Listeria monocytogenes</i>	35	1	36	1	380	8	388	0	74	1	75	52
<i>Clostridium botulinum</i>	19	2	21	1	85	6	91	0	4	0	4	3
<i>Escherichia coli</i> , Enterotoxigenic	6	1	7	0	437	19	456	1	0	0	0	0
<i>Staphylococcus</i> spp.	2	4	6	0	38	15	53	0	0	0	0	0
<i>Yersinia enterocolitica</i>	3	1	4	0	20	4	24	0	1	0	1	1
<i>Vibrio cholerae</i>	1	2	3	0	3	14	17	0	1	0	1	1
<i>Streptococcus</i> , Group A	2	1	3	0	72	40	112	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> , Enteraggregative	3	0	3	0	50	0	50	0	0	0	0	0
<i>Vibrio</i> other	2	0	2	0	7	0	7	0	0	0	0	0
<i>Vibrio vulnificus</i>	0	1	1	0	0	2	2	0	0	1	1	1
<i>Aeromonas hydrophila</i>	0	1	1	0	0	4	4	0	0	0	0	0
<i>Coxiella burnetti</i>	0	1	1	0	0	5	5	0	0	0	0	0
<i>Francisella novicida</i>	1	0	1	0	3	0	3	0	1	0	1	1
<i>Brucella</i> spp.	1	0	1	0	4	0	4	0	0	0	0	0
<i>Clostridium</i> other	1	0	1	0	12	0	12	0	0	0	0	0
<i>Escherichia coli</i> , Enteropathogenic	1	0	1	0	30	0	30	0	0	0	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i>	1	0	1	0	13	0	13	0	0	0	0	0
<i>Diğer</i>	0	34	34	1	0	469	469	1	0	0	0	0
<b>Toplam</b>	1,553	353	1,906	47	37,647	4,899	42,546	52	128	3	131	92

Şekil 2.7: Amerika Birleşik Devletlerindeki Bakteri Kaynaklı Salgın ve Hastalıklar Tablosu (Dewey vd., 2018).

*L. monocytogenes*'in gıdalarda hızlı gelişmesi ve geliştikten sonra bulaşmaların temizlenmesi zor olduğu için gıdalarda *L. monocytogenes*'e karşı sıfır tolerans politikasının uygulanması EFSA (European Food Safety Authority) tarafından önerilmiş kriterler aşağıdaki gibidir (Yavuz ve Korukluoğlu, 2010).

- Bebekler ve özel tıbbi amaçlar için üretilen tüketime hazır gıdaların 25 g'ında *L. monocytogenes* içermemelidir.
- Bebekler ve özel tıbbi amaçlar haricinde üretilen tüketime hazır gıdaların raf ömrü süresince 100 kob/g düzeyinden daha fazla *L. monocytogenes* içermemelidir.
- Üretim alanında bırakıldığında bakteri gelişmesine uygun olan gıda ürünlerin 25 g'ı *L. monocytogenes* içermemelidir.

#### **2.4.1 *L. monocytogenes* tanısında klasik yöntemler**

Kültür metodu *L. monocytogenes*'in farklı zenginleştirici besiyeri ortamlarında çoğaltılması ile tespit edilmesini amaçlamaktadır. Bu amaç ile kullanılan birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Patojen mikroorganizmanın tespiti için *L. monocytogenes*'e özgü bazı agar plakaları ve disk difüzyon yöntemleri de kullanılmaktadır (Tabit 2018). Bu yöntemler uzun süreli ve doğruluğu tartışılan yöntemlerdir. Bu yöntemler hiç bir zaman % 100 duyarlı ve etkili değildir.

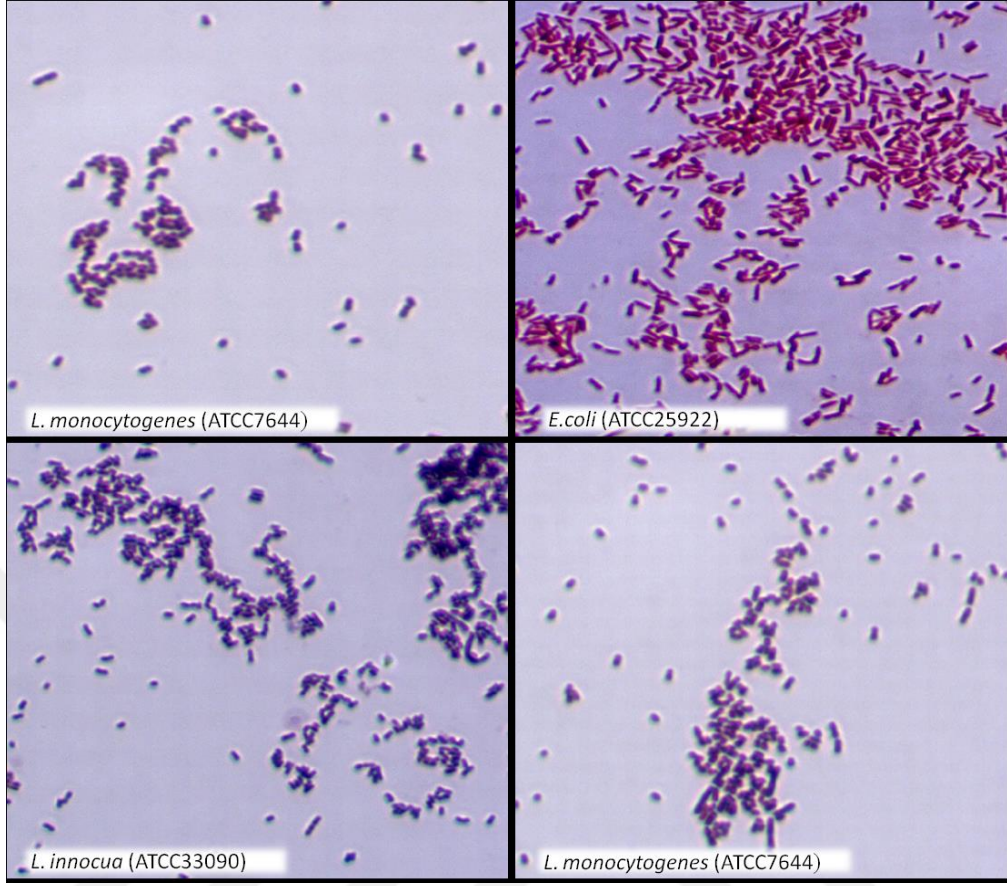
İmmunoassay metodu ile *Listeria*'ya spesifik antikorlar ile ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) benzeri metodlar ile analizleri yapılmaktadır. Bu sistemler tür bazında tanımlayamazlar aynı zamanda düşük miktarda *Listeria* varlığında

sonuçlarda sapmalar olabilmektedir. Bu analizler ile kısmen hızlı sonuçlar almasına rağmen uzman personel ihtiyacı fazla olan analiz yöntemleridir (Capita vd., 2001).

PCR metodu ile *L. monocytogenes* analizinde bazı spesifik gen bölgeleri (hlyA, iap, prfA ve ssrA) hedeflenir. Numuneler bu gen bölgelerine spesifik olarak çoğaltıldıktan sonra agaroz jel ile görüntüleme yapılır ya da bu gen bölgeleri gerçek zamanlı PCR ile analiz edilir. Bu yöntem spesifik bir yöntem olsada cihaz ve gerekli kimyasalların alım maliyetleri yüksek olmaktadır aynı zamanda bu analizler için uzman personele ihtiyaç duyulabilir (Chen vd., 2017; Kim vd., 2014).

SPR metodu ile antikor ve ya aptamer tabanlı bir biyosensör sistemi ile *L. monocytogenes* analizi yapılmaktadır. SPR çipi üzerine immobilize edilen biyosensörler ile analitin içindeki bakteri miktarı gerçek zamanlı olarak tespit edilebilmektedir. Spesifikliğı ve doğruluğı yüksek olan bu cihazın uzman personel ile kullanılması ve ilk cihaz kurulum maliyetleri yüksek olabilmektedir (Zhang vd., 2014).

Her metod kendi içinde avantaj ve dezavantajlara sahiptir. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada kısa sürede hızlı ve doğru tespit yapabilen, kullanımı kolay ve düşük maliyetli bir aptamer temelli yanal akış strip test geliştirilmesi üzerine çalışılmıştır.



Şekil 2.8: Çalışmada kullanılan mikroorganizmalar

### 3. YÖNTEM

Çalışma kapsamında kullanılan tüm kimyasallar Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Aptamerler Oligomer (Ankara, Türkiye) firması tarafından sentezlenmiştir (Şekil3.1). Aptamer dizisi literatür taraması sonunda Duan vd. (2013) makalesinden en düşük Kd değerine sahip olan seçilerek belirlenmiştir. Çalışmada referans bakteriler olarak *L. monocytogenes* (ATCC7644), *L. innocua* (ATCC33090) ve *E. coli* (ATCC25922) suşları kullanılmıştır.

İsim	Sekans
A15-Biyotin	5'-Biyotin- TACTATCGCGGAGACAGCGCGGGAGGCACCGGGGA -3'
A15-SH	5'Tiol-TACTATCGCGGAGACAGCGCGGGAGGCACCGGGGA - 3'
A15M-SH	5'Tiol- TACTATCGCGGAGACAGCGCGGGAGGCACCGGGGATTTTT- 3'
A15-HP-Biyotin	5'-Biyotin- TACTATCGCGGAGACAGCGCGGGAGGCACCGGGGATAGTA -3'
A15-HP-SH	5'-Tiol- TACTATCGCGGAGACAGCGCGGGAGGCACCGGGGATAGTA -3'
Karıştırılmış (scrambled) A15- HP	5'Tiol- GCGGGAGGCAAATAGCGTCCCGCGTGGAAAGGGCCCCCGC -3

Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan aptamer dizileri

### 3.1 Silika Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Silika nanopartiküller, N-setiltrimetilamonyum bromür (CTAB) çözeltisinin sol-gel yöntemine göre NaOH ile karıştırılmasıyla hazırlanmıştır (Yurdakul vd., 2019). Bu yöntemle 1 gr CTAB tartılarak üzerine distile su eklenmiş ve sonikasyon ile homojen bir süspansiyon elde edilmiştir. Daha sonra çözeltiliye NaOH (3.5 ml) eklenerek karıştırılmıştır. Çözelti daha sonrasında sürekli karıştırılarak 80 °C'de tutulmuştur. 24 saat süren reaksiyon süresince damla damla tetraetoksisilan (TEOS) reaksiyona ilave edilmiştir. Beyaz çökelti halindeki nanopartiküller filtre ile toplanılmış, su ve metanol ile yıkanmıştır. CTAB kalıbı, parçacık yüzeyinde gözenekleri elde edebilmek için 6 saat boyunca HCl ile geri akıtılarak uzaklaştırılmıştır. Son olarak parçacıklar süzölmüş ve kurutulmuştur.

Transmisyon Elektron Mikroskobu (TEM) kuru formdaki mezoporöz silika nanopartiküllerin nanometrik görüntülenmesi için kullanılmıştır (ILTEK, Konya, Türkiye). TEM analizinde silika nanoparçacık tozları 5 dakika boyunca etanolde ultrasonik işleme muamele edilmiştir, standart bir holey karbon TEM ızgarası üzerinde bir damla kurutulmuş ve analiz gerçekleştirilmiştir. Quantachrome BET analizöründe (ILTEK, Konya, Türkiye) iç ve dış yüzey alanını ve gözenek boyutlarını belirlemek için Brunnauer, Emmett ve Teller (BET) yöntemi uygulanmıştır. Parçacıkların boyutu bir ZetaSizer (Malvern Instruments, Worcestershire, UK) ile belirlenmiştir. Yaklaşık 10 µg mezoporöz silika nanopartikülleri, su içinde süspansiyon edilmiş ve yoğunluğa karşı çap boyutu oluşturmak için DLS (Dinamik Işık Saçılımı) ile analiz edilmiştir. Silika parçacıklarının hidrodinamik çapı yazılım aracılığıyla otomatik olarak elde edilmiştir. Epoksi bağlanmış SiO<sub>2</sub> nanopartikülleri daha önceden bildirilen bir prosedüre göre

hazırlanmıştır (Borsa vd., 2016). Bu prosedüre göre 1mg mezoporöz silika nanopartikül oda sıcaklığında 1 saat boyunca %1mM asetik asit içeren 1 ml %95'lik etanol ile karıştırmıştır. Epoksi işlevselliği için %3 (3-Glisidyiloksipropil) triethoxysilane eklenmiş ve ardından gece boyunca karıştırılarak ısı altında inkübasyon yapılmıştır. İnkübasyon sonrası üç kez 1× PBS ile yıkanmıştır. Daha sonra *L. monocytogenes* bağlanması için aptamer geçit sekansları ile işaretlenmiş tiyol, oda sıcaklığında hafif bazik ortam altında (PBS, pH 8.0) karıştırılarak oda sıcaklığında tüm gece kovalent bağ oluşması için inkübe edilmiştir (Hermanson, 2008). Epoksi kaplama miktarı piridin-HCl'ye bağlı titrasyon yöntemi ile belirlenmiştir (Li vd., 2007; Özalp vd., 2014).

### 3.2 Aptamer Kapılı Nanopartiküllerin Sentezi

Epoksi modifiyeli nanoparçacıklardan 1 mg tartıldı. Üzerine PBS tamponu (0.01 M fosfat tamponlu salin; NaCl-0.138 M; KCl-0.0027 M; pH 7.4) ve 100µM TMB çözeltisi eklenilmiştir. Nanoparçacıklar solüsyon içinde 24 saat çalkalamalı inkübasyona bırakılmış ve bu şekilde TMB yüklemiştir. Parçacıklar inkübasyon süresi sonunda PBS tamponu ile 3 kez yıkanmıştır. Nanopartiküllere TBM yüklenmesi ile peroksidaz analizi ile yapılmıştır. Silika nanoparçacıkların yüzeyindeki aptamer-kapı modifikasyonları spektrometre 260 nm'dekalibrasyon eğrisi çizerek hesaplanmıştır (Özalp vd., 2014).

### 3.3 Bakteriyel Büyüme

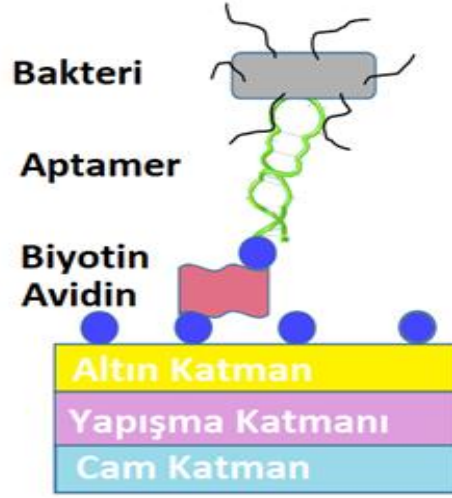
Gliserol (%20, v/v) içerisinde -80 °C'de muhafaza edilen bakteri suşları Tripton Soya Agar(TSA, Oxoid CM0131B) besiyerinde 37°C 2 gün inkübe edilmiştir. Büyüyen



bakteriler 10 ml steril %0.9 (w/v) NaCl içerisinde çözdürülerek yoğunlukları densitometre (Biosan, Letonya) kullanarak McFarland 1.0'a ayarlanmıştır. ( $\pm 3 \times 10^8$  hücre/ml).

### 3.4 SPR Deneyleri

A15 ve A15HP'nin bağlanma afinitelerinin belirlenmesi için MP-OTSO SPR (BioNavis, Finlandiya) sistemi kullanılmıştır. SPR cihazının altın üzerine biyotin sabitlenmiş çipile çalışılmıştır. Çipin üzerine avidin akışı sağlanmış ve çipte avidin biyotin immobilizasyonu oluşturulmuştur. Bu kompleksin üzerine ayrı iki kanaldan A15 ve A15Hp akışı verilmiş ve biyotin+avidin+aptamer kompleksi oluşmuştur (Şekil3.2). Analiz süresince *L. monocytogenes* ile *E.coli* ve *L.innocca* (negatif kontrol örnekleri) en düşük konsantrasyondan en yüksek konsantrasyona doğru akışa verilmiş ve bağlanma değerleri tespit edilmiştir. En yüksek konsantrasyon için McFarland 1.0 bakteri yoğunluğundaki hücre kullanılmış ve seri dilüsyon (1:10) ile seyreltilmiştir.  $K_D$  (afinite değeri)  $R_{max}$ 'ın (maksimum bağlanma değeri) yarısı olarak tespit edilmiştir. SPR'dan elde edilen veriler bağlanma değerleri konsantrasyonuna göre çizilmiş ve Sigmaplot programı ile sigmoidal (dört parametre) eğrisine yerleştirilmiştir (Şekil 4.1).



Şekil 3.2: Altın çip üzerindeki immobilizasyon katmanları

### 3.5 Serbest Bırakma DeneYleri

TMB moleküllerinin gözeneklerden serbest bırakılma süreci peroksidaz tahlili ile ölçülmüştür. Peroksidaz analizi (Epoch-2 Microplate Spectrophotometer, Biotek Instruments, ABD) için 450 nm’de absorbansı ölçülerek takip edilmiştir. Yaklaşık olarak 100µg aptamer kapılı mezoporöz silika nanotanecik diyaliz membranından (moleküler kesimli 12. Da selüloz membran) spektroskopik olarak salımı incelenmiştir (Özalp ve Schäfer, 2011). Çalışmada aptamer kapılı mezoporöz silika nanopartiküller diyaliz zarı ile tamamen tutulacak kadar büyüklükte seçilmiştir. Okumalar sırasında homojen bir çözelti sağlayabilmek için nanopartikül çözeltisi sürekli karıştırılmıştır. Aptamer kapılı mezoporöz silika nanopartiküllerin serbest bırakılmasını tetiklemek için çözeltiye direkt olarak yaklaşık  $3 \times 10^4$  *L. monocytogenes* hücresi eklenmiştir. TMB peroksidaz deneyi ile nanopartiküllerden salınımı ölçmek için 4 saate kadar farklı sürelerde ölçümler yapılmıştır. Ölçüm sonuçları TMB molekülünün maksimum yüklenmesi ve yükleme prosedürü öncesi ve sonrası yükleme çözeltisi arasındaki

farktan belirlenmiştir. TMB'nin kümülatif salınımı, toplam tutulmuş TMB moleküllerinin nmol'ü olarak belirlenmiştir.

### 3.6 Yanal Akış Strip Denemeleri

Yanal akış strip test montajı daha önce optimize edilen Özalp vd.,(2013) tarafından önerilen protokol takip edilerek gerçekleştirilmiştir. Stripler, kağıt üzerine numune pedi (ClaremontBio, Std. 17), konjugat pedi (ClaremontBio, Cam Elyaf), nitroselüloz membran (ClaremontBio, nitroselüloz HF90) ve üst üste binme dizisi ile emici ped sabitlenerek hazırlanmıştır. HRP, bir yanal akış reaktifi dağıtıcısı (Claremont Bio Solutions, LLC, Upland, CA, ABD) tarafından fiziksel adsorpsiyon yöntemiyle test bölgesine sabitlenmiştir. Serbest TBM içeren ya da TBM yüklü aptamer kapılı mezoporöz silika nanopartiküller konjugat pedine batırılmış ve kurutulmuştur. Kurutma sonrasında stripe montajlanmıştır. Her strip denemesinde numune pedine doğrudan 100µl numune uygulanmış ve resimdeki (Resim 4.3) görüntüler beşinci dakikada alınmıştır. Test bölgesindeki TMB molekülünün yoğunluğu imageJ 1.46r ile analiz edilmiştir (Schneider vd., 2012).

### 3.7 Strip Deneyleleri ve Gıda Örnekleri

Tavuk örnekleri yerel marketlerden alınmıştır. Numuneler +4 °C'de muhafaza edilmiş ve en fazla 1 gün içerisinde kullanılmıştır. Numune hazırlama daha önceden bildirilen prosedür takip edilerek yapılmıştır (Tominaga, 2019). Numune hazırlanırken 1g tavuk eti 1 ml %0.9'luk NaCl çözeltisinde 24 saat boyunca 37 °C'de inkübe edilip doku parçalarını almak için santrifüje tabi tutulmuş ve berrak süpernatant sıvı strip

testlerinde kullanılmıştır. Berrak süpernatant aynı zamanda herhangi bir kirlenmeyi (bakteriyel kontaminasyonu) kontrol etmek için büyüme ortamında inoküle edilerek test edilmiştir.

### **3.8 İstatistiksel Analizler**

Eğri oluşturma ve karşılık gelen istatistiksel analizler SigmaPlot (Systat Software inc., ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Tüm deneyler üç tekrar şeklinde yapılmıştır ve hata çubukları standart sapmalar olarak verilmiştir.

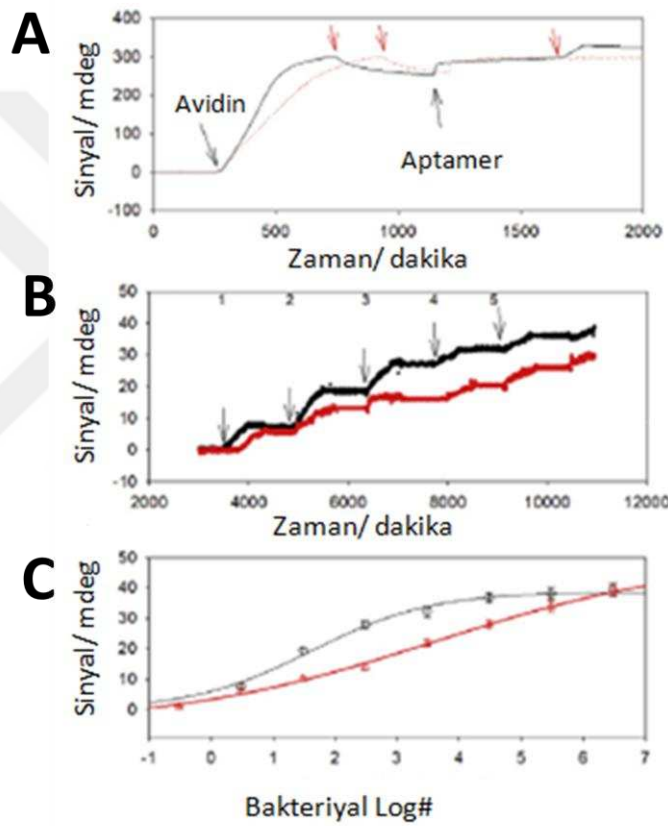
## 4.BULGULAR

Aptamer kapılı biyosensörler, çoğunlukla biyosensörlerin mezoporlarına hapsolmuş bir raportör molekülü serbest bırakabilmek için oligonükleotitlerin temel konformasyonel değişim özellikleri üzerine açma kapama mekanizmasına dayanarak çalışan moleküller yapılarıdır. Aptamer kapılı biyosensörlerin taşıdıkları raportör molekül çeşidi olarak genellikle floresan veya elektro aktif raportör yapıdaki çeşitli moleküller kullanılmış ve daha önce yapılan çalışmalarda rapor edilmiştir (Aznar vd., 2016). Bu çalışmada raportör molekül olarak belirlediğimiz TMB'nin mezoporöz nanopartiküllerden spesifik salınımı için aptamerler kullanılmıştır. Öncelikle aptamer oligonükleotit dizisinin 3' ucuna 6 nükleotit ilave edilerek *L. monocytogenes*'e bağlanan bir aptamer dizisi moleküler kapı yapısına dönüştürülmüştür. Kullanılan aptamer dizileri (Duan vd., 2013) 78 nükleoitlik diziler olarak yayınlanan aptamerlerden sabit alanları çıkartılarak oluşturulmuştur. A15 aptameri homojen çözelti deneyleri ve floresan deneyi ile 48.7 nM'lik bir afinite sabitine ( $K_D$ ) sahip olduğu tespit edilmiştir. Bu çalışmada, rastgele bölgeye karşılık gelen 35-nükleotit uzun oligonükleotidi elde etmek için sabit bölgeleri çıkarmak için aptamerler her iki uçtan kesilmiştir (Şekil 3.1 A15-Biyotin).

### 4.1 SPR ile Afinite Analizleri

SPR analizi ile hedef moleküllerin sabit bir çip yüzeyinde immobilize edilen, hedef moleküle karşı afinite parametrelerini gerçek zamanlı olarak belirlenebilmektedir. Aptamer kapılıları yüzeye sabitlenmiş durumda çalışması gerektiğinden ve geçit dizisi fazladan nükleotitler içerdiğinden, ilk önce aptamer kapıları A15-HP'nin afinite

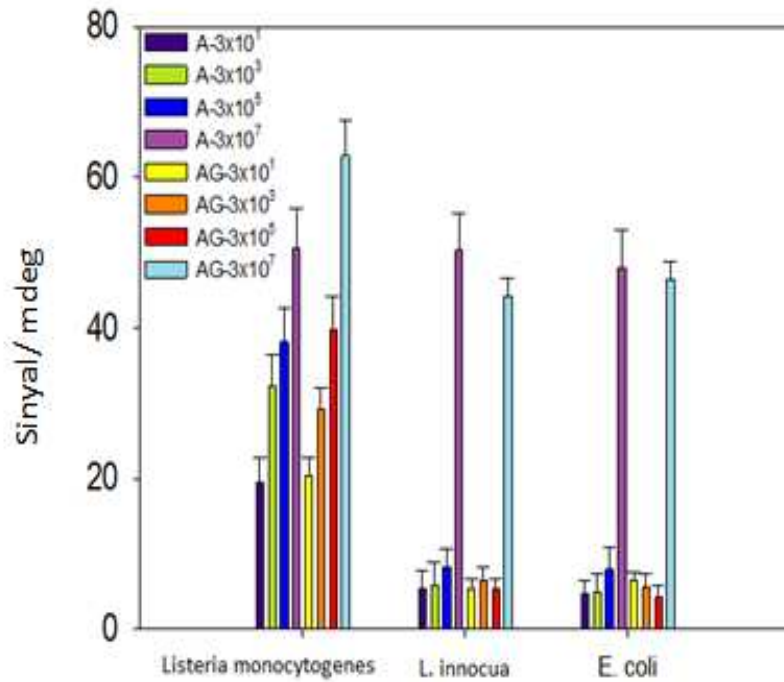
özelliklerini değerlendirilmiştir (Şekil 4.1). Altın üzerine biyotin kaplı çipin üzerine immobilize edilen avidinin üzerine A15 ve A15-HP nükleotit dizileri immobilize edilmiştir (Şekil 3.2). Çip üzerine verilen akış ile sensörün *L. monocytogenes* konsantrasyonuna göre afiniteleri belirlenmiştir (Şekil 4.1 B). Deneyler 3 tekrar şeklinde yapılmıştır. Gösterilen hata çubukları standart sapmaları temsil etmektedir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.1:** *L. monocytogenes*'e hedeflenmiş aptamerler A15 ve A15HP' nin SPR ile afinite analizi A) Avidin ve aptamer moleküllerinin altın yüzeye enjeksiyon ile sabitlenmesi, B) Hücre konsantrasyon artışı ve sinyal artışı, C) Maksimum sinyal verilerinin bakteri sayılarına göre analizi

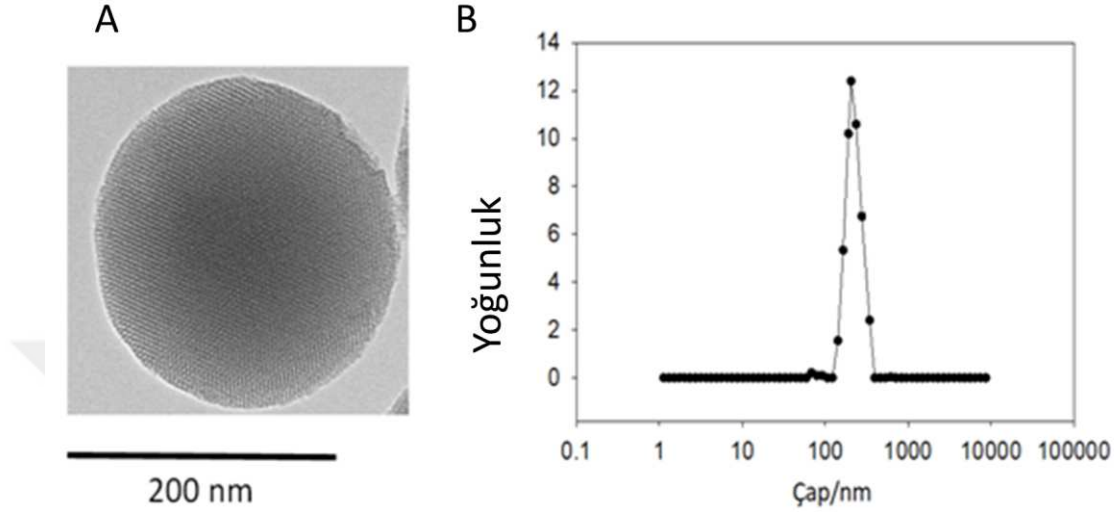
Afinite deneylerinde  $3 \times 10^1$ ,  $3 \times 10^3$ ,  $3 \times 10^5$  ve  $3 \times 10^7$  hücre içeren numuneler A15 veya A15hp sabitlenmiş SPR sensör çiplerine enjekte edilerek afinite sinyalleri elde edilmiştir. *L. monocytogenes* ile yapılan denemelerinde  $19.4 \pm 3.3$  mili dereceden  $50.6$

$\pm 5.3$  mili dereceye kadar artan ışık yansımaları (SPR sinyali) gözlemlenmiştir. Sinyal artması hücre sayısı ile orantılı bir şekilde artmıştır. Spesifisite belirleme denemeleri *L. innocua* ve *E. coli* hücrelerinin *L. monocytogenes* denemelerinde kullanılan sayılarda enjekte edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. *L. innocua*  $3 \times 10^5$ 'e kadar  $8.3 \pm 2.5$  kadar düşük seviyede sinyal vererek hem aptamerin hem de aptamer kapının *L. monocytogenes* için spesifik olduğu gözlenmiştir. Benzer şekilde *E. coli* ile yapılan deneylerde  $3 \times 10^5$ 'e kadar  $7.9 \pm 1.9$  kadar düşük seviyede sinyal bulunmuştur. Fakat en yüksek konsantrasyon olan  $3 \times 10^7$  hücre sayısında ise *L. innocua* için  $50.7 \pm 4.9$  ve *E. coli* için  $47.9 \pm 5.0$  düzeyinde sinyal vermiştir.



**Şekil 4.2:** *L. monocytogenes*, *L. innocua* ve *E. coli* hücrelerinin maksimum bağlanma sonuçları (A aptameri ve AG aptamer kapılı molekülleri simgelemektedir).

## 4.2 Silika Nanopartikül ve Aptamer Analizleri



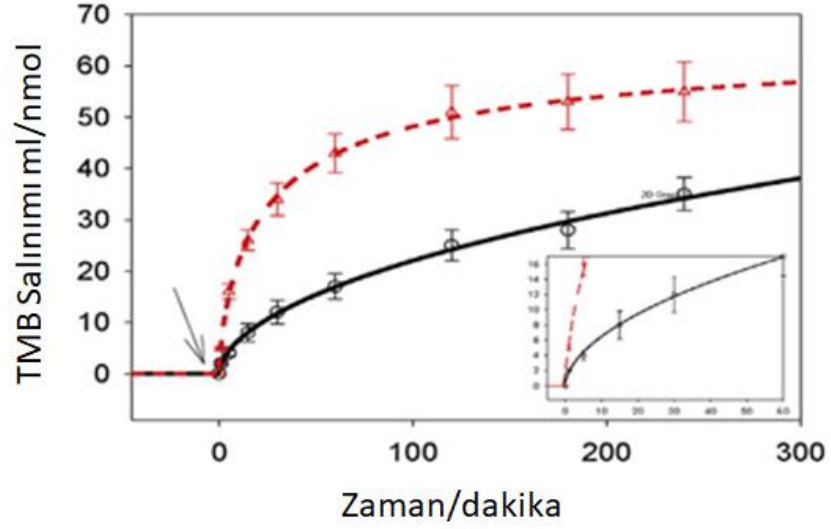
**Şekil 4.3:** Mezoporöz silika nanopartikül karakterizasyonu A) TEM analizi ile parçacıkların gözenekli boyutu incelenmesi, B) Boyut tayini için DLS analizi.

Mezoporöz silika nanopartikülleri sol-jel metoduna göre sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Aptamer kapı formülü diziler TMB ile yüklenen silika nanopartiküllerin yüzeyinde immobilize edilerek sabitlenmiştir. Silika nanopartiküllerin yüzeylerindeki tipik altıgen gözenek yapısına sahip oldukları TEM analizinde 2.4 nm mezopor ve 0.97 cm<sup>3</sup>/g toplam boşluk hacmine sahip olduğunu BET analizi ile belirlenmiştir. TEM imajlarında tespit edilen nanopartikülleri temsil bir görüntü Şekil 4.3A'da verilmiştir. Parçacık boyutu 200 nm civarındadır ve MCM-41 tip düzenli heksogonal por yapısı açıkça görülebilmektedir. Por boyutlarının 2-4 nm arasında olduğu görülmektedir. Parçacıkların hidrodinamik boyutlarının ortalama çapının 201 ± 4.2 nm olduğu DLS analizi ile tespit edilmiştir (Şekil 4.3 B). Elde edilen mezoporlara TMB rapörtör molekülü fiziksel absorpsiyon yoluyla ve aptamer kapı yapılarıyla



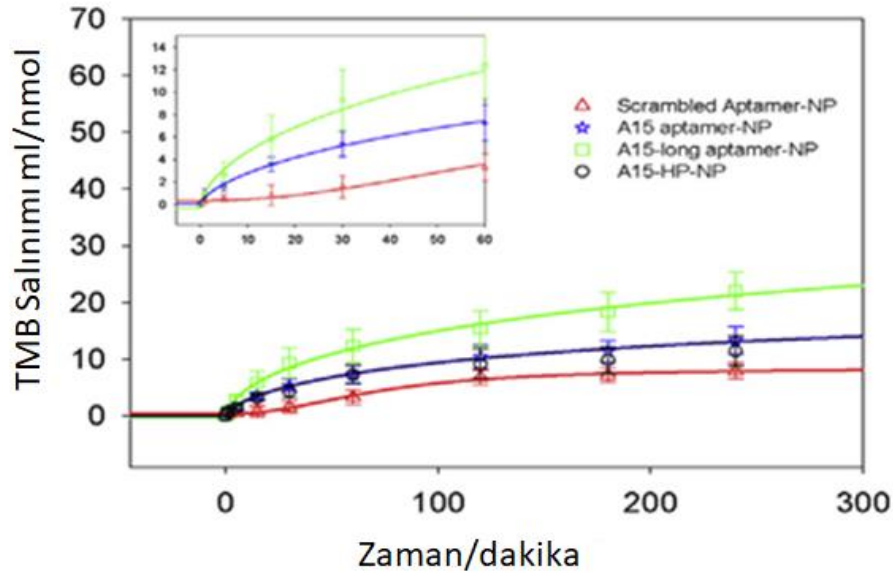
hapsedilmiştir. Hapsedilen TMB miktarı 18 nmol/g silica olarak hesaplanmıştır. Ayrıca sabitlenen aptamer kapı molekülü miktarı 12 nmol/g silica olmuştur.

Mezoporöz silika nanopartiküller Raportör TMB molekülleri ile yüklenilip aptamer kapı sekansları ile kapatılarak bloke edildikten sonra, TMB salınımı incelenmiştir. Aptamer kapı molekülleri *L. monocytogenes*'in üzerindeki spesifik antijenlere afinite göstermesinden faydalanılarak salınım yapması prensibi bu şekilde incelenmiştir. Aptamer kapı formu kullanılarak yapılan deneylerde hedef hücre yokken 4 saat içinde 11.3 nmol TMB salınımı gözlenmiş durumdayken, (Şekil 4.4 Siyah çizgi) *L. monocytogenes* varlığında (Şekil 4.4 Kırmızı kesikli çizgi) 34.2 nmol TMB salınmıştır. Benzer şekilde diğer kontrol dizileri ile de hedef bakteri varlığında karıştırılmış dizilerin kapı olarak kullanıldığında 7.8 nmol, aptamer dizisi (kapı yapısına dönüştürülmeden) TMB hapsetmek için kullanıldığında 13.4 nmol ve daha uzun A15 aptameri sekansı kullanıldığında 21.5 nmol TMB salınımı tespit edilmiştir. Tüm deneylerde silika nanopartiküller ilk 2 saate çok yüksek bir TMB salınımı ve ardından kademeli bir salınım göstermiştir (Şekil 4.4 Kırmızı kesikli çizgi).



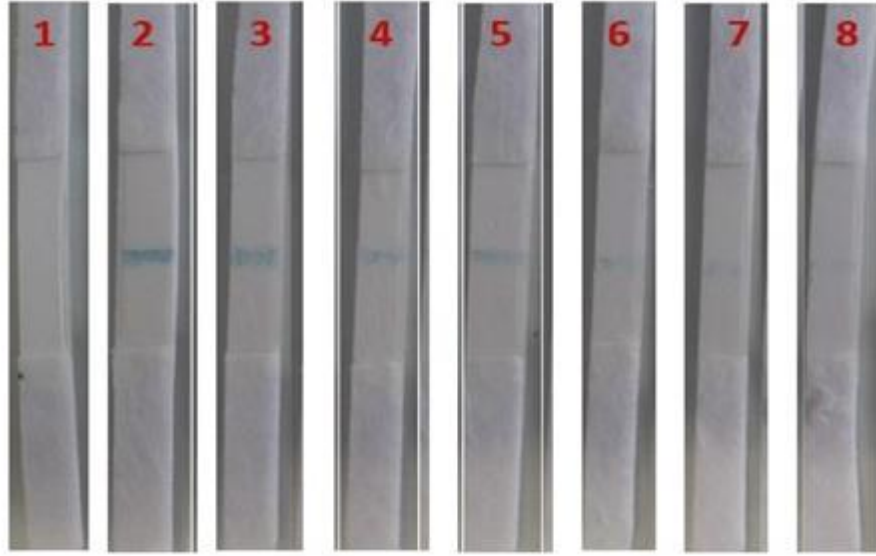
Şekil 4.4: Kapılı ve kapısız aptamerler ile TMB salınımı

Aptamer kapılı olan nanopartiküller kapısız olanlara benzer bir salınım modeli gösterebilir, salınım oranı kapılı olanlarda geride kaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.5). Kapı kullanılmayan TMB yüklü silika partiküllerinde 4 saatte 53.4 nmol TMB salımı gözlemlenmiştir (Şekil 4.4 kırmızı kesik çizgi). Aptamer kapı ile hazırlanan partiküller ilk 15 dakikada *L. monocytogenes* varlığında 7.8 nmol TMB salımı yaparken hedef bakteri yokken 0.5 nmol TMB yapmaktadır.



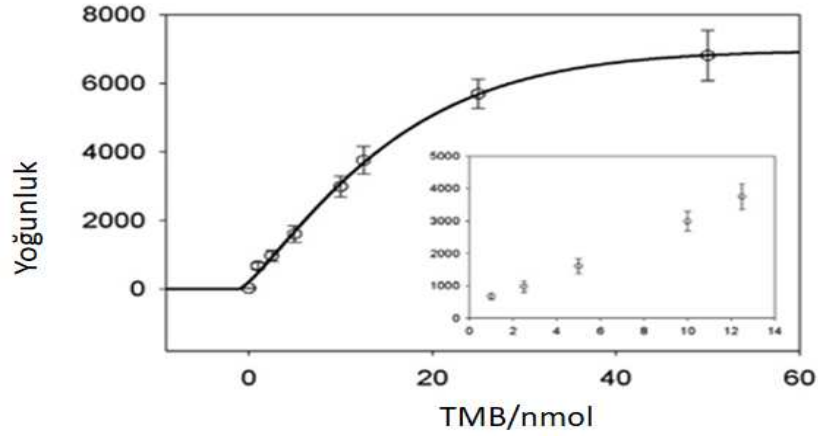
Şekil 4.5: TMB'nin farklı diziler ile salınımı,

TMB yüklü aptamer-silika nanopartiküllerinin spesifik olarak salım yaptığını gösterildikten sonra ilk 15 dakikada strip formatında sinyal verebilecek kadar TMB serbest kalmasına yetip yetmediği test edilmiştir. Bu amaçla striplere numune bölgesinde serbest TMB yüklenilmiş ve yoğunluk ölçümü alınmıştır (Şekil 4.6). Şekildeki 1 nolu strip TMB için negatif kontrol ve 2-8 nolu stripler 0.2 nmol ile 10.0 nmol arası TMB molekülleri doğrudan konjugat pedine uygulanmıştır. Strip deneyleri 3 tekrar şeklinde denemiştir ve hata çubukları standart sapmayı temsil etmektedir (Şekil 4.7). Kontrol için kullanılan (TMB olmayan numune) peroksidaz sabitlenmiş strip test bölgesinde herhangi bir sinyal vermemiştir (Şekil 4.6 strip 1). Strip 2-8 arasında ise 10 nmolden 0.2 nmole kadar değişen oranlarda TMB eklendiğinde değişen yoğunlukta görünür sinyal (mavi band-TMB çökeltisi) gözlenmiştir.



**Şekil 4.6:** Aptamer kapılı nanopartiküller ve sadece TMB ile strip denemeleri

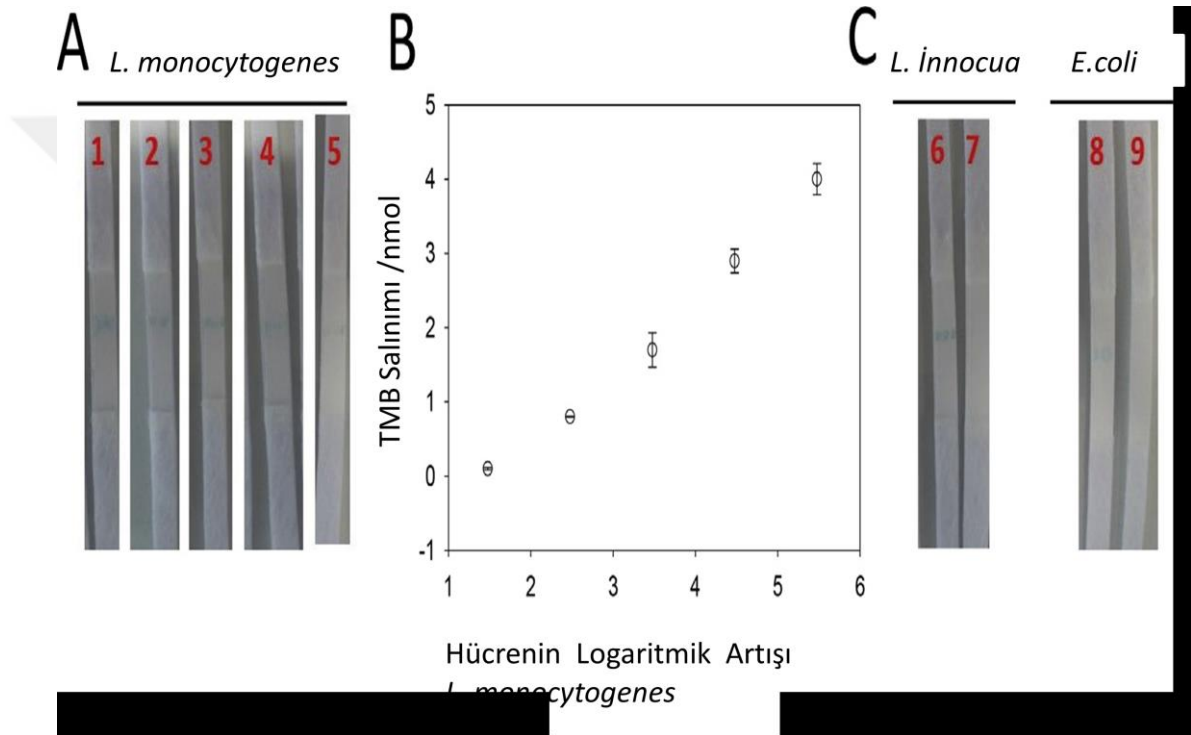
Bu mavi renk bantların piksel yoğunluğu kantitatif olarak grafik haline getirildiğinde Şekil 4.7’de verilen ve doygunluk değerinde düzleşen bir artan grafik eğrisi elde edilmiştir.



Şekil 4.7:., Strip deneylerindeki yoğunluk sonuçlarının grafik gösterimi.

Son aşamada *L. monocytogenes* hücrelerinin var olduğu numunelerin tayini için konjugant ped bölgesine aptamer kapılı TMB yüklü parçacıklar ile denemeler gerçekleştirilmiştir. Şekil 4.8'te doğranmış tavuk eti numunelerinde sabitlenmiş bakteriler için TMB yüklü aptamer kapılı nanopartiküllerin değerlendirilmesini ve nicel sonuçları görsel olarak verilmiştir.  $3 \times 10^1$  ve  $3 \times 10^6$  arasında değişen *L. monocytogenes* hücresi barındıran numuneler 5 dakikalık deney süresince hızlı ve kolay bir şekilde tespiti edilmesini sağlayan mavi bantlar oluşturmuştur (Şekil 4.8, 1-5 Şeritler). Şekil 4.8B'de gösterilen yoğunluk için ölçülen striplerdir ve bu da yüksek bir korelasyon ( $R^2=0.98$ ) ile TMB ile *L. monocytogenes* arasında bir doğrusal ilişki olduğunu göstermiştir. TMB miktarları Şekil 4.4 C'ye göre bantların yoğunluklarından hesaplanmıştır. Bu elde ettiğimiz veriler ışığında, aptamer kapılı nanopartiküller ile *L. monocytogenes* hücrelerinin etkileşimine görsel olarak tanımlayabilen veya yoğunluğunun ölçülebileceği, HRP da mavi çökeltiye dönüşen TMB salınımı oluşturduğu ispatlanmış oldu. Şeritler (Şekil 4.8 A) 1, 2 ve 3 numaralı bantlardaki analiz sonuçları sırasıyla  $3 \times 10^6$ ,  $3 \times 10^5$  ve  $3 \times 10^4$  *L. monocytogenes* hücre konsantrasyonlarıdır.

*L. monocytogenes* varlığı görsel inceleme yöntemi ile belirgin şekilde tanımlanmasada yoğunluk ölçümü ile tanımlanabilir olduğuda gösterilmiştir. Deney sürecimizde şerit (Şekil 4.8 A) 4-5 görsel olarak ayırt edilemese de yoğunluk analizi ile ölçülebilmıştır. Bu nedenle  $3 \times 10^6$  hücelere kadar olan örneklerde *L. monocytogenes*'in varlığını tespit etmek için, görsel inceleme kullanılabilir ya da  $3 \times 10^3$  hücreden daha az mı olduğunun tespiti için uygun stripler ve yoğunluk ölçümü ile tanımlanabilir.



**Şekil 4.8:** Doğranmış tavuk örnekleri ile aptamer kapılı silika nanopartiküller ile bakteri varlığının tespit edilmesi. A) *L. monocytogenes* içeren numuneler eklendikten 5 dakika sonra aptamer kapılı silika nanopartiküllerden TMB salınımının strip sonuçları, B) Yoğunluk analizi sonuçları, C) *L. innocua* ve *E. coli* negatif kontrol deneyleri strip sonuçları.

Strip testler ayrıca iki ayrı tür bakteri ile daha denenmiştir. Bunlardan biri *L. monocytogenes* ile yakın bir tür olan *L. innocua*, (Gram pozitif) ve *E. coli* (Gram negatif) bakterileri ile denenmiştir.  $3 \times 10^5$  *L. innocua* ve  $3 \times 10^5$  *E. coli* hücreleri 1 ml doğranmış tavuk örneğinin içine karıştırıldı. Strip test hedef bakteri olan *L.*

*monocytogenes*'e çok benzer olan *L. innocua* ve farklı bir gruptan olan *E.coli* hücrelerine karşı hiçbir bant oluşturmadığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.8 7 ve 9 numaralı stripler). Bu durum strip testimizin yüksek özgüllük ve spesifite ile çalıştığını ispat etmektedir. Bu durumla birlikte mikroorganizma sayısı yükseltildiğinde  $3 \times 10^6$  *L. innocua* ve *E.coli* içeren numunelerin analizlerinde beklenildiği gibi sinyal üretmiş durumdaydı (Şekil 4.8, 6 ve 8 numaralı stripler). Tespit sınırı ( LOD değeri) sıfır hücreli kontrol şeritlerine dayanarak (Şekil 4.8 B)  $3\sigma$  yöntemiyle 53 hücre olarak tespit edilmiştir. Bu miktar yemeye hazır gıdalar için önerilen tespit sınırınının (100 CFU/g) altında kalmaktadır (Taylor vd., 2019).

## 6.TARTIŞMA ve SONUÇ

Aptamer kapılı silika nanopartiküller kullanılarak geliştirilen yeni yanal akışlı strip formatı ilk olarak aptamer kapıların elde edilmesi ve karakterize edilmesi ile başlamıştır. İlk olarak geliştirilen aptamer kapı moleküllerinin *L. monocytogenes*'e olan afiniteleri SPR metodu ile çalışılmıştır. SPR yüzey plazmonu ışına yapmayan elektromanyetik bir yüzey dalgasıdır ve yüzeyde oluşan moleküler düzeyde değişikliklere hassastır. Bu yöntemle A15 ve A15HP aptamerleri için afinite sabiti ( $K_D$ ) sırasıyla  $42 \pm 11$  hücre ve  $4000 \pm 2000$  hücre olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.1 C) (Şekil 4.2). Aptamer kapı formunun afinite düşüşüne sebep olması daha önceki çalışmalar da göz önüne alındığında beklenen bir durum olarak değerlendirilmiştir (Nielsen vd., 2010). Aptamer kapılı diziler  $3 \times 10^5$  ml hücre konsantrasyonlu denemelerde *L. innocua* ve *E.coli*'ye karşı düşük sinyal elde edilmesi spesifikite de herhangi bir düşmenin olmadığını göstermiştir (Şekil4.2). Aptamer kapısının özgüllüğü, orijinal aptamer dizisinininkine benzer olduğu çalışmada gözlemlenmiştir. Fakat yüksek hücre sayılarında ( $3 \times 10^7$ ) *L. monocytogenes*, *L. innocua* veya *E. coli* ile benzer düzeyde sinyal elde edilmesi spesifikliğin  $3 \times 10^5$  hücre konsantrasyonuna kadar mümkün olduğunu göstermiştir.

Bir sonraki aşamada mezoporlu silika nanopartikülleri sol-jel yöntemiyle raportör moleküllerin içerisine yüklenmesine ve aptamer kapılarla hapsedilmesine uygun olarak sentezlenmiştir. Mezoporlu silika nanopartikülleri (MSN) ilaç taşıma sistemleri geliştirmede sıklıkla kullanılan bir nanomateryaldir. Ayrıca mesopor kontrolü ile geliştirilmiş biyosensör sistemleri de mevcuttur. Yüksek hacim ve yüzey alanı, düzenli ve bağımsız nanokonteyner içermesi nedeniyle MSN'ler yüksek yükleme kapasitesine sahiptir (Narayan, 2018). Sentez koşulları bu önemli özellikleri



belirlemektedir. Bu nedenle yeni sentezlenen partikülerin boyut, mezopor açıklığı ve kapasitesi gibi özelliklerinin belirlenmesi, daha sonraki aşamaların verimli bir şekilde başarılabilmesi için gereklidir. Bu çalışmada sentezlenen partiküllerin 201 nm de ve düzgün hexagonal mezopor yapıları 2.3 nm açıklıkta sahip olduğu TEM ve DLS analizi ile belirlenmiştir. Böylece yanal akışlı sistemin geliştirilmesine uygun özellikte olduğu görülmüştür.

Biyosensör geliştirilmesinde önemli olan parametrelerden biri de hapsedilen TMB'nin hedef hücre varlığında ne kadar ve ne oranda salım yaptığıdır. Bu salımın kısa sürede tespit edilebilir düzeyde olması önemlidir. Fakat biyosensör geliştirmek için özellikle ilk 15 dakikada ne kadar TMB salımı yapıldığı daha kritiktir. Aptamer kapı ile hazırlanan partiküller ilk 15 dakikada *L. monocytogenes* varlığında 7.8 nmol TMB salımı yaparken hedef bakteri yokken 0.5 nmol (%6 kadar) TMB yapmaktadır. Bu sonuçlar sentezlenen TMB kaplı silika nanopartiküllerin sadece *L. monocytogenes* varlığında salım yaptığını göstermektedir.

Salınım deneyleri ve strip denemeleri *L. monocytogenes*'nin 5 dakika gibi bir kısa sürede raportör molekül olan TMB'nin hızlı salınımını tetikleyebileceğini göstermiş, bu da görsel tespiti mümkün kılmak için LFA bantlarının oluşmasını ve kantitatif sonuç alınması için yeterli olacağı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.4 A). TMB yüklü aptamer-silika nanopartikülleri konjugat pad bölgesine önceden eklendiğinde ve belli sayıda *L. monocytogenes* veya kontrol suşlarından hücrelerin eklendiği ve tavuk eti matrisinde hazırlanan numunelerin stripe uygulanması ile yapılan denemelerde 53 hücre/ml LOD değeri ile başarılı bir strip geliştirildiği gösterilmiştir. Literatürde farklı formatlarda

yapılan çalışmalarla karşılaştırıldığında bu değerin 15 dakikada ve strip formatında olduğu gözönüne alınırsa üstün olduğu anlaşılmaktadır.

Radhakrishnan ve Poltronieri (2017) *L. monocytogenes*'in floresansız tespiti üzerine bir sistem geliştirmiştir. Bu çalışmalar genellikle, SPR ve EIS (electrochemical impedance spectroscopy) üzerinde yapılan çalışmalardır ve *L. monocytogenes*'i düşük konsantrasyonlarda (1 log CFU/ml) tespit edebildiği gösterilmiştir. Bu analizler ile çok düşük sayıdaki bakteriyi tespit edebilmesine rağmen uzman kullanıcı ve laboratuvar şartları testin yapılabilmesi için zorunludur.

Wang vd., (2007) yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes* tespiti için floresan işaretli kuantum dot ve *L. monocytogenes*'e özgül biyotin ile bağlanmış antikolar ve streptavidin bağlanmış kuantum tanecikleri (kuantum dot) kullanmıştır. *L. monocytogenes*'in immünomanyetik olarak tutulması ve tespiti için çalışılmıştır. Toplamda 1.5 saatlik test süresi sonunda 2-3 CFU/ml'ye kadar saf kültürden tespit edebildiği gösterilmiştir.

Ohk vd., (2009) yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'in tespiti için antikor ve aptamer ile fonksiyonelleştirilmiş fiber optik bir biyosensör üzerinde çalışmışlardır. *L. monocytogenes*'e özgü proteinlerden biri olan internalin A 'ya spesifik olarak seçilen aptamer (Aptamer-A8) biyotinli poliklonal antikorla (P66) sandviç formatında kullanıldığı bildirilmiştir. *L. monocytogenes*'in seçilimi için streptavidin kaplı optik yüzeye immobilize edilmiş ve biyosensör patojenik mikroorganizmaların olduğu bakteri karışımında *L. monocytogenes* 'i tespit edebildiği bildirilmiştir. Ayrıca optik biyosensör

*L. monocytogenes* ile *in vitro* kontamine olmuş tüketime hazır gıdalarda da 18 saatlik ön zenginleştirme işlemlerinden sonra *L. monocytogenes*'i ( $10^2$ CFU/g) tespit limiti ile tespit edebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada düşük tespit sınırına olsa da ön hazırlık kısmında laboratuvar ve uzman personel ihtiyacı duyulmaktadır.

Pisamayrom vd., (2017) çalışmalarında *L. monocytogenes*'in hızlı ve kolay tespit edilebilmesi için floresan analizine dayalı bir strip test üzerine bir çalışma yapmışlardır. Yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'in *hly* genini tespit edebilmek için, bu gen bölgesi izotermal DNA amplifikasyonu (LAMP) yöntemiyle çoğaltılmış ve strip üzerine SYBR Gold™ floresan immobilizasyonu ile strip geliştirilerek tasarlanan biyosensörün test sonuçları yayınlanmıştır. Ön zenginleştirme işlemleri dahil 4.5 saatte mini santrifüj, su banyosu ve UV LED cihazları kullanarak sonuç verebilen strip testinin kullanılabilirliği bildirilmiştir. Çalışmada 50g tüketime hazır balık numunelerinde *hly* genini 100 kopya tespit edebildiği bildirilmiştir. Bu çalışmada düşük tespit sınırı elde edilmiş olsa da ön hazırlık kısmında laboratuvar ve uzman personel ihtiyacı vardır.

Wang vd., (2017) yaptıkları çalışmada *L. monocytogenes*'in hızlı ve kolay tespiti için yanal akışlı biyosensör sistemi tasarladıklarını bildirmişlerdir. Çalışmalarında çoklu çapraz yer değiştirmeli (MCDA) etiket kullanarak altın nanopartiküller ile bir yanal akışlı strip testi çalışması bildirmişlerdir. Çalışmada 20 dakikalık ısıtıcı ile amplifikasyon işlemi sonrası strip test ile sonuçlar ölçülmüş ve tüm prosedür 1 saat içinde tamamlandığı bildirilmiştir. *L. monocytogenes*'in saf kültür bakterileri içinde 10fg kadar tespit edilebildiği bildirilmiştir.

Bu çalışmanın temel amaçlarından biri hızlı sonuç veren bir strip biyosensör tasarlamak olduğu için nanopartiküllerin erken salınım profiline odaklanılmıştır. Erken salınım profili için 5 dakikalık test süresi ön görülmüş ve bu 5 dakikalık sürenin aptamer kapı etkisini göstererek sonuçların algılanması için yeterli bir zaman olacağı düşünülmüştür (Şekil 4.4 A ek grafik).

Bu çalışmada doğranmış tavuk örneklerindeki *L. monocytogenes*'in kantitatif ve görsel varlığını belirlemek için aptamer kapılı raportör TMB ile yüklü mezoporöz silika nanopartiküller kullanarak çalışan bir strip test modeli geliştirmeyi hedeflenmiştir. Bu strip test modelinde TMB molekülünün hedef varlığında salınımı aptamer kapı ve hedef bakteri olan *L. monocytogenes*'in spesifik etkileşimi ile sağlanmaktadır. TMB salınımı test ve kontrol bölgelerindeki mavi çökelti oluşumu ile görsel ve yoğunluk analizleri ile ölçülmüştür. Çalışmamızda aptamer kapılı TMB yüklü mezoporöz silika nanopartiküllerin 53 hücre LOD değerine kadar tespit edilebilmesin yanıl akış strip deneyleri ile 5 dakikalık strip analiz süreci ile mümkün kılmaktadır. Aptamerler hedefe spesifik sentezlenebildiği için bu yanıl akış strip modelinin birçok farklı hedefe (mikroorganizmalar, proteinler, küçük moleküller) yönelik üretilebilir ve bu sistem farklı moleküllerin hızlı ve kolay tespiti için kullanılabilir.

## 7. KAYNAKLAR DİZİNİ

- Asal, M., Özen, Ö., Şahinler, M., & Polatoğlu, İ.** 2018, Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. *Sensors*, 18(6), 1924.
- Asal, M., Özen, Ö., Şahinler, M., & Polatoğlu, İ.** 2018, Recent developments in enzyme, DNA and immuno-based biosensors. *Sensors*, 18(6), 1924.
- Aznar, E., Oroval, M., Pascual, L., Murguía, J. R., Martinez-Manez, R., & Sancenon, F.** 2016, Gated materials for on-command release of guest molecules. *Chemical reviews*, 116(2), 561-718.
- Bayraç, A. T., & Kandemir, B. B.** 2018, Domuz Jelatinine Özgü DNA Aptamerlerinin Seçilimi ve Karakterizasyonu. *Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 22(2), 774-778.
- Bayraç, C.** 2014, *Generation Of Aptamer Against Salmonella Serovar Enteritidis And Development Of Aptamer-Based Capillary Biosensor* (Doctoral dissertation, Middle East Technical University).
- Bayramoglu, G., Ozalp, V. C., Dincbal, U., & Arica, M. Y.** 2018, Fast and sensitive detection of Salmonella in milk samples using aptamer-functionalized magnetic silica solid phase and MCM-41-aptamer gate system. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 4(4), 1437-1444.
- Borsa, B. A., Tuna, B. G., Hernandez, F. J., Hernandez, L. I., Bayramoglu, G., Arica, M. Y., & Ozalp, V. C.** 2016, Staphylococcus aureus detection in blood samples by silica nanoparticle-oligonucleotides conjugates. *Biosensors and Bioelectronics*, 86, 27-32.
- Biosensor, L.**, <http://54.148.226.95/en/index.html> (Erişim tarihi: 15 Kasım 2019)
- Capita, R., Alonso-Calleja, C., Moreno, B., & García-Fernández, M. C.** 2001., Occurrence of Listeria species in retail poultry meat and comparison of a cultural/immunoassay for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 65(1-2), 75-82.
- Chen, J. Q., Healey, S., Regan, P., Laksanalamai, P., & Hu, Z.** 2017, PCR-based methodologies for detection and characterization of Listeria monocytogenes and Listeria ivanovii in foods and environmental sources. *Food Science and Human Wellness*, 6(2), 39-59.
- Crealys, S, C.**, 'Pylori K-set' <https://www.corisbio.com/Products/Human-Field/Helicobacter-pylori.php> (Erişim tarihi: 18 Kasım 2019)
- Coban, A., Pennone, V., Sudagidan, M., Molva, C., Jordan, K., & Aydin, A.** 2019, Prevalence, virulence characterization, and genetic relatedness of Listeria monocytogenes isolated from chicken retail points and poultry slaughterhouses in Turkey. *Brazilian Journal of Microbiology*, 50(4), 1063-1073.
- Desai, A. N., Anyoha, A., Madoff, L. C., & Lassmann, B.** 2019., Changing epidemiology of Listeria monocytogenes outbreaks, sporadic cases, and recalls globally: A review of ProMED reports from 1996 to 2018. *International Journal of Infectious Diseases*, 84, 48-53.
- Dewey M. D., Manikonda, K., Hall, A. J., Wise, M. E., & Crowe, S. J.** 2018, Surveillance for foodborne disease outbreaks—United States, 2009–2015. *MMWR Surveillance Summaries*, 67(10), 1.
- Dong, S., & Chen, X.** 2002, Some new aspects in biosensors. *Reviews in Molecular Biotechnology*, 82(4), 303-323
- Duan, N., Ding, X., He, L., Wu, S., Wei, Y., & Wang, Z.** 2013, Selection, identification and application of a DNA aptamer against Listeria monocytogenes. *Food Control*, 33(1), 239-243.

- Ercan, M., Ozalp, V. C., & Tuna, B. G.** 2017, Genotyping of single nucleotide polymorphism by probe-tagged silica nanoparticles. *Analytical biochemistry*, 537, 78-83.
- Eserdağ, S.**, 'Gebelik testi ve Hcg Hormonu' <https://www.jinekolognet.com/gebelik-testi.asp> (Erişim tarihi: 15 Kasım 2019)
- Ferreira, V., Wiedmann, M., Teixeira, P., & Stasiewicz, M. J.** 2014., *Listeria monocytogenes* persistence in food-associated environments: epidemiology, strain characteristics, and implications for public health. *Journal of food protection*, 77(1), 150-170.
- Gandhi, M., & Chikindas, M. L.** 2007, *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. *International journal of food microbiology*, 113(1), 1-15.
- Hermanson G.T.**, 2008, Bioconjugate Techniques, *Elsevier*, San Diego, USA,.
- Hong, K. L., & Sooter, L. J.** 2015, Single-stranded DNA aptamers against pathogens and toxins: Identification and biosensing applications. *BioMed research international*, 2015.
- Justino, C. I., Duarte, A. C., & Rocha-Santos, T. A.** 2017, Recent progress in biosensors for environmental monitoring: A review. *Sensors*, 17(12), 2918.
- Kim, D. H., Chon, J. W., Kim, H., Kim, H. S., Choi, D., Kim, Y. J., ... & Seo, K. H.** 2014, Comparison of culture, conventional and real-time PCR methods for *Listeria monocytogenes* in foods. *Korean journal for food science of animal resources*, 34(5), 665.
- Kim, Y. S., Hyun, C. J., Kim, I. A., & Gu, M. B.** 2010, Isolation and characterization of enantioselective DNA aptamers for ibuprofen. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 18(10), 3467-3473.
- Kökbaşı, U., Kayrın, L., & Tuli, A.** 2013, Biyosensörler ve tıpta kullanım alanları. *Arşiv Kaynak Tarama Dergisi*, 22(4), 499-513.
- Li, Y., Qi, H., Peng, Y., Yang, J., & Zhang, C.** 2007, Electrogenerated chemiluminescence aptamer-based biosensor for the determination of cocaine. *Electrochemistry Communications*, 9(10), 2571-2575.
- Liu, J., Zeng, J., Tian, Y., & Zhou, N.** 2018, An aptamer and functionalized nanoparticle-based strip biosensor for on-site detection of kanamycin in food samples. *Analyst*, 143(1), 182-189.
- Li, S. R., Guan, W. C., Wu, Z. G., Lu, J. C., & Guo, J.** 2007, An improved method to determine epoxy index of epoxy resins. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 46(9), 901-903.
- Luber, P.** 2011., The Codex Alimentarius guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. *Food Control*, 22(9), 1482-1483.
- Majdinasab, M., Hayat, A., & Marty, J. L.** 2018, Aptamer-based assays and aptasensors for detection of pathogenic bacteria in food samples. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 107, 60-77.
- Malekghasemi, S.** 2015, Kağıt-Tabanlı Biyosensör Tasarımı ve Geliştirilmesi. *hacettepe.edu.tr*
- Mayer, G.** 2009, The chemical biology of aptamers. *Angewandte Chemie International Edition*, 48(15), 2672-2689.
- Narayan, R., Nayak, U. Y., Raichur, A. M., & Garg, S.** 2018, Mesoporous Silica Nanoparticles: A Comprehensive Review on Synthesis and Recent Advances. *Pharmaceutics*, 10(3), 118. doi:10.3390/pharmaceutics10030118
- Neethirajan, S., Ragavan, V., Weng, X., & Chand, R.** 2018, Biosensors for sustainable food engineering: challenges and perspectives. *Biosensors*, 8(1), 23.

- Nielsen, L. J., Olsen, L. F., & Ozalp, V. C.** 2010, Aptamers embedded in polyacrylamide nanoparticles: a tool for in vivo metabolite sensing. *Acs Nano*, 4(8), 4361-4370.
- Nivens, D. E., McKnight, T. E., Moser, S. A., Osbourn, S. J., Simpson, M. L., & Sayler, G. S.** 2004, Bioluminescent bioreporter integrated circuits: potentially small, rugged and inexpensive whole-cell biosensors for remote environmental monitoring. *Journal of Applied Microbiology*, 96(1), 33-46.
- Özalp, V. C., Bayramoglu, G., Kavruk, M., Keskin, B. B., Oktem, H. A., & Arica, M. Y.** 2014, Pathogen detection by core-shell type aptamer-magnetic preconcentration coupled to real-time PCR. *Analytical biochemistry*, 447, 119-125.
- Özalp, V. C., & Schäfer, T.** 2011, Aptamer-based switchable nanovalves for stimuli-responsive drug delivery. *Chemistry—A European Journal*, 17(36), 9893-9896.
- Özalp, V. C., Pinto, A., Nikulina, E., Chuvilin, A., & Schäfer, T.** 2014, In Situ Monitoring of DNA-Aptavalve Gating Function on Mesoporous Silica Nanoparticles. *Particle & Particle Systems Characterization*, 31(1), 161-167.
- Özalp, V. C., Zeydanlı, U. S., Lunding, A., Kavruk, M., Öz, M. T., Eyidoğan, F., ... & Öktem, H. A.** 2013, Nanoparticle embedded enzymes for improved lateral flow sensors. *Analyst*, 138(15), 4255-4259.
- Ohk, S. H., Koo, O. K., Sen, T., Yamamoto, C. M., & Bhunia, A. K.** 2010, Antibody-aptamer functionalized fibre-optic biosensor for specific detection of *Listeria monocytogenes* from food. *Journal of applied microbiology*, 109(3), 808-817.
- Pan, Q., Luo, F., Liu, M., & Zhang, X. L.** 2018, Oligonucleotide aptamers: Promising and powerful diagnostic and therapeutic tools for infectious diseases. *Journal of Infection*, 77(2), 83-98.
- Pacific, N, N, L.,** 'New Nano-canary In The Nanotoxicology Coalmine: The Body Itself. *ScienceDaily*' [www.sciencedaily.com/releases/2006/02/060221092236.htm](http://www.sciencedaily.com/releases/2006/02/060221092236.htm) (Erişim tarihi: 22 Eylül 2019)
- Pisamayaram, K., Suriyasomboon, A., & Chaumpluk, P.** 2017, Simple Screening of *Listeria monocytogenes* Based on a Fluorescence Assay via a Laminated Lab-On-Paper Chip. *Biosensors*, 7(4), 56.
- Rodriguez-Lopez, P., Rodríguez-Herrera, J. J., Vazquez-Sanchez, D., & Lopez Cabo, M.** 2018, Current knowledge on *Listeria monocytogenes* biofilms in food-related environments: incidence, resistance to biocides, ecology and biocontrol. *Foods*, 7(6), 85.
- Sancenón, F., Pascual, L., Oroval, M., Aznar, E., & Martínez-Mañez, R.** (2015). Gated silica mesoporous materials in sensing applications. *ChemistryOpen*, 4(4), 418-437.
- Savaş, S.** 2018, Altın Nanopartikül İşaretli Biyosensör İle E. Coli'nin Hızlı Ve Duyarlı Tespiti. *Journal Of Biotechnology And Strategic Health Research*, 2(2), 101-107.
- Senturk, E., Aktop, S., Sanlibaba, P., & Tezel, B. U.** 2018, Biosensors: A Novel Approach to Detect Food-borne Pathogens. *Appli Microbiol Open Access*, 4(151), 2.
- Sentez, L.,** <http://www.sentezgroup.com.tr/optik/cevre-ve-karistirici-isitici-grubu/hot-plate/bod-sensor-sistem-civasiz-> (Erişim tarihi: 10 Kasım 2019)
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W.** 2012, NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671.
- Syam, R., Davis, K. J., Pratheesh, M. D., Anoopraj, R., & Joseph, B. S.** 2012., Biosensors: a novel approach for pathogen detection. *Vetscan*, 7(1), 14-18.

- Tabit, F. T.** 2018, Contamination, Prevention and Control of *Listeria monocytogenes* in Food Processing and Food Service Environments. *Listeria Monocytogenes*, 71.
- Taylor, B. J., Quinn, A. R., & Kataoka, A.** 2019., *Listeria monocytogenes* in low-moisture foods and ingredients. *Food Control*.
- Tombelli, S., Minunni, M., Luzi, E., & Mascini, M.** 2005, Aptamer-based biosensors for the detection of HIV-1 Tat protein. *Bioelectrochemistry*, 67(2), 135-141.
- Tominaga, T.** 2019, Rapid detection of coliform bacteria using a lateral flow test strip assay. *Journal of microbiological methods*, 160, 29-35.
- Vicario, T. (Ed.)**. 2015, *Listeria Monocytogenes: Incidence, Growth Behavior and Control*. Nova Biomedical
- Wang, Y., Li, H., Wang, Y., Li, H., Luo, L., Xu, J., & Ye, C.** 2017, Development of multiple cross displacement amplification label-based gold nanoparticles lateral flow biosensor for detection of *Listeria monocytogenes*. *International journal of nanomedicine*, 12, 473.
- Wang, H., Li, Y., & Slavik, M.** 2007, Rapid detection of *Listeria monocytogenes* using quantum dots and nanobeads-based optical biosensor. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 15(1), 67-76.
- Wu, W., Yu, C., Wang, Q., Zhao, F., He, H., Liu, C., & Yang, Q.** 2019, Research advances of DNA aptasensors for foodborne pathogen detection. *Critical reviews in food science and nutrition*, 1-16
- Yavuz, M., & Korukluoğlu, M.** 2010, *Listeria monocytogenes*' in gıdalardaki önemi ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 24(1), 1-10.
- Yasa, S.**, 'Kan şekeri Takibi' [http://www.diabetcemiyeti.org/var/cdn/e/c/kamp\\_seker\\_olcumu.pdf](http://www.diabetcemiyeti.org/var/cdn/e/c/kamp_seker_olcumu.pdf) (Erişim tarihi: 15 Kasım 2019)
- Yurdakul, M., Oktem, H. A., & Yilmaz, M. D.** 2019, Transition Metal Chelated Biopolymer Coated Mesoporous Silica Nanoparticles as Highly Efficient, Stable, and Recyclable Nanocatalysts for Catalytic Bleaching. *ChemistrySelect*, 4(7), 2084-2088.
- Zhang, X., Kitaoka, H., Tsuji, S., Tamai, M., Kobayashi, H., Honjoh, K. I., & Miyamoto, T.** 2014, Development of a simultaneous detection method for foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Food Science and Technology Research*, 20(2), 317-325.
- Zhang, Y., Yuan, Q., Chen, T., Zhang, X., Chen, Y., & Tan, W.** 2012, DNA-capped mesoporous silica nanoparticles as an ion-responsive release system to determine the presence of mercury in aqueous solutions. *Analytical chemistry*, 84(4), 1956-1962.