



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ



***ESCHERICHIA COLI* TAYİNİ İÇİN YATAY AKIŞ İMMÜNOASSAY PLATFORMLARININ GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşen GÜMÜŞTAŞ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

ANKARA

2019

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

***ESCHERICHIA COLI* TAYİNİ İÇİN YATAY AKIŞ
İMMÜNOASSAY PLATFORMLARININ
GELİŞTİRİLMESİ**

Ayşen GÜMÜŞTAŞ

ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. Bengi USLU

İKİNCİ DANIŞMAN

Prof. Dr. Uğur TAMER

Bu araştırma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumunun (TÜBİTAK)
COST CA15114-114Z783 numaralı projesi ile desteklenmiştir.

ANKARA

2019

Etik Beyan

Ankara Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Yüksek Lisans tezi olarak hazırlayıp sunduğum “*Escherichia coli* Tayini için Yatay Akış İmmünoassay Platformlarının Geliştirilmesi” başlıklı tez; bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yazılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir. Tezde yer alan deneysel çalışma/araştırma tarafımdan yapılmış olup, tüm cümleler, yorumlar bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususların doğruluğunu beyan ederim.

Öğrencinin Adı Soyadı: Ayşen GÜMÜŞTAŞ

Tarih: 03.12.2019

İmza:

Kabul ve Onay

Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Analitik Kimya Anabilim Dalında

Ayşen GÜMÜŞTAŞ tarafından hazırlanan

“*Escherichia coli* Tayini için Yatay Akış İmmünoassay Platformlarının Geliştirilmesi”

adlı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak OY

BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile kabul/ret edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 28.11.2019

Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN

Ankara Üniversitesi

Jüri Başkanı

Prof. Dr. Bengi USLU

Ankara Üniversitesi

Üye

Doç. Dr. Emirhan NEMUTLU

Hacettepe Üniversitesi

Üye

Tez hakkında alınan jüri kararı, Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu tarafından onaylanmıştır.

Prof. Dr. Mehmet AKAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

İÇİNDEKİLER

Etik Beyan	ii
Kabul ve Onay	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖNSÖZ	vi
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER	ix
ÇİZELGELER	xi
1.GİRİŞ	1
1.1. <i>Escherichia coli</i> Genel Özellikler	1
1.1.1.Epidemiyoloji	2
1.2. Mikroorganizma Tayin Yöntemleri	2
1.2.1.Kültürel Yöntemler	2
1.2.1.1. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler	3
1.2.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi	4
1.2.1.3. En Muhtemel Sayı Yöntemi	4
1.2.2.Mikroskopik Yöntemler	5
1.2.3.İmmünolojik Yöntemler	5
1.2.4.Moleküler Yöntemler	6
1.2.5.Biyosensörler	7
1.2.5.1. Kağıt Tabanlı Biyosensörler	10
1.2.5.1.1. Kağıt Tabanlı Sensörlerin Tayin Yöntemleri	13
2. GEREÇ VE YÖNTEM	17
2.1. Gereç	17
2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	17
2.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma, Antikor ve Besiyerleri	18
2.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar	18
2.2. Yöntem	19
2.2.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması	19
2.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması	19
2.2.3. Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması	20
2.2.4. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi	20
2.2.5. Sitrathlı Altın (Au) Nanopartikül Sentezi	21
	iv

2.2.6. Sentezlenen Sitratlı AuNP'lerin Boyut Optimizasyonu	22
2.2.7. Farklı Raman Etiketlerinin Sitratlı AuNP Konjugasyonunda Optimizasyonu	23
2.2.8. Kullanılacak Antikor Miktarının Optimizasyonu	24
2.2.9. Raman Etiketli AuNP Konjugasyonu	26
2.2.10. Yatay Akış İmmunoassay Platformu için Test Membranının Belirlenmesi	27
2.2.11. Yatay Akışlı İmmunoassay Şeritlerinin Hazırlanması	28
2.2.12. Seçicilik Çalışmaları	31
2.2.13. Yatay Akış İmmunoassay Platformunun Yapay İdrar Örneklerinde Uygulanması	32
3. BULGULAR	33
3.1. Farklı Boyutlarda Sitratlı Altın Nanopartikül Sentezi Optimizasyon Çalışmaları	33
3.2. Farklı Gözenek Büyüklüğünde Nitroselüloz Membran Kullanımının Etkileri	36
3.2. Kullanılacak Antikor Miktarının Optimizasyonu	37
3.3. Farklı Raman Etiketleri ile Altın Nanopartikül Modifikasyonu	39
3.4. Yatay Akış İmmunoassay Platformlarında <i>E.coli</i> Tayini	40
3.5. Seçicilik Çalışmaları	44
3.6. Yapay İdrar Örneklerine Uygulama	45
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	53
ÖZET	55
SUMMARY	56
KAYNAKLAR	57
ÖZGEÇMİŞ	62

ÖNSÖZ

Bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi tanı, çevre ve gıda analizleri için son zamanlardaki en önemli konulardan biridir. Birçok ciddi ve hatta ölümcül hastalıklar bakteri enfeksiyonu veya bulaşı sonucunda oluşur. Bakterilerin tayini için şimdiye kadar birçok yöntem geliştirilmiş, fakat bu yöntemler ile erken teşhis yapılamamaktadır. Önerilen tez kapsamında, halk sağlığı, ekonomik ve endüstriyel gelişmeler açısından hastalıklara neden olan bu bakterilerin tayini için alternatif hızlı ve ucuz bir tekniğin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu bağlamda yüksek hassasiyette ve doğrulukta hızlı bakteri tayini için yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması ölçümüne dayanan kağıt tabanlı yatay akış immunoassay platformları geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Tezimin çalışmalarını COST CA15114-114Z783 numaralı proje ile destekleyen Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)'na, tez konusu seçiminde ve tezimin hazırlanmasında yol gösteren, karşılaştığım sorunların çözümünde bilimsel destekleriyle her zaman yanımda olan danışmanım Prof Dr. Bengi Uslu ve eş danışmanım Prof. Dr. Uğur Tamer'e, maddi, manevi desteğini hep yanımda hissettiğim sevgili hocam Prof. Dr. Sibel A. Özkan'a, tüm çalışmalarım boyunca yol gösterip tezimin her aşamasına yardımcı olan arkadaşım Doç Dr. Gökhan Çağlayan'a, tez çalışmalarım boyunca beni her konuda destekleyip yardımlarını esirgemeyen sevgili ekip arkadaşlarım Esin Nagihan Kasap, Elçin Ezgi Ahi, Hilal Torul'a, arkamda her zaman desteğini hissettiğim canım arkadaşlarım Dr. Öğr. Üyesi Merve Eylül Kıymacı ve Dr. Çiğdem Karaaslan'a,

Hayatımın her aşamasında olduğu gibi hep yanımda olup bana destek olan sevgili eşim Mehmet Gümüştaş'a, tüm hayatım boyunca sonsuz sevgi ve destekleriyle yanımda olan sevgili annem Necla Yıldırım, babam Hasan Ali Yıldırım ve kardeşim Ruşen Erdoğan'a,

Teşekkürlerimi sunarım.

SİMGELER VE KISALTMALAR

μg	Mikrogram
μL	Mikrolitre
μm	Mikrometre
ATCC	Amerikan tıp kültür koleksiyonu
AuNP	Altın nanopartikül
BSA	Sığır serum albümin
BSS	Bağıl standart sapma
cm	Santimetre
DEFT	Direkt epifloresan filtreleme tekniği
dk	Dakika
DNA	Deoksiribo nükleik asit
DTNB	5,5-ditiobis-2-nitrobenzoik asit
ELISA	Enzim bağlı immünoassay
EMS	En muhtemel sayı
g	Gram
H_3BO_3	Borik asit
HAuCl_4	Hidrojen tetrakloro aurat
Ig	İmmunoglobulin
IgG	İmmünoglobulin G
IUPAC	Uluslararası temel ve uygulamalı kimya birliği
KCl	Potasyum klorür
KH_2PO_4	Potasyum dihidrojen fosfat
kob	Koloni oluşturan birim

L	Litre
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mV	Milivolt
mW	Miliwatt
MΩ	Megaohm
Na ₂ B ₄ O ₇ .10H ₂ O	Boraks
Na ₂ HPO ₄	Disodyum hidrojen fosfat
Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇	Tri-sodyum sitrat
NaCl	Sodyum klorür
NaOH	Sodyum hidroksit
nm	Nanometre
°C	Santigrat
PBS	Fosfat tamponlu tuz
PCR	Polimer zincir reaksiyonu
RNA	Ribo nükleik asit
rpm	Dakikada devir sayısı
s	Saniye
SEM	Taramalı elektron mikroskobu
SERS	Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi
TEM	Geçirimli elektron mikroskobu
TSA	Tyriptic soy agar
µm	Mikrometre

ŞEKİLLER

Şekil 1. 1. Biyosensörlerin tarihsel gelişimi	8
Şekil 1. 2. Biyosensör tasarımı	9
Şekil 2. 1. Kuyucuklu plaka içerisine farklı pH’lerde hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden ve antikor çözeltisi eklendikten sonra görünüşleri.	25
Şekil 2. 2. AuNP’lerin DTNB ile modifiye edildikten sonraki çözeltileri (a), çözeltilerin konjugasyon pedine emdirildikten sonraki görünüşleri (b)	27
Şekil 2. 3. Hazırlanan membranların ölçüleri	29
Şekil 2. 4. Şırınga pompaları kullanılarak hazırlanan mikrodispenser.	30
Şekil 2. 5. Hazırlanan yatay akışlı immunoassay platformlarından görüntüler: A) Konjugasyon pedi içermeyen yatay akışlı immunoassay şeridi, B) Konjugasyon pedi içeren yatay akışlı immunoassay şeridi	31
Şekil 3. 1. Sitrathlı ortamda farklı boyutlarda sentezlenen AuNP’ler.	34
Şekil 3. 2. Sentezlenen altın nanopartiküllerin absorpsiyon spektrumları.	34
Şekil 3. 3. Farklı konsantrasyonlarda HAuCl_4 kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküller ile <i>E.coli</i> (10^3 kob/mL) için gerçekleştirilen yatay akış immunoassay testinden elde edilen Raman spektrumları.	35
Şekil 3. 4. Optimizasyon çalışmaları sonucunda seçilen % 0,01 HAuCl_4 kullanılarak sentezlenen AuNP’lerin TEM görünüşleri.	36
Şekil 3. 5. Nitroselüloz membran optimizasyonu deneylerinden elde edilen SERS şiddetleri.	37
Şekil 3. 6. Antikor agregasyon testi görüntüleri.	38
Şekil 3. 7. Agregasyon testi sonuçları	39

- Şekil 3. 8.** Yatay akış immunoassay şeritlerine *E. coli* örnekleri verildikten sonra görünümleri. 41
- Şekil 3. 9.** Artan bakteri derişimine karşı DTNB'den gelen (1338cm^{-1} 'de, N-O bağı arasındaki simetrik gerilme titreşimine ait) sinyaller. 42
- Şekil 3. 10.** Alınan SERS spektrumlarından yararlanılarak elde edilen kalibrasyon grafiğı. 43
- Şekil 3. 11.** Yatay akış immunoassay şeritlerine aynı konsantrasyonda (10^4 kob/mL) farklı bakteri örnekleri verildikten sonra alınan SERS spektrumları. 44
- Şekil 3. 12.** Test çizgisi üzerinde artan bakteri derişimine karşı SERS sinyal artışını gösteren spektrumlar. 45
- Şekil 3. 13.** (a) Konjugasyon pedine emdirilmiş altın nanokürelerin SEM görüntüsü, (b) İşlem görmemiş nitroselüloz membran SEM görüntüsü, (c) Antikor immobilize edilmiş nitroselüz membran test bölgesinde *E.coli* ve nanokürelerin etkileşiminin SEM görüntüsü. 46

ÇİZELGELER

Çizelge 2. 1. Karşılaştırılan Raman etiketlerinin özellikleri ve hazırlanan konsantrasyonlar.	23
Çizelge 3. 1. Sentezlenen AuNP'ler için kullanılan HAuCl_4 konsantrasyonları.	33
Çizelge 3. 2. Elde edilen kalibrasyon sonuçları.	43
Çizelge 3. 3. İdrar örneklerinden elde edilen geri kazanım sonuçları	45
Çizelge 4. 1. Literatürde yapılmış benzer çalışmalar	52

1.GİRİŞ

1.1. *Escherichia coli* Genel Özellikler

1885 yılında Alman pediatrist ve mikrobiyolog Theodor Escherich bebek dışkıları ve hastalıklardaki rolüyle ilgili çalışmalara başlamıştır. Yaptığı çalışmalar boyunca çok hızlı üreyebilen bazı organizmalar izole etmiş ve bu organizmaları *Bacterium coli commune* olarak isimlendirmiştir (Escherich, 1989; Shulman ve ark., 2007). Bahsi geçen bakterinin karakteristik özelliklerinin belirlenmesi üzerine birçok çalışma yapılmış ve 1960'lı yıllarda *Escherichia* cinsi tanımlanmıştır. Bu cins; tıbbi olarak önemli gram negatif basillerin en geniş topluluğu olan Enterobacteriaceae ailesine mensuptur. Bu aile üyeleri toprakta, suda, bitkilerde, insan ve birçok hayvanın normal bağırsak florasında bulunan, çok yaygın mikroorganizmalardır. Glukozu fermente eder, nitrata indirger, katalaz pozitif ve oksidaz negatif özelliktedirler. Enterobacteriaceae'nin en önemli hücre duvarı antijeni, somatik O polisakkaridi, kor polisakkaridi ve lipit A olmak üzere üç komponentten oluşan, ısıya dayanıklı lipopolisakkarittir. Kor polisakkaridi bir bakterinin Enterobacteriaceae ailesine üye olduğunu gösteren önemli bir faktördür. Enterobacteriaceae somatik O polisakkaritleri, kapsüldeki K antijeni ve flagellalarda bulunan H proteinleri olmak üzere üç majör antijen grubuna göre epidemiyolojik (serolojik) olarak sınıflandırılırlar.

Escherichia coli, *Escherichia* cinsinin en yaygın ve en önemli üyesidir. *E. coli*'nin canlılar arasında hakkında en fazla bilgiye sahip olunan organizma olduğu söylenebilir. Bu nedenle de üzerinde sıkça çalışılmış bir model organizma olmuştur. Gastroenterit, idrar yolu enfeksiyonları, menenjit ve sepsis gibi birçok hastalıkla ilişkilidir. Suşların çoğu

hastalık yapma yeteneğindedir, ancak *E.coli* O157 gibi bazı serotiplerin virölansı daha yüksektir (Blount, 2015; Murray ve ark., 2016).

1.1.1. Epidemiyoloji

E. coli gastrointestinal kanalda bol miktarda bulunmaktadır. Bu bakteriler bağırsak perforasyonu sonucu periton boşluğuna girerek hastalık oluşturan fırsatçı patojenlerdir. Sepsisli hastalardan en sık izole edilen gram-negatif basillerdir. Toplumda kazanılmış idrar yolu enfeksiyonlarının %80’den fazlası ve hastanede kazanılmış çoğu enfeksiyondan sorumludur. Gastroenteritin başlıca etkenidir. Enfeksiyonların çoğu endojendir, yani kişinin savunma mekanizmaları bozulduğunda normal floranın bir üyesi olan *E. coli* hastalık oluşturabilir (Chart, 2012; Murray ve ark., 2016).

1.2. Mikroorganizma Tayin Yöntemleri

1.2.1. Kültürel Yöntemler

Kültürel yöntemler, mikroorganizmaların tayininde kullanılan en güvenilir yöntemlerdir. Ancak, kültür ortamlarının hazırlanması, inokülasyon ve koloni sayımı işlemlerini gerektirdiğinden oldukça zahmetli ve uzun süren analizlerdir. Günler hatta

bazen haftalar alabilen analizlerin yapılabilmesi için deneyimli personel gerekliliği de önemli bir dezavantajdır.

Kültürel yöntemlerin temeli mikroorganizmaların katı ya da sıvı besi ortamları kullanılarak çoğaltılmalarına esasına dayanır. Bu besi ortamları mikroorganizma gelişimi için gerekli amonyum tuzları, nitrat, nitrit, aminoasitler, mineraller, tampon tuzları, gelişme faktörleri, vitaminler, jelleştirme ajanları gibi bileşenlerin suda çözünmesiyle elde edilir. Mikroorganizmaların, bu şekilde laboratuvar koşullarında hazırlanan ve invitro olarak üretilbildikleri ortamlar besiyeri olarak isimlendirilir. Besiyerleri kullanım amaçlarına göre katı ya da sıvı şekilde hazırlanabilirler. Besiyerinin katılaştırılması içi en çok kullanılan madde agar-agar olarak isimlendirilen ve bir deniz yosunundan elde edilen maddedir. Agarın çeşitli oranlarda besiyerine katılmasıyla istenilen kıvamda besiyerleri elde edilir.

Kültürel yöntemler; katı besiyeri kullanılan yöntemler, membran filtrasyon yöntemi ve en muhtemel sayı (EMS) yöntemi olmak üzere üç sınıfta toplanabilir (McMeekin, 2003; Mandal ve ark., 2011; Law ve ark., 2014)

1.2.1.1. Katı Besiyeri Kullanılan Yöntemler

Bu yöntemde katı besiyeri üzerine çeşitli şekillerde örnekler ekilir ve inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda katı besiyeri üzerinde çıplak gözle görülebilecek bakteri kolonileri oluşur. Oluşan kolonilerin sayılmasıyla örnekteki bakteri sayısı belirlenir.

Sayım sonuçları bir mililitrede veya bir gramda koloni oluşturan birim (kob) olarak verilir. Örneklerin besiyerine ekim şekillerine göre katı besiyeri kullanılan yöntemler dökme plak, yayma ve damlatma yöntemleri olmak üzere üç sınıfa ayrılırlar (McMeekin, 2003; Halkman, 2005).

1.2.1.2. Membran Filtrasyon Yöntemi

Bu yöntemde öncelikle bakterilerin geçişine izin vermeyen büyüklükte (0.45 µm) por çapına sahip membran filtrelerle bakteriler örnekten ayrılır. Daha sonra membran filtre uygun bir katı besiyerine yerleştirilir ve uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde oluşan koloniler sayılır ve bakteri miktarı belirlenir (McMeekin, 2003; Halkman, 2005).

1.2.1.3. En Muhtemel Sayı Yöntemi

Yöntemde örnekten ardışık 3 dilüsyon hazırlanır ve her dilüsyondan sıvı besiyeri içeren tüplere ekim yapılarak uygun sıcaklıkta inkübasyona bırakılır. İnkübasyon sonunda tüpler bulanıklıklarına göre pozitif ya da negatif olarak değerlendirilir ve istatistiksel yöntemlerle elde edilmiş çizelgelerden yararlanılarak örnekteki mikroorganizma sayısı hesaplanır (McMeekin, 2003; Halkman, 2005).

1.2.2. Mikroskopik Yöntemler

Bakteriler özel olarak üretilen veya ön hazırlık gerektiren normal lamaların üzerine yayılarak ya direkt olarak ya da boyama işlemi uygulanarak mikroskop altında sayılmaktadır. Direkt mikroskopik sayım yöntemleri canlı ve ölü tüm mikroorganizmaların sayılması gibi çok önemli bir dezavantaja sahip olmasının yanı sıra kısa sürede sonuç alınması ve düşük maliyet gibi avantajlara da sahiptir.

Direkt Epifloresan Filtreleme Tekniği (DEFT) en yaygın kullanılan mikroskopik sayım yöntemleri arasındadır. DEFT yönteminde öncelikle örnekteki mikroorganizma konsantrasyonunu arttırmak amacıyla membran filtrasyon uygulanır. Filtre üzerinde kalan mikroorganizmalar uygun bir besiyerine aktarılır ve inkübe edildikten sonra florokrom bir boya (akridin oranj) ile boyanarak epifloresan mikroskopunda incelenir. Canlı mikroorganizmalar kavuniçi kırmızı, ölü mikroorganizmalar ise yeşil floresan renk vermektedir. Bu sayede canlı ve ölü hücreler birbirinden ayrılarak sayım yapılabilir (McMeekin, 2003; Halkman, 2005; Mandal ve ark., 2011).

1.2.3. İmmünolojik Yöntemler

İmmünolojik yöntemlerin temeli antijen ve antikor arasındaki özgül etkileşimlere dayanmaktadır. Antijen, vücuda girdiğinde bağışık yanıt oluşturan ve bu yanıt sonucu ortaya çıkan antikor ile in vitro veya in vivo koşullarda özgül olarak birleşebilme yeteneğindeki maddelerdir. Antijenler genellikle protein ve polisakkarit yapısında canlı

organizma kısımları ya da büyük moleküllü proteinlerdir. En önemli antijenler bakterilerin yapısına girenlerdir. Bunlar arasında bakterilerin kapsül polisakkaritleri, hücre duvarı yapıları, hücre dışı enzim ve toksinleri sayılabilir. Aynı zamanda virusların kapsid, nükleokapsid ve zarf proteinleri; mantarların hücre duvarı ve hücre membran yapıları; parazitlerin yüzey molekülleri ve bu mikroorganizmaların hücre dışı enzim ve toksinleri mikrobiyal antijenler arasındadır. Antikorlar ise bağışık yanıt sonucunda antijenlere karşı oluşturulan moleküllerdir. Glikoprotein yapısındaki bu moleküller immunoglobulin (Ig) olarak da isimlendirilir ve antijenlerle özgül olarak birleşme yeteneğindedirler. İmmünolojik yöntemlerde analiz başarısı kullanılan antikora bağlıdır. Antikorum afinitesi ne kadar yüksek ise yöntem verimliliği o kadar artar.

İmmünolojik yöntemler arasında işaretlenmiş antikorlarla yapılan immunoassayler en çok kullanılanlarıdır. Bu yöntemler analizde kullanılan antikorum immünolojik özelliklerini kaybetmeden bir molekül ile işaretlenmesi esasına dayanır. Araştırılan antijen işaretlenmiş olan antikor ile spesifik olarak etkileşir ve oluşan ürünlerin uygun bir analitik yöntemle ölçümleri yapılır. Kullanılan işaretleyici moleküle göre yöntem isimlendirilir (floresan boya kullanılıyor ise floresan immünoassay; enzim kullanılıyorsa enzim immunoassay, vb.). Bu yöntemlerden enzim bağlı immünoassay (ELISA) en yaygın kullanılanıdır (McMeekin, 2003; Alberts, 2015; Us, 2016; Abbas ve ark., 2020).

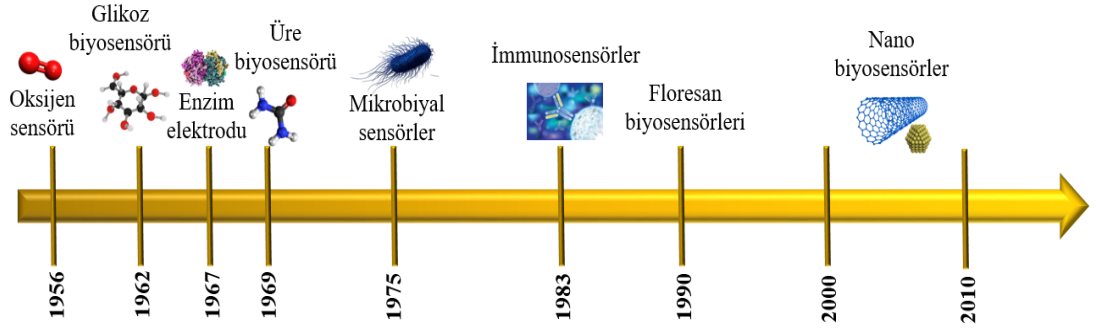
1.2.4. Moleküler Yöntemler

Moleküler yöntemler nükleik asitlerin (DNA ve RNA) temel alındığı tanı yöntemleridir. Mikroorganizmaların genetik bilgilerinin saklı olduğu nükleik asit dizilimleri üzerinden tanı ve miktar tayini yapılabilmektedir. Moleküler yöntemlerden

içerisinde en yaygın kullanılan polimer zincir reaksiyonudur (PCR). PCR'ın çalışma prensibi, hedef genetik materyallerin (DNA veya RNA) bu bölgeye spesifik kısa zincirli oligonukleotid primerler kullanılarak, enzimatik olarak amplifikasyonuna (çoğaltılması) dayanır (Garibyan ve Avashia, 2013).

1.2.5. Biyosensörler

Biyosensörlerin tarihi bundan yaklaşık 70 yıl öncesine dayanmaktadır. Prof. Dr. Leland C. Clark'ın Cincinnati Hastanesi'nde bir ameliyat sırasında hasta kanının oksijen miktarını bir elektrot yardımı ile izlemesi ile başlamıştır. Daha sonra Clark çalışmalarını genişleterek farklı analitleri de tayin etmeyi başarmış ve 1962'de New York Bilimler Akademisinde elektrokimyasal bir sensörün (pH, potansiyometrik ya da kondüktometrik) enzim biyoreseptörlerle birleştirilerek nasıl daha işlevsel olabileceğini tanımlamıştır (Clark, 1956). 1962 yılında glukoz oksidaz enzimini oksijen elektrodu ile birleştirerek kandaki glukozun tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu elektrot ise ilk biyosensör enzim elektrodu olarak tanımlanmıştır (Clark ve Lyons, 1962). Daha sonra ortaya çıkan biyoteknolojik gelişmeler vasıtasıyla biyomoleküler etkileşimlerin daha iyi anlaşılması, nanoteknolojideki son gelişmeler ile sensörlerin gelişimi de hız kazanmıştır (Şekil 1.1).



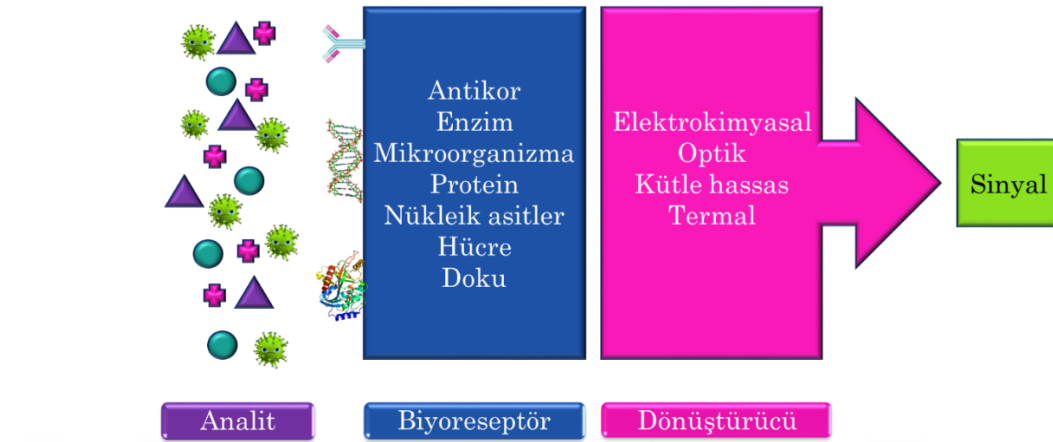
Şekil 1. 1. Biyosensörlerin tarihsel gelişimi

Biyosensörler; International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC)" Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliğince: "Kimyasal bir bileşiğe karşı verilen biyolojik yanıtı optik, termal, elektriksel sinyallere dönüştüren cihazlar" olarak tanımlanmaktadır. Özet olarak, biyolojik bir tepkime içerisindeki hedef analiti tayin etmek için kullanılan algılayıcı sistemlerdir.

Biyosensörler temel olarak iki kısımdan oluşmaktadır:

- Biyoreseptör (ligand)
- Dönüştürücü (transdüser)

Genel olarak bir biyosensör tasarımında analizini yapacağımız maddeyi (analit) spesifik olarak tanıyan bir biyoreseptör bölümü ve analitle biyoreseptör birleştiğinde biyoreseptörde meydana gelen fiziksel ya da kimyasal değişimleri elektrik sinyallerine çeviren bir dönüştürücü bölümü bulunmaktadır (Şekil 1.2) (Turner, 2015).



Şekil 1. 2. Biyosensör tasarımı

Biyoreseptörler, analit ile özgül olarak etkileşime giren duyarlı biyolojik bağlanma bölgeleridir. Antikor, nükleik asitler, protein ve enzim gibi biyolojik moleküller ya da mikroorganizmalar, hücreler, dokular gibi canlı biyolojik sistemler kullanılabilir. Bu moleküllerin en önemli özellikleri analite karşı yüksek bağlanma yeteneği göstermeleridir (Syam ve ark., 2012).

Biyosensörden cevap sinyallerini alabilmek için, biyoreseptör materyalleri dönüştürücüler ile bağlanmalıdır. Bir biyosensör tasarımının en önemli aşaması immobilizasyon aşamasıdır. Bu amaçla adsorpsiyon, hapsedme (entrapment), çapraz bağlama ve kovalent bağlama gibi çeşitli immobilizasyon yöntemleri kullanılır. Adsorpsiyon yönteminde biyoreseptörler, karbon, cam, metal ve metal oksit bir yüzey üzerine hidrofobik, iyonik ve hidrojen bağlarıyla bağlanırlar. Bağlanma her ne kadar kolay olsa da zayıftır ve ısı, pH, iyonik güç, akış oranı ve substratlardaki değişimlere karşı hassas olması nedeniyle kullanım ömrü kısadır. Hapsedme tekniğinde biyoreseptör materyali, dönüştürücü yüzey yakınında polimer matrisi içerisinde tuzığa düşürülür. Birkaç hafta gibi kısa bir kullanım ömrüne sahiplerdir. Çapraz bağlama yönteminde genelde gluteraldehit, siyanürik klorür gibi, biyomoleküller arasında katmanları kararlı hale

getirecek moleküller arası bağları oluşturmak suretiyle dönüştürücüler üzerine bağlanır. Bu teknik yüksek mekanik dayanıklılık sağlamaz. Kovalent bağlama tekniğinin temeli mikroorganizmaların amin, karboksil ya da sülfidril gibi hücre duvarı bileşenleri ve dönüştürücü arasında kararlı bağların oluşturulmasına dayanır. Diğer yöntemler ile kıyaslandığında, aylarca kalıcılığı süren yüzey yapısı sağlamasıyla üstünlük göstermektedir (Lei ve ark., 2006).

Dönüştürücüler biyoreseptör ile analit arasında gerçekleşen bağlanma ile oluşan, gerek biyokimyasal gerekse fizikokimyasal etkileşimleri ölçülebilen elektronik sinyallere çevirirler. Elektrokimyasal, optik, kütle hassas ve termal okuma yapabilirler (Zhang ve ark., 2011).

1.2.5.1. Kağıt Tabanlı Biyosensörler

Kağıt tabanlı biyosensörlerin kullanımı son yıllarda kullanım kolaylığı, biyouyumluluğu, taşınabilir olması, kolay üretilebilir olması, düşük maliyet ve hızlı tanı gibi avantajları nedeniyle popüler hale gelmiştir. Bu teknoloji, hidrofilik kağıda hidrofobik malzemeleri modelleyerek mikroakışkan kanallar oluşturmak için kağıdı substrat olarak kullanır.

İlgili bir analiti içeren biyolojik bir materyali (kan, idrar, ter, tükürük) veya çevre analizleri ile ilgili bir bileşiği (ağır metal iyonları, hidrojen sülfür, vs.) test ederken, ilgili numune, cihaza uygulanır ve harici bir pompa kullanmaya gerek kalmadan kılcal hareket

ile tayin bölgesine ilerler. Örnek içerisinde analitin tayini gerçekleştirirken, renk, elektrokimyasal özellik ve ışık absorpsiyonunda veya emisyonunda değişikliğe sebep olan kimyasal bir reaksiyonla takip edilmesi sağlanır. Bu yöntemler içerisinde sıklıkla kullanılan kolorimetrik değişikliğin ölçümüne dayanan yöntemlerdir. Düşük maliyetli masa üstü tarayıcılar, tek lensli refleksi kameralar veya cep telefonları kullanılarak ölçülebilen bu yöntemde, sonuçlar ligand-analit bağlanmasını (antikor-antijen gibi) esas alır ve renkli bir ürünün oluşturulmasıyla basit bir şekilde tayin edilebilir.

Biyosensör olarak kağıt kullanmanın başlıca avantajları arasında yüksek yüzey/hacim oranı, adsorpsiyon özellikleri, kılcal hareket kabiliyeti, biyolojik örneklerle geçimlilik, protein ve antikorların immobilizasyonu için kimyasal fonksiyonel gruplar, kolay şekilde sterilize edilebilmeleri sayılabilir. Ayrıca kağıt, yakılarak yok edilebilme özelliğine de sahiptir. Bununla birlikte, reaktiflerin kağıt matris içinde saklanması ve taşınması, kullanıcıların kimyasal çözücülerini kullanma ihtiyacını ortadan kaldırır. Bunlara ek olarak, kağıt kolay bulunabilir hafif bir materyaldir. Son olarak, kağıt bazlı mikroakışkan sistemler balmumu (wax) yazıcılar gibi pratik ve ucuz sistemler kullanılarak düşük maliyetlerle üretilmektedirler.

Kağıt tabanlı sistemlerin bir çok avantajına rağmen bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Aynı anda birden fazla analitin duyarlı, doğru ve hassas şekilde tayin edilememesi bunların başında gelmektedir. Ancak güncel yaklaşımlar incelendiğinde bu dezavantajlar da giderilmeye başlanmıştır. Tayinde kullanılan kolorimetrik tekniklere ek olarak, kemilüminesans, elektrokimyasal ve floresans ölçümleri de analitleri görüntülemeye kullanılmaktadır. Bu analitik yaklaşımların maliyet, yöntemin basitliği ve hassasiyeti ile ilgili dezavantajlar yarattığı da düşünülmektedir.

Kağıt tabanlı yatay ve dikey akış sistemleri hedeflenen analitlerin tespiti ve tayini için rutin olarak kullanılmaktadır. Bilindiği üzere bu testlerin en çok kullanılanları gebelik testleridir. İlerleyen zamanla birlikte yatay akış sistemleri kan pıhtılaşmasının taranması, yiyecek ve içeceklerdeki pestisit kalıntılarının ve patojenlerin (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*) tayini gibi uygulamalar için de kullanılan platformlar haline gelmiştir. Yatay akış sistemlerde, akışkan yatay olarak numune tayin bölgesine çekilirken, dikey akışlı sistemlerde akış dikey yönde yönlendirilir (Nery ve Kubota, 2013; Park ve ark., 2013; Costa ve ark., 2014; Hu ve ark., 2014; Li ve ark., 2014; Rivas ve ark., 2018; Singh ve ark., 2018).

Yatay akış sistemlerinde örnek pedi, konjugasyon pedi, nitroselüloz membran ve absorban pedinden oluşan dört temel bileşen bulunmaktadır. Örnek pedi, şeridin numune uygulanan ucunda bulunan ve selüloz veya cam lifleleri gibi materyallerden oluşan bölümdür. Test için şeride uygulanan numunenin diğer bileşenlere ulaşmasını sağlar. Uygulanan numunenin test çizgisinde bağlanmasını sağlamak ve konjugasyon pedindeki reaksiyon süresini uzatmak gibi nedenlerden dolayı örnek pedine tampon tuzları ve surfaktanlar emdirilir. Konjugasyon pedi cam fiber malzemeden üretilmiş, çoğunlukla renkli ya da floresan nanopartiküller ile etiketlenmiş tanıma elemanlarının emdirilip kurutulduğu bileşendir. Örneğin konjugasyon pedine temasıyla birlikte örnek ve bu örneğe spesifik etiketli konjugat birleşerek test çizgisine doğru ilerlemeye başlar. Test çizgisinin bulunduğu bölüm ise nitroselüloz membrandır. Nitroselüloz membran protein ve biyomoleküllere yüksek seçicilik gösterir böylece test çizgisi oluşturulurken antikor ya da aptamer gibi tanıma elemanları membranla kolaylıkla etkileşebilir. Nitroselüloz membranlar çeşitli gözenek genişliklerine sahiptirler. Membranın gözenek boyutu akış hızı, analit ve konjugasyonun optimum reaksiyon süresinde membran boyunca hareketi açısından önemlidir. Şeridin sonuna akışın sürekliliğini sağlamak için bir absorban ped yerleştirilir. Absorban pedin görevi sıvı fazlalığını emerek geri akışı engellemektir (Singh ve ark., 2018).

1.2.5.1.1. Kağıt Tabanlı Sensörlerin Tayin Yöntemleri

Kağıt tabanlı sensörlerde hedef analitin varlığını belirlemek için kolorimetrik ölçümler, kemilüminesans, elektrokemilüminesans, elektrokimyasal ve floresans gibi çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler ELISA gibi geleneksel yöntemlerle kıyaslandığında oldukça hassas ve hızlı sonuçlar verdikleri için yaygın olarak kullanılmaktadır (Singh ve ark., 2018).

1.2.5.1.1.1.Kolorimetrik Yöntemler

Kolorimetrik ölçümler renk oluşumu veya renk değişimini kullanarak analitin varlığını ve derişimini tespit etmek için kullanılan tek objektifli refleks fotoğraf makineleri, cep telefonları, düşük maliyetli masaüstü tarayıcılarla kombine MATLAB gibi yazılımlar ya da spektrofotometre gibi yöntemleri içermektedir. Bu tespit yöntemleri düşük maliyette doğru sonuçlar sağlaması nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Renk oluşumları ya da renk değişimleri enzimler kullanılarak, ELISA temelli immünolojik testlerle veya altın nanopartiküller kullanılarak gerçekleştirilmektedir.

Enzimatik yöntemlerin temeli, bir enzim ve bu enzime özgü bir substrat arasındaki reaksiyonla oluşan enzim-substrat kompleksinin renk değişimi meydana getirmesi esasına dayanır.

ELISA temelli immünolojik testler antijen ve antikor arasındaki etkileşime dayanır. Geleneksel ELISA yöntemi yüksek örnek hacimleri, uzun işlem basamakları ve yıkama aşamalarını içerirken, kağıt tabanlı ELISA yaklaşımları kağıdın absorban özelliğı, oldukça küçük hacimlerde numune gereksinimi ve hızlı bloklama aşamaları gibi üstün avantajlar içerir.

Altın nanopartik ller, genellikle ikincil antikorları etiketleyen tayin bileşenleri olarak immünolojik testlerde tercih edilmektedir. Bu nanopartiküllerin ilgili analit ( rneğın antijen) ile spesifik etkileşimlere dayanarak biraraya gelmesi (agrega olması) sonucunda renk oluşumları meydana gelmektedir. Renk oluşumunu görüntülemek için kullanılan yazılım, piksel değerlerinin analit derişimleri ile ilişkisini ölçmek için kullanılmaktadır (Li ve ark., 2014; Ferreira ve ark., 2015; Tsai ve ark., 2017).

1.2.5.1.1.2. Kemilüminesans

Kemilüminesans, basit olarak kimyasal bir reaksiyon sonucu oluşan uyarılmış haldeki bir türün ışın emisyonu yapmasına dayanmaktadır. Uyarılmış tür bazı durumlarda analit ve reaktif arasındaki bir reaksiyonun ürünü olabilir. Bazı durumlarda ise, analit kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz, reaksiyonu inhibe eder veya katalizlenmesini sağlar. Kemilüminesans  l  m tekniğı, en basit ölçüm tekniklerinden biri olarak tasvir edilmektedir. Bunun sebebi de karmaşık bir cihaz bilgisi gerektirmemesinden kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, çok tekrar edilebilir ve hassas tayin yöntemleri arasında yerini almaktadır. Ancak, yüksek derişimdeki enzim gerektiğinden kağıdın

gözenekli yapısını engellemekle birlikte ölçüm hassasiyetinde azalmaya yol açabilir (Skoog ve ark., 1998; Singh ve ark., 2018).

1.2.5.1.1.3. Elektrokimyasal Yöntemler

Elektrokimyasal sensörler bir çalışma elektrodu, bir referans elektrot ve bir karşıt elektrot olmak üzere üç elektrot içerir. Çalışma elektrodu ve karşıt elektrot çalışma elektrodundaki numuneye akım sağlamak için elektrolit çözeltisiyle bağlantı kurduğunda numune tespit edilir. Bu elektrotlar karbon mürekkep ve Ag/AgCl mürekkep kullanılarak kolaylıkla kromatografi kağıdı üzerine basılabilirler. Son yıllarda yapılan çalışmalar elektrot üretiminde alternatif olarak grafit kalemelerin de kullanılabileceğini göstermektedir (Skoog ve ark., 1998; Singh ve ark., 2018).

1.2.5.1.1.4. Floresans

Floresans temelli teknikler, örnek molekülün etkileşimleri sonucunda oluşan, floroforlardan lüminesansın tayinini içermektedir. Lüminesansı ölçmek için florometre cihazı kullanılmaktadır. Floresan boyalar biyolojik olarak uyumludur, ancak foto-ağartma (photobleaching) işlemine maruz kalabilecekleri için düzenli olarak izlenmeleri gerekir ki bu da floresan yoğunluğunun kaybına neden olur (Singh ve ark., 2018).

1.2.5.1.1.5. Elektrokemilüminesans

Kemilüminesansın aksine, elektrokimyasal reaksiyonlar sonucunda lüminesansın üretildiği tekniktir. Örneğin indirgenmesi ile birlikte, lüminesans üretebilen bir çalışma elektrodunda (genellikle perde baskılı kabon elektrot) trietilamin veya hidrojen peroksit vasıtasıyla yükseltgenme olur. Bu reaksiyon sonucunda renk değişikliğine sebep olan fotonlar üretilir. Her bir rengin piksel yoğunluğunu incelemek, analit konsantrasyonları ile ilgisini göstermek için de bazı görüntü değerlendirme yazılımları kullanılabilir (NIH Image J gibi) (Skoog ve ark., 1998; Singh ve ark., 2018).

Patojen bakterilerin hızlı bir şekilde gerçek örnek matriklerinde tespit edilmesi ve diyognastik amaçlı tanımlanması son zamanlardaki en önemli araştırma konulardan biridir. Bakterilerin sahada kısa sürede tayini hala zor bir konudur. Özellikle hastalık kaynağı olan bakterilerin analizleri için şimdiye kadar birçok yöntem geliştirilmiş, fakat bir hastalık söz konusu olduğu zaman bu yöntemler ile düşük tayin limitlerine kısa sürede ulaşamadığı için bakterilerin uygun besi ortamlarında çoğaltılması gerekmektedir. Ayrıca bazı yanlış negatif testlerle bu bakterilerin belirlenmesinde hataların oluşması mümkündür. Halk sağlığı açısından hedef bakteri tayini için alternatif tekniklerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır. Tez kapsamında bakteri tayini için SERS ölçümüne dayanan kağıt tabanlı yatay akış immunoassay sensör geliştirilmiştir. Bu kapsamda inşa edilen sensör hedef bakteri olan *E. coli* için düşük tayin sınırı ve yeterli seçiciliğe sahip olarak kullanılmış, analitik validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Hidrojen tetrakloro aurat (HAuCl_4), etanol, boraks ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$), borik asit (H_3BO_3), tri-sodyum sitrat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7$), 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB), (2S)-2-amino-4-{[(1R)-1-[(karboksimetil) karbamoil] -2sülfaniletil] karbamoil} bütanoik asit (glutasyon), sodyum klorür (NaCl), potasyum klorür (KCl), sukroz, kazein, Tween 20, disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sığır serum albümin (BSA), avidin, sentetik ürün Sigma-Aldrich (Darmstadt, Almanya)'ten temin edilmiştir. Bütün çözeltiler, Millipore saflaştırma sistemi ile organik bileşiklerden arınmış deiyonize su ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}$) ile hazırlanmıştır.

Nitroselüloz membran, örnek pedi, konjugasyon pedi, absorban pedi (Millipore Hi-Flow) Merck (Darmstadt, Almanya), mikropipetler (1-10,10-100,100-1000 μL) Axygen (Massachusetts, ABD) deneyler esnasında kullanılmıştır.

2.1.2. Çalışmada Kullanılan Mikroorganizma, Antikor ve Besiyerleri

E.coli ATCC 35218, Fare *E.coli* monoklonal antikor, tavşan poliklonal *E.coli* antikor (biyotinli), tavuk anti-fare IgG (H + L) ikincil antikor Fitzgerald (Massachusetts, USA), tyryptic soy agar (TSA) Merck (Darmstadt, Almanya), *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *Salmonella Enteritidis* Refik Saydam Ulusal Tıp Kültür Koleksiyonu (Ankara, Türkiye) tarafından temin edilmiştir.

2.1.3. Çalışmada Kullanılan Cihazlar

Çalışmalarda DeltaNu Examiner Raman Mikroskop sistemi (Deltanu Inc., Laramie, WY, ABD) (785 nm lazer ve CCD detektör) kullanılmıştır. Enstrüman parametreleri ölçüm sırasında, 300 mW lazer gücü, 60 s örnekleme süresi, 2 µm lazer spot çapı ve 20X objektif olarak ayarlanmıştır. Karakterizasyon çalışmaları Geçirimli Elektron Mikroskobu (TEM) ölçümleri Tecnai G2 F30 HRTEM sistemi (Japonya) ve Taramalı Elektron Mikroskobu (SEM) (JSM-6400) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Santrifüj Eppendorf (Dubai Media City, BAE), McFarland Dansitometre DEN-1 Biosan (Riga, Letonya), Simplicity 185 deiyonize su cihazı Millipore (ABD), ultrasonik banyo Bandelin Sonorex (Heinrichstraße, Berlin), hassas terazi Shimadzu (Kyoto, Japonya), SX-610 Pen Type pH metre Senova (Yavne, İsrail) cihazları kullanılmıştır.

2.2. Yöntem

2.2.1. Tampon Çözeltilerin Hazırlanması

10 mM fosfat tamponlu tuz (PBS) çözeltisi için, 8 g NaCl, 0,2 g KCl, 1,44 g Na_2HPO_4 , 0,24 g KH_2PO_4 tartılıp üzerine 800 mL distile su ilave edilerek karıştırılmıştır. Tamamen çözündükten sonra pH'si NaOH ile 7,4'e ayarlanmıştır. Daha sonra toplam hacim 1 L'ye tamamlanarak otoklavda 121°C ve yüksek basınç altında 15 dakika steril edilmiştir. Hazırlanan tampon çözelti bakterilerin seri dilüyonlarının hazırlanması için ve antikorların seyreltimi için kullanılmıştır.

100 mM borat tamponu için, 1,9068 g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ve 0,3092 g H_3BO_3 tartılarak 50'şer mL'lik distile suda çözünmüş ve çeşitli oranlarda karıştırılarak istenilen pH ve konsantrasyonda tamponlar elde edilmiştir. Elde edilen çözeltiler agregasyon testi için ve konjugasyon çözeltisinin hazırlanmasında kullanılmıştır.

2.2.2. Besiyerlerinin Hazırlanması

Çalışmalarda genel bir besiyeri olan TSA kullanılmıştır. Dehidre hazır besiyeri 40 g/L olacak şekilde tartılmış ve distile su içinde ısıtılarak çözünmüştür. Hazırlanan besiyeri otoklavda 121 °C'de 15 dakika sterilize edilmiştir. Sıcaklığı 45 °C'ye düştükten sonra

steril Petri kutularına dökölüp donana kadar bekletilmiştir. Sterilite kontrolü için bir gün etüvde bekletilen besiyerleri bakterilerin üretilmesinde kullanılmıştır.

2.2.3. Bakteri Dilüsyonlarının Hazırlanması

E. coli bakterilerinin seri dilüsyonlarının hazırlanması için öncelikle bakterilerin TSA besiyerine ekimleri yapılmış ve bir gece boyunca 37 °C’de inkübasyona bırakılmıştır. İnkübasyon sonunda besiyeri üzerinde oluşan kolonilerden bir miktar steril bir tüp içerisindeki PBS tamponuna öze yardımıyla alınmış ve vortekslenmiştir. Elde edilen süspansiyonun bulanıklığı dansitometre cihazı yardımıyla 0,5 McFarland standart birimine ayarlanmış böylece $\sim 1 \times 10^8$ kob/mL bakteri yoğunluğuna ulaşılmıştır. Daha sonra 1×10^8 ’den 1×10^1 kob/mL’ye seri bakteri dilüsyonları hazırlanmıştır.

2.2.4. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi

Raman spektroskopisi, molekül üzerine gönderilen şiddetli bir ışık demetinin molekülle etkileşmesi sonucu meydana gelen saçılmanın dedektör ile takibine dayanan bir tekniktir. Işık saçılması esnasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur, Rayleigh saçılması adını alan bu olay bir elastik saçılma olayıdır. Elastik saçılma olayından başka saçılan ışığın çok az bir miktarı Raman saçılması adını alan elastik olmayan saçılma olayını gerçekleştirir. Raman saçılması spektroskopik olarak incelenebilmektedir. Saçılan ışığın enerjisinde molekül ile etkileşen

ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık ışıkla etkileşmiş molekülün titreşim düzeyleri arasında bilgi vermektedir. Moleküllerin titreşim düzeyleri arasındaki enerji farkından yola çıkarak molekül hakkında inceleme yapmaya izin veren bu spektroskopik yöntem Raman spektroskopisi olarak adlandırılır.

Raman spektrumundan kompleks bir sistemdeki kimyasal bileşenlere ait karakteristik bilgi “parmak izi” elde edilebilmektedir. Sisteme gönderilen yaklaşık bir milyon fotondan sadece bir tanesi Raman saçılmasına uğramaktadır ve bu durum düşük derişimlerdeki molekül tayini için yeterli değildir. Bu sorunu çözebilmek için yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) kullanımı gibi birçok girişimde bulunulmuştur. SERS düşük derişimlerdeki maddelerin tayinine imkan sağladığı için klasik Raman’a göre çok daha hassas bir tekniktir. Temel olarak SERS, Raman sinyallerinin SERS substratları ile güçlendirilmiş şeklidir ve analizi yapılacak maddenin genellikle nano düzeydeki altın veya gümüş, bakır yüzeylerde ya da kolloidlerde metal yüzeylere tutunduğu veya etkileşime girdiği bir Raman spektroskopisi türüdür. Uygun koşullarda SERS yönteminin, klasik Raman spektroskopisine göre 10¹⁴ defa spektral zenginleştirme verdiği bildirilmektedir. SERS substratları için kullanılan yüzeyler, altın, gümüş gibi iletken metallerin nano boyuttaki parçacıklarından oluşmaktadır (Skoog ve ark., 1998; Movasaghi ve ark., 2007; Morris, 2008; Stiles ve ark., 2008).

2.2.5. Sitrathlı Altın (Au) Nanopartikül Sentezi

Altın nanopartiküller (AuNP) Turkevich metoduna (Turkevich ve ark., 1951) göre sentezlenmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 50 mL HAuCl₄

solüsyonu sürekli karıştırılarak, 250 mL lik balonda geri soğutucu altında kaynayana kadar ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra 5 mL 40 mM sodyum sitrat çözeltisi eklenmiş ve renk kırmızıya döndükten sonra 10 dk daha kaynatılmıştır. Daha sonra çözeltiler oda sıcaklığına soğutulmuş ve 4°C’de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sitratlı ortamda sentezlenen AuNP lerin karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla boyutları UV spektrofotometre ile ölçülmüş, Malvern Zetasizer cihazı ile agregasyonları değerlendirilmiştir. Ayrıca sentezlenen AuNP’lerin TEM görüntüleri alınmıştır.

2.2.6. Sentezlenen Sitratlı AuNP’lerin Boyut Optimizasyonu

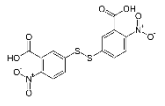
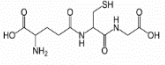
Farklı boyutlarda sentezlenen altın nanopartiküllerden yatay akış immunoassay için en uygun olanı belirleyebilmek için tek *E.coli* konsantrasyonunda farklı boyuttaki parçacıklar aynı koşullar altında incelenmiştir. Bu amaçla öncelikle tüm nanopartiküllerden 1’er mL alınarak ependorflara aktarılmış ve üzerlerine 1 mM DTNB çözeltisi eklenerek karıştırıcıda 160 rpm hızda 1 gece inkübe edilmiştir. Ertesi gün 13000 rpm’de santrifüj edilerek bağlanmayan DTNB uzaklaştırılmıştır. Çözeltiler cam viyallere alınarak üzerlerine 100’er µL 15 µg/mL monoklonal *E.coli* antikoru ilave edilerek 300 rpm’de karıştırıcıda 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerlerine spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 1 mg/mL BSA çözeltisinden 100’er µL ilave edilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. 20 dk sonra tekrar ependorflara alınarak 14000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelekler üzerine 2 mM borat tamponu (pH 7,4, %10 sukroz içeren) eklenerek konjugasyon için kullanılmıştır. Elde edilen bu konjugasyon çözeltisi konjugasyon pedlerine emdirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Daha sonra yatay akış test şeritleri ‘Yatay Akış İmmunoassay Şeritlerinin Hazırlanışı’ bölümünde açıklandığı şekilde oluşturulmuştur. Her bir test şeridi için 10^3 kob/mL *E.coli* konsantrasyonu kullanılarak bakteri örnekleri 100’er µL olacak

şekilde sisteme verilmiştir. Şeritler tamamen kuruduktan sonra SERS ile ölçümler alınmıştır (300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi).

2.2.7. Farklı Raman Etiketlerinin Sitrathlı AuNP Konjugasyonunda Optimizasyonu

Sentezlenen AuNP'ler iki farklı Raman etiketiyle modifiye edilmiştir ve en iyi sonuç veren etiket kullanılmıştır. Kullanılan Raman etiketleri AuNP çözeltisinde agregasyona neden olmamaları ve en iyi sinyali vermeleri açısından kıyaslanmışlardır. Çizelge 2.1.'de karşılaştırılan Raman etiketlerinin özellikleri ve hazırlandıkları konsantrasyonlara ilişkin bilgiler verilmiştir.

Çizelge 2. 1.Karşılaştırılan Raman etiketlerinin özellikleri ve hazırlanan konsantrasyonlar.

Kullanılan Raman etiketi	Molekül şekli	Çözücü	Hazırlanan konsantrasyonlar (mM)
5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB))		Etanol	1, 10, 20, 50
(2S)-2-amino-4-[[[(1R)-1-[(karboksimetil)karbamoyl]-2sülfaniletıl] karbamoyl} bütanoik asit (glutatyon)		Su	1, 10, 20, 50

DTNB için; 1,5 mL AuNP çözeltisi üzerine 15 µL farklı konsantrasyonlarında hazırlanan DTNB çözeltisi eklenmiş ve 4°C'de 4 saat boyunca (200 rpm) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 15 µg/mL 100 µL monoklonal antikor çözeltisi eklenmiş ve bir gece boyunca 200 rpm'de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra 13300 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilerek süzüntü uzaklaştırılmış ve çökeleklerin üzerine 1,5 mL %10'luk BSA çözeltisi eklenmiştir. 200 rpm'de 4°C'de 2 saat karıştırıldıktan sonra tekrar 13300

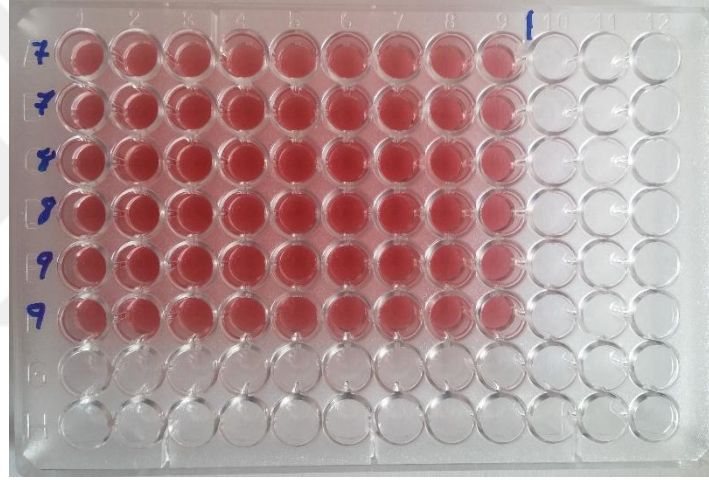
rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelekler üzerine 300'er µL %10 sukroz içeren 2 mM borat tamponu (pH:7,4) eklenmiş ve konjugasyon çözeltisi olarak kullanımına kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

Glutasyon için; 1,5 mL AuNP çözeltisi üzerine 15 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glutasyon çözeltisi eklenmiş ve 4°C'de 4 saat boyunca (200 rpm) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 15 µg/mL 100 µL monoklonal antikor çözeltisi eklenmiş ve bir gece boyunca 200 rpm'de inkübe edilmiştir. Süre sonunda 13300 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 1,5 mL %10'luk BSA çözeltisi eklenmiş ve 200 rpm'de 4°C'de 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 13300 rpm'de 4°C'de 20 dk santrifüj edilerek süzüntü uzaklaştırılmış ve çökelekler üzerine 300'er µL %10 sukroz içeren 2 mM borat tamponu (pH 7,4) eklenmiş ve konjugasyon çözeltisi olarak kullanımına kadar 4°C'de muhafaza edilmiştir.

2.2.8. Kullanılacak Antikor Miktarının Optimizasyonu

Yatay akış immunoassay deneyi için kullanılacak en uygun antikor miktarının belirlenebilmesi için AuNP agregasyon testi yapılmıştır. Bu amaçla, 5'er mL'lik altın nanopartikül çözeltileri üç değişik pH değerine 10 mM borat tamponu (pH: 7) ve 100 mM borat tamponları (pH: 8 ve 9) eklenerek pH ları 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Antikor çözeltisi (75'er µL) 20 µg/mL, 17,5 µg/mL, 15 µg/mL, 12,5 µg/mL, 10 µg/mL, 8 µg/mL, 6 µg/mL, 4 µg/mL, 0 µg/mL olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda suda hazırlanmıştır. Bir 96'lık kuyucuklu plaka içerisine değişik pH larda hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden 150'şer µL eklenmiş (iki tekrarlı) ve üzerlerine her bir kolon, bir konsantrasyonlardaki

antikor çözeltisinden içerecek şekilde 10'ar μL antikor çözeltisi eklenmiştir (Şekil 2.1). Kuyucuklu plakalar, çalkalayıcıya koyulup 300 rpm'de 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğa (0 $\mu\text{g/mL}$ antikor kolonu hariç) 20 μL %10'luk NaCl çözeltisi eklenmiş ve 5 dk daha çalkalayıcıda yüksek hızda çalkalanmıştır. Daha sonra 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçülmüş ve 520 nm ve 580 nm'deki değerler alınmıştır. 580 nm'deki absorpsiyon değeri 520 nm'deki değerden çıkarılmış ve elde edilen en yüksek fark, en verimli konjugasyon olarak değerlendirilmiştir.



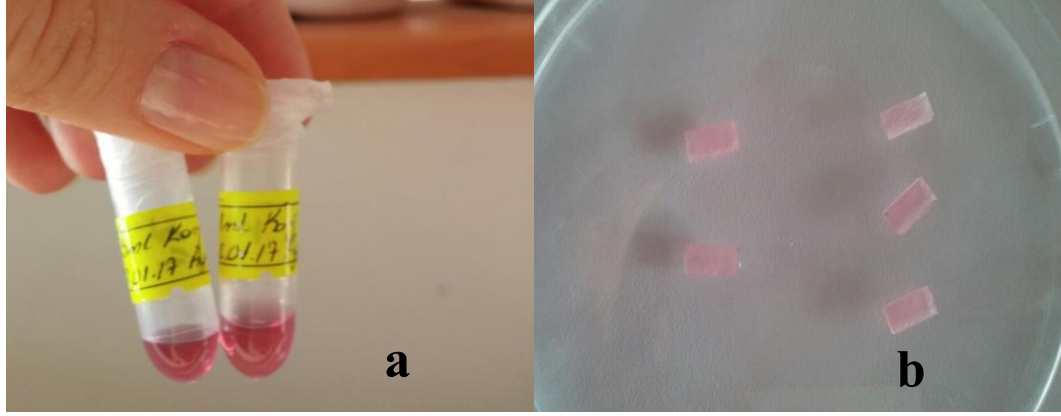
Şekil 2. 1. Kuyucuklu plaka içerisine farklı pH'lerde hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden ve antikor çözeltisi eklendikten sonra görünüşleri.

Sentezlenen AuNP lar Raman etiketiyle modifiye edilmiştir. Raman etiketi olarak DTNB kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mL AuNP çözeltisi üzerine 10 μL 1mM DTNB çözeltisi eklenmiş ve 1 gece boyunca karıştırıcıda (300 rpm) bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 13000 rpm'de 10 dk santrifüj edilmiş, üstte kalan süpernatant atılarak çökelek üzerine 1 mL ultradistile su ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti cam bir viyale aktarılıp üzerine agregasyon testinde belirlenmiş olan konsantrasyonda (15 $\mu\text{g/mL}$) 100 μL antikor çözeltisi (suda hazırlanan) sürekli karıştırılarak eklenmiş ve 20 dk boyunca 300 rpm'de inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 100 μL 1mg/mL BSA çözeltisi sürekli

karıştırılarak çözeltiye eklenmiş ve 300 rpm’de 20 dk karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 14000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak çökelek üzerine 200 µL 2 mM borat tamponu (pH: 7,4, %10 sukroz içeren) eklenmiştir. Elde edilen çözelti konjugasyon pedine emdirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

2.2.9. Raman Etiketli AuNP Konjugasyonu

Sentezlenen AuNP lar Raman etiketiyle modifiye edilmiştir. Raman etiketi olarak DTNB kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mL AuNP çözeltisi üzerine 10 µL 1mM DTNB çözeltisi eklenmiş ve 1 gece boyunca karıştırıcıda (300 rpm) bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 13000 rpm’de 10 dk santrifüj edilmiş, üstte kalan süpernatant atılarak çökelek üzerine 1 mL ultra distile su ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti cam bir viyale aktarılıp üzerine agregasyon testinde belirlenmiş olan konsantrasyonda (15 µg/mL) 100 µL antikor çözeltisi (suda hazırlanan) sürekli karıştırılarak eklenmiş ve 20 dk boyunca 300 rpm’de inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 100 µL 1mg/mL BSA çözeltisi sürekli karıştırılarak çözeltiye eklenmiş ve 300 rpm’de 20 dk karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 14000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak çökelek üzerine 200 µL 2 mM borat tamponu (pH: 7,4, %10 sukroz içeren) eklenmiştir. Elde edilen çözelti (Şekil 2.2 a) konjugasyon pedine emdirilerek (Şekil 2.2.b) oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 2. 2. AuNP'lerin DTNB ile modifiye edildikten sonraki çözeltileri (a), çözeltilerin konjugasyon pedine emdirildikten sonraki görünüşleri (b).

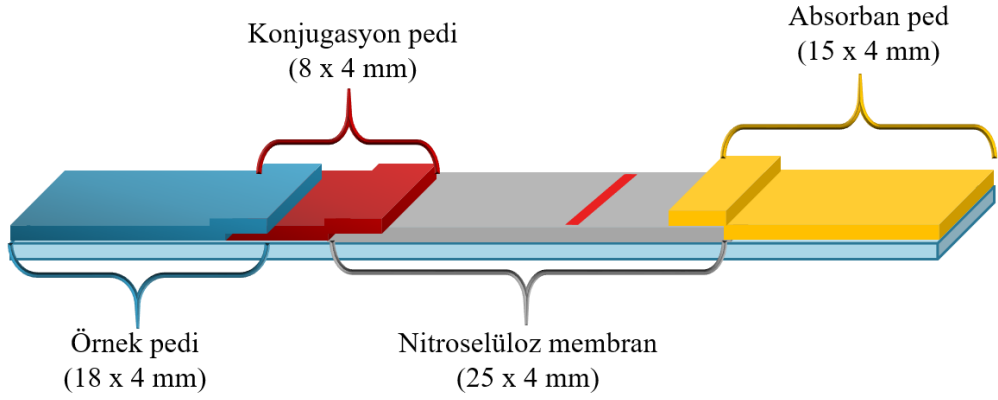
2.2.10. Yatay Akış İmmunoassay Platformu için Test Membranının Belirlenmesi

Yatay akış immunoassay şeritlerinde kullanılacak en uygun test membranını (nitroselüloz membran) belirlemek için farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla; 5, 8, 10 ve 15 μm gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Daha sonra yatay akış test şeritleri 'Yatay Akış İmmunoassay Şeritlerinin Hazırlanışı' bölümünde açıklandığı şekilde oluşturulmuştur. Her bir test şeridi için aynı bakteri konsantrasyonu (10^3 kob/mL *E. coli*) kullanılarak bakteri örnekleri 100'er μL olacak şekilde sisteme verilmiştir. Şeritler tamamen kuruduktan sonra SERS ile ölçümler alınmıştır (300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi).

2.2.11. Yatay Akışlı İmmunoassay Şeritlerinin Hazırlanması

Tipik bir yatay akışlı immunoassay yapısı incelendiğinde birbirinden farklı malzemelerden oluşan ve farklı amaçları olan bölgeler görülecektir. Numunenin damlatıldığı fiber glass yapıdaki örnek pedi, hedef bakteriyi yakalamak için modifiye nanopartiküllerin emdirildiği fiber glass yapısındaki konjugasyon pedi, kapiler akışın gerçekleştiği ve antikor çizgilerinin oluşturularak sonucun gözlemlendiği nitroselüloz membran, şeridin son kısmı artan örneğin ve çözeltilerin emildiği absorpsiyon pedi bahsedilen bölgelerdir. Yatay akışlı bir sistemde uygulanan örnek, örnek pedi aracılığıyla partikül konjuge edilmiş konjugasyon pedine gelmektedir. Konjugasyon pedinde $21,56 \pm 4,52$ nm boyutunda sentezlenmiş olan altın nanoküre partiküller bulunmaktadır. Numune (bakteri çözeltisi) kurutulmuş konjugatı harekete geçirir ve bakteri ile etkileşime geçen bu partiküller şeridin bir sonraki test bölgesine gelirler. Test bölgesi üzerinde antikor immobilize edilmiş test çizgisi bulunmaktadır. Test çizgisinde bulunan antikorlar ilgili analiti yakalarlar. Sonuçlar etiket içeren modifiye altın küreler ile SERS sinyali takibi ile yorumlanmıştır.

Şeritler hazırlanırken bu membranlar Şekil 2.3'te gösterildiği ölçülerde kesilmiş ve ön işlemlerden geçirilmişlerdir.



Şekil 2. 3. Hazırlanan membranların ölçüleri

Bu amaçla örnek pedi % 5 BSA ve % 0,05 Tween 20 içeren PBS çözeltisiyle muamele edilerek 60 °C’de kurumaya bırakılmış, konjugasyon pedi DTNB ve antikorlarla modifiye edilmiş AuNP çözeltisine daldırılarak 5 sn bekletilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Test membranı ise, üzerinde test çizgisinin oluşturulması için 100 µg/mL biyotinli antikor çözeltisi ile 1000 µg/mL avidin çözeltisi eşit oranda karıştırılarak hazırlanmış ve elde edilen çözeltiler membran üzerine çizilmiştir. Çizgilerin oluşturulması için laboratuvarında şırınga pompaları kullanılarak mikrodispenser inşa edilmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2. 4. Şırınga pompaları kullanılarak hazırlanan mikrodispenser.

Pompalardan biri şırıngasız olarak sadece dikey ekseninde hareket sağlarken diğer pompa istenen antikor çözeltisinin bir şırınga yardımıyla nitroselüloz membran üzerine çizilmesi için kullanılmıştır. Şırıngasız pompa düzeneği üzerine nitroselüloz membranın sabitlenmesi için bir platform yapılmış ve dikey yönde şeritlerin çizilmesi için hareket özelliği kullanılmıştır. İkinci pompa bir şırınga içermektedir ve yüzeye immobilize edilecek antikor çözeltileri bu şırınga yardımıyla akıtılmaktadır. Şırınga bağlı pompanın akış hızı ve akış hacmi optimize edilmiştir. Optimisasyon sonucu birinci pompa hız: 5 $\mu\text{L}/\text{dk}$ ve çap : 2 mm, ikinci pompa: hız 975 mL/dk ve çap : 100 mm olarak belirlenmiştir. Böylelikle dikey test ve kontrol şeritleri nitroselüloz membranlar üzerine 12 mm uzaklıkta test çizgileri çizilmiştir. Tüm membranlar kuruduktan sonra Şekil 2.5'te gösterildiği şekilde bir araya getirilerek cam bir lam üzerine yapıştırılmış ve örnek vermek için hazır hale getirilmiştir.



Şekil 2. 5. Hazırlanan yatay akışlı immunoassay platformlarından görüntüler: A) Konjugasyon pedi içermeyen yatay akışlı immunoassay şeridi, B) Konjugasyon pedi içeren yatay akışlı immunoassay şeridi

2.2.12. Seçicilik Çalışmaları

Yöntemin seçiciliğini göstermek için *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus subtilis* ve *Micrococcus luteus* bakterileri kullanılmıştır. Bu bakterilerin üretilmesi için genel bir besiyeri olan TSA kullanılmıştır. Hedef bakteri olan *E.coli* ile aynı derişimde (10^4 kob/mL) *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus subtilis* ve *Micrococcus luteus* bakterilerinin dilüsyonları ‘2.2.3 bakteri dilüsyonlarının hazırlanması’ bölümünde anlatıldığı şekilde hazırlanarak yatay akış platformlarına 100’er μ L olarak uygulanmıştır. Ayrıca *E.coli* bakterileri parçalanarak aynı koşullarda sisteme verilmiştir. Yatay akış şeritleri tamamen kuruduktan sonra test çizgileri Raman spektrometresi ile 300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi kullanılarak ölçülmüştür.

2.2.13. Yatay Akış İmmunoassay Platformunun Yapay İdrar Örneklerinde Uygulanması

Geliştirilen yatay akış immunoassay platformlarının gerçek örnek uygulaması için yapay idrar örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla 900 µL idrar üzerine 100 µL *E.coli* stoklarından farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Kör çözeltisi için ise yine 900 µL idrar üzerine 100 µL PBS tamponu eklenmiştir. Hazırlanan örneklerden sisteme 100'er µL verilmiş ve şeritler tamamen kuruduktan sonra test çizgileri Raman spektrometresi ile 300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi kullanılarak ölçülmüştür. Her bir ölçüm farklı noktalardan 5 tekrarlı olarak alınmıştır.

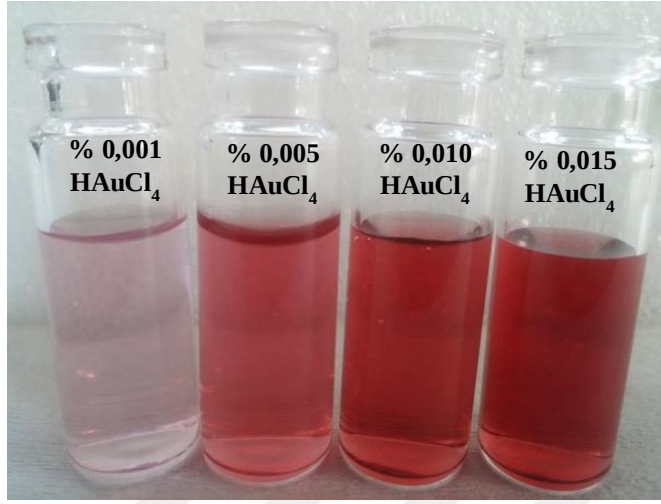
3. BULGULAR

3.1. Farklı Boyutlarda Sitrathlı Altın Nanopartikül Sentezi Optimizasyon Çalışmaları

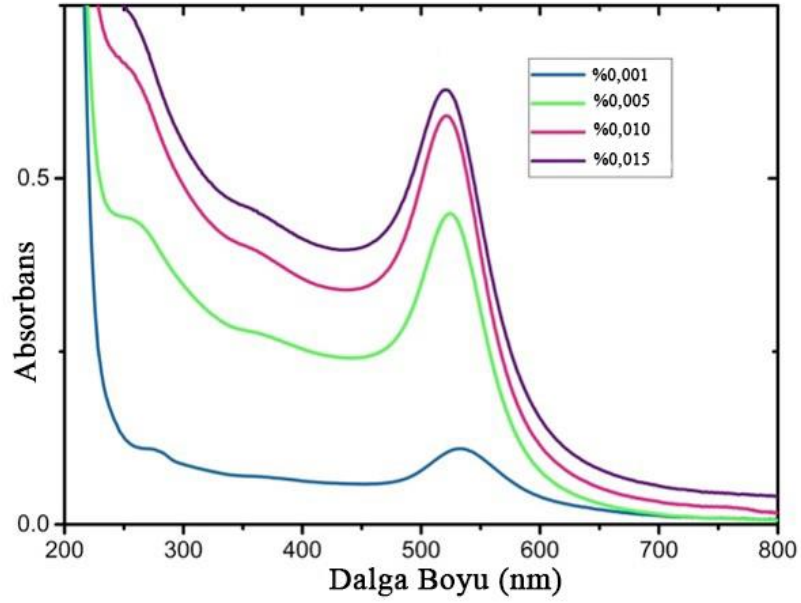
Au nanopartiküller (AuNP) Turkevich metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla öncelikle farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 50 mL HAuCl_4 solüsyonu sürekli karıştırılarak, 250 mL lik balonda geri soğutucu altında kaynayana kadar ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra 5 mL 40 mM sodyum sitrat çözeltisi eklenmiş ve renk kırmızıya döndükten sonra 10 dk. daha kaynatılmıştır. Daha sonra çözeltiler sürekli karıştırılarak oda sıcaklığına soğutulmuş ve karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sitrathlı ortamda sentezlenen AuNP'ler için kullanılan HAuCl_4 konsantrasyonları Çizelge 3.1'de verilmiştir. Elde edilen partiküllerin görüntüleri Şekil 3.1'de, UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumları Şekil 3.2'de görülmektedir.

Çizelge 3. 1. Sentezlenen AuNP'ler için kullanılan HAuCl_4 konsantrasyonları.

HAuCl_4 (%)	Sodyum sitrat (mM)
0,001	40
0,005	40
0,010	40
0,015	40



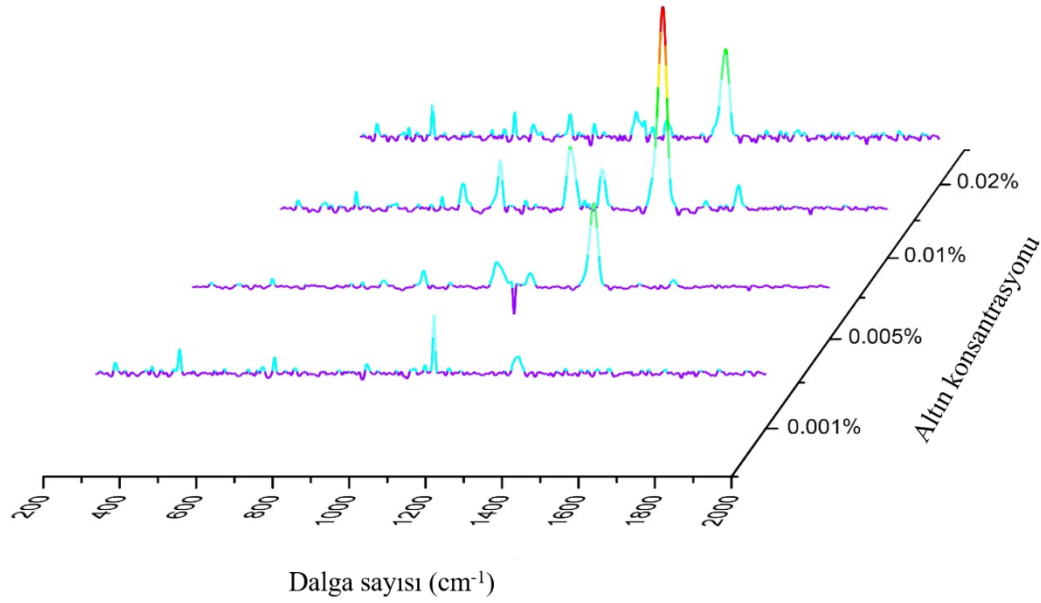
Şekil 3. 1. Sitratlı ortamda farklı boyutlarda sentezlenen AuNP'ler.



Şekil 3. 2. Sentezlenen altın nanopartiküllerin absorbanans spektrumları.

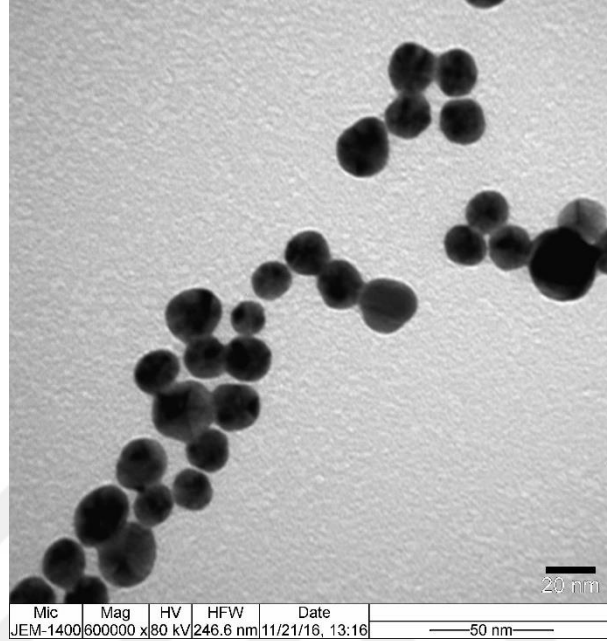
Farklı boyutlarda sentezlenen AuNP'lerden yatay akış immunoassay için en uygun olanı belirleyebilmek için tek *E.coli* konsantrasyonunda farklı boyuttaki parçacıklar aynı koşullar altında incelenmiştir. Her bir test şeridi için 10^3 *E.coli* konsantrasyonu

kullanılarak bakteri örnekleri (100'er μL) sisteme verilmiştir. Şeritler tamamen kuruduktan sonra SERS ölçümleri alınmış (300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi) ve elde edilen spektrumlar Şekil 3.3'te gösterilmiştir. %0,001 HAuCl_4 kullanılarak sentezlenen altın nanopartikül ile elde edilen SERS sinyal şiddeti diğer partikül boyutlarından alınan sinyallere göre daha yüksek bulunmuştur.



Şekil 3. 3. Farklı konsantrasyonlarda HAuCl_4 kullanılarak sentezlenen altın nanopartiküller ile *E.coli* (10^3 kob/mL) için gerçekleştirilen yatay akış immunoassay testinden elde edilen Raman spektrumları.

Elde edilen Raman sonuçlarına göre en duyarlı sonuç veren partikülün %0,01 HAuCl_4 kullanılarak sentezlenen parçacık olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu parçacığın -35,3 mV zeta potansiyeline sahip olduğu ve kolay topaklanma olmadığı, konjugasyon pedine emdirildikten sonra da rengini koruduğu ve yatay akış şeritlerinde akışının kolay sağlandığı gözlemlenmiştir. Seçilen partiküllerin TEM ölçümleri sonucunda boyutları $21,56 \pm 4,52$ nm olarak tespit edilmiş ve elde edilen görünüm Şekil 3.4'te gösterilmiştir.

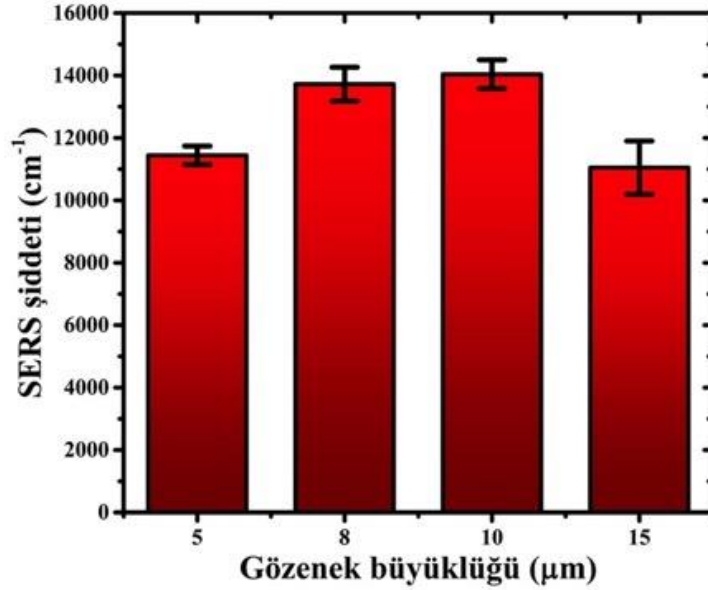


Şekil 3. 4. Optimizyon çalışmaları sonucunda seçilen % 0,01 HAuCl₄ kullanılarak sentezlenen AuNP'lerin TEM görünimleri.

3.2. Farklı Gözenek Büyüklüğünde Nitroselüloz Membran Kullanımının Etkileri

Yatay akış immunoassay şeritlerinde kullanılacak en uygun test membranını (nitroselüloz membran) belirlemek için farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla; 5, 8, 10 ve 15 µm gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Daha sonra yatay akış test şeritleri oluşturulmuştur. Her bir test şeridi için 10^3 *E.coli* konsantrasyonu kullanılarak bakteri örnekleri (100'er µL) sisteme verilmiştir. Şeritler tamamen kuruduktan sonra

SERS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen veriler ışığında en uygun membranın 10 μm gözenek büyüklüğüne sahip olan membran olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 3.5).

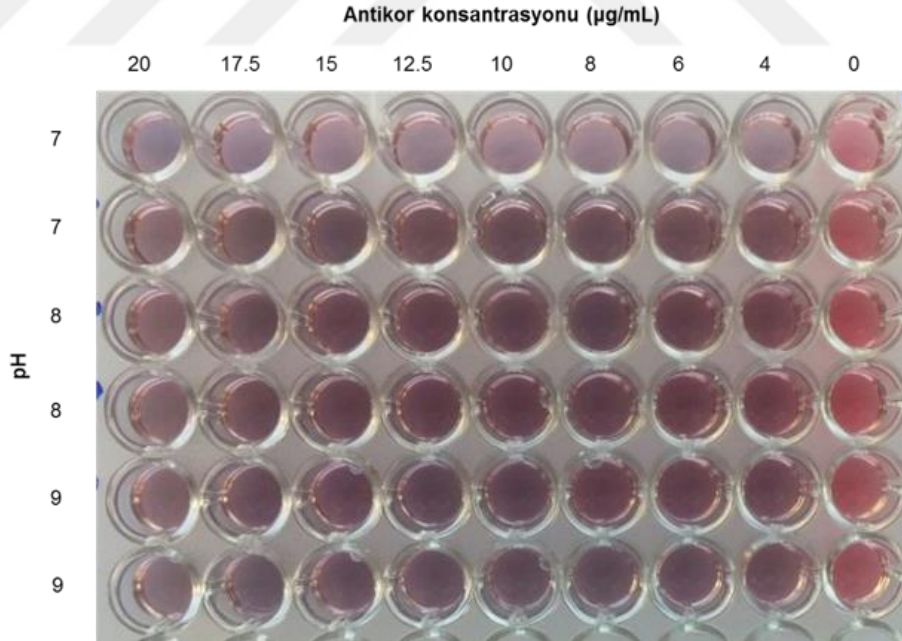


Şekil 3. 5. Nitroselüloz membran optimizasyonu deneylerinden elde edilen SERS şiddetleri.

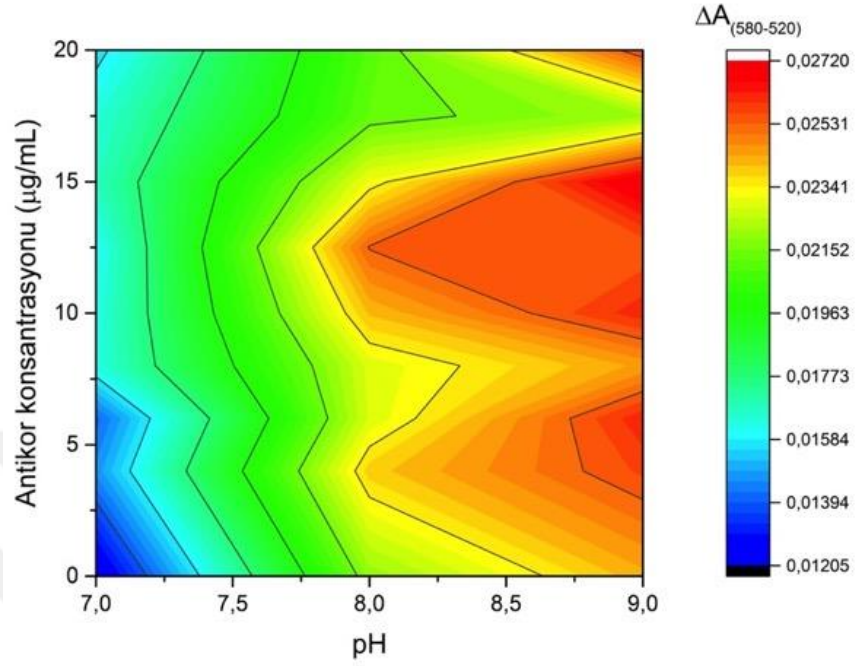
3.2. Kullanılacak Antikor Miktarının Optimizasyonu

Konjugasyon pedinde kullanılacak altın nanopartikül üzerindeki en uygun antikor miktarını saptamak için agregasyon testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.6). Bu amaçla, 5'er mL'lik altın nanopartikül çözeltileri üç değişik pH değerine 10 mM borat tamponu (pH: 7) ve 100 mM borat tamponları (pH: 8 ve 9) eklenerek pH'leri 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Antikor çözeltisi (75'er μL) 20 $\mu\text{g/mL}$, 17,5 $\mu\text{g/mL}$, 15 $\mu\text{g/mL}$, 12,5 $\mu\text{g/mL}$, 10 $\mu\text{g/mL}$, 8 $\mu\text{g/mL}$, 6 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$, 0 $\mu\text{g/mL}$ olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda suda

hazırlanmıştır. Bir 96'lık kuyucuklu plaka içerisine değişik pH'lerde hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden 150'şer μL eklenmiş (iki tekrarlı) ve üzerlerine her bir kolon, bir konsantrasyonlardaki antikor çözeltisinden içerecek şekilde 10'ar μL antikor çözeltisi eklenmiştir. Kuyucuklu plakalar, çalkalayıcıya koyulup 300 rpm'de 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğa (0 $\mu\text{g/mL}$ antikor kolonu hariç) 20 μL %10'luk NaCl çözeltisi eklenmiş ve 5 dk daha çalkalayıcıda yüksek hızda çalkalanmıştır. Daha sonra 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçülmüş ve 520 nm ve 580 nm'deki değerler alınmıştır. 580 nm'deki absorpsiyon değeri 520 nm'deki değerden çıkarılmış ve elde edilen en yüksek fark, en verimli konjugasyon olarak değerlendirilmiştir. Yürütülen deney sonucunda en uygun pH 9, antikor konsantrasyonu ise 15 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.7). Tüm deney boyunca elde edilen bu pH'deki AuNP ve belirlenen konsantrasyondaki antikor konjugasyon için kullanılmıştır.



Şekil 3. 6. Antikor agregasyon testi görüntüleri.



Şekil 3. 7. Agregasyon testi sonuçları.

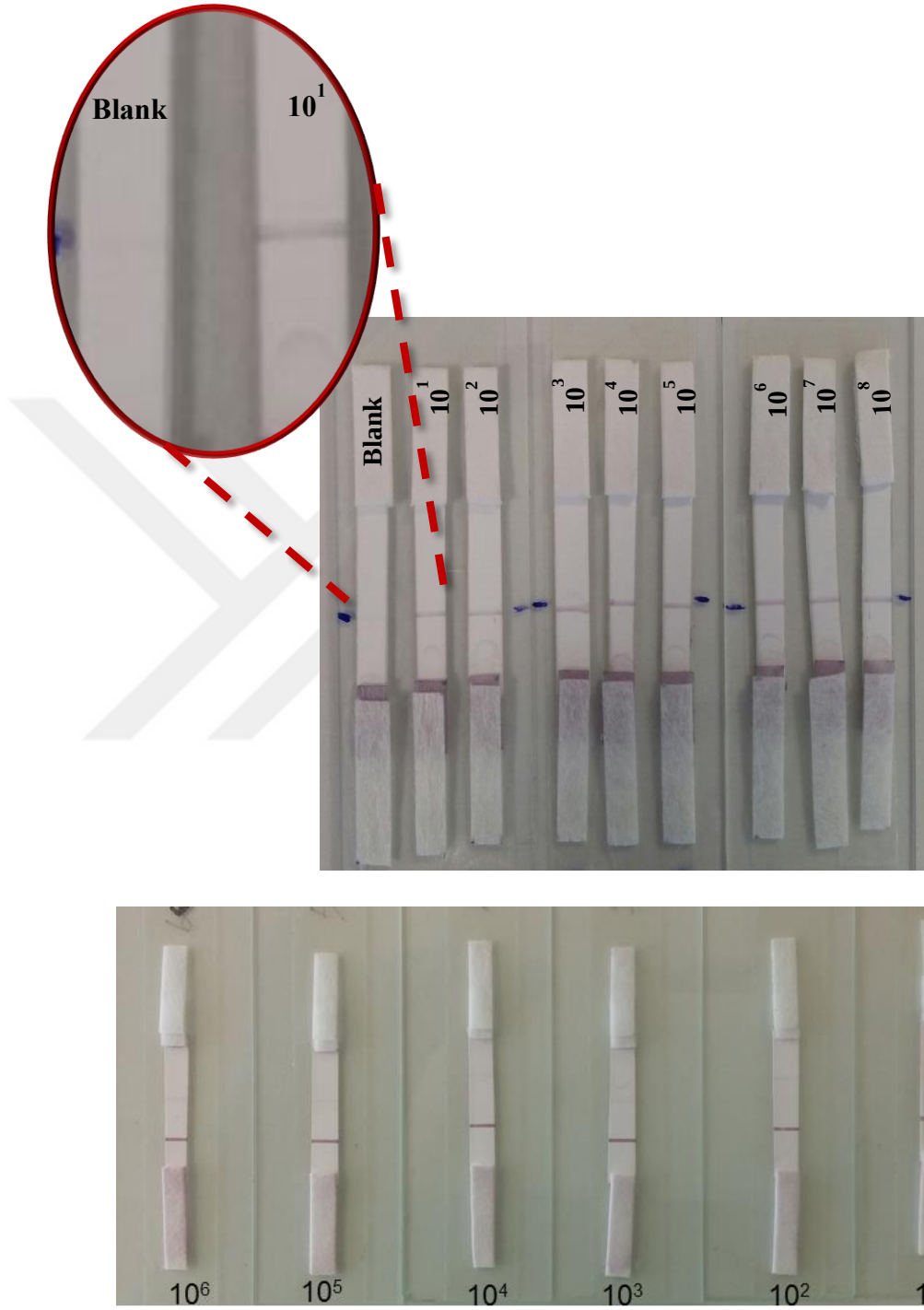
3.3. Farklı Raman Etiketleri ile Altın Nanopartikül Modifikasyonu

Hazırlanan konjugasyon çözeltileri konjugasyon pedlerine 5 sn emdirilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Yatay akış immunoassay platformları hazırlanıp *E.coli* örnekleri sisteme verilmiş ve SERS ile test çizgileri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda 20 ve 50 mM DTNB içeren çözeltilerde agregasyon gözlemlenmiş, 1 ve 10 mM DTNB içeren çözeltilerde ise agregasyon gözlemlenmemiştir. Glutasyon kullanılan çözeltilerin ise hiçbirinde agregasyon gözlemlenmemiştir. Ancak glutasyon ile hazırlanan konjugasyonların kullanıldığı örneklerde tüm konsantrasyonlardaki SERS sinyalleri çok düşük çıkmıştır. Bunun nedeni glutasyonun Raman sinyallerinin DTNB'ye kıyasla düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle etiket olarak DTNB kullanımına karar verilmiştir. 1 mM DTNB içeren konjugasyon çözeltisi kullanılan örneklerde sinyallerin

yeterince yüksek olması ve daha az madde sarfıyatı için 1 mM DTNB konsantrasyonu tercih edilmiştir.

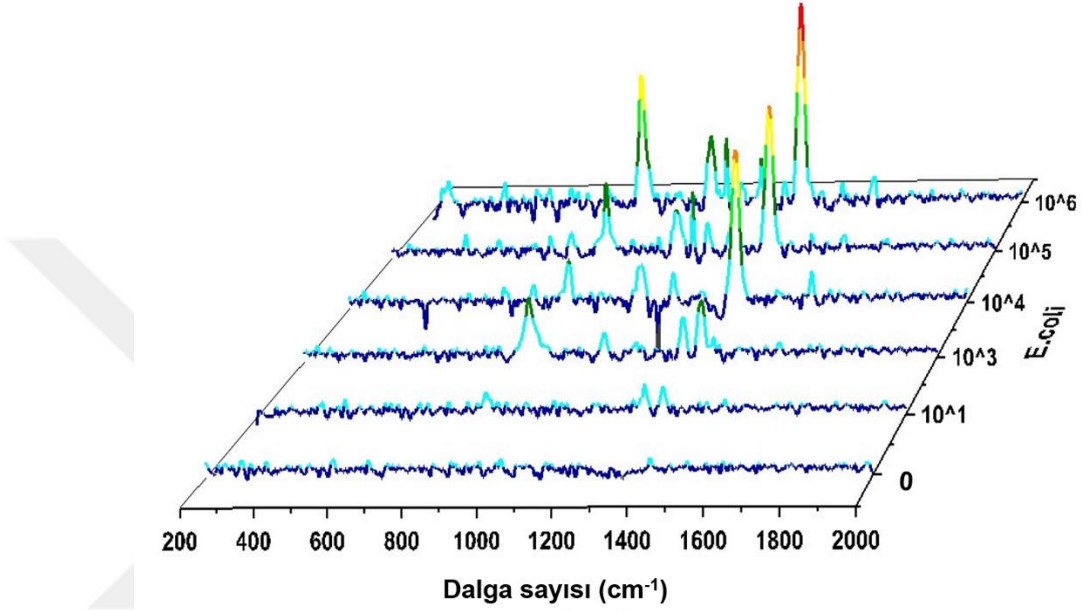
3.4. Yatay Akış İmmunoassay Platformlarında *E.coli* Tayini

Optimize edilen koşullarda *E.coli* tayini için kalibrasyon doğrusu elde etme çalışmaları devam etmiştir. Örnek damlatılan membranların tamamen kuruması beklenerek elde edilen test çizgileri (Şekil 3.8) SERS ile ölçülmüştür. Her bir ölçüm test çizgisi üzerinde 5 farklı bölgelerden 5 tekrarlı olmak üzere alınmıştır. Ölçüm için 300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi kullanılmış ve SERS spektrumları alınmıştır.



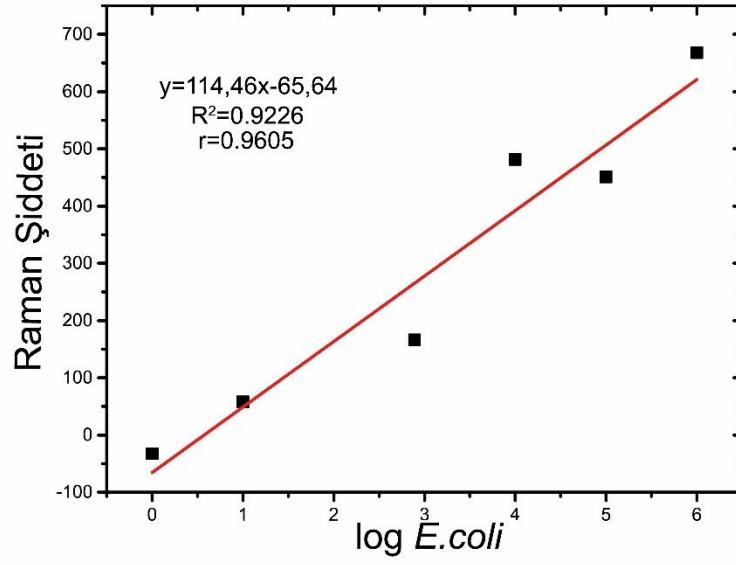
Şekil 3. 8. Yatay akış immunoassay şeritlerine *E. coli* örnekleri verildikten sonra görünüşleri.

Optimize edilen koşullarda *E.coli* örneklerinin hazırlanan yatay akış immunoassay platformlarına uygulandıktan sonra test çizgisi üzerinden alınan SERS spektrumları Şekil 3.9'da gösterilmiştir.



Şekil 3. 9. Artan bakteri derişimine karşı DTNB'den gelen (1338cm^{-1} 'de, N-O bağı arasındaki simetrik gerilme titreşimine ait) sinyaller.

Ölçümlerden elde edilen spektrumlar üzerinden kalibrasyon grafiğı çizilmiş (Şekil 3.10) ve bu değerlerden yararlanılarak elde edilen kalibrasyon sonuçları Çizelge 3.2'de özetlenmiştir.



Şekil 3. 10. Alınan SERS spektrumlarından yararlanılarak elde edilen kalibrasyon grafiği.

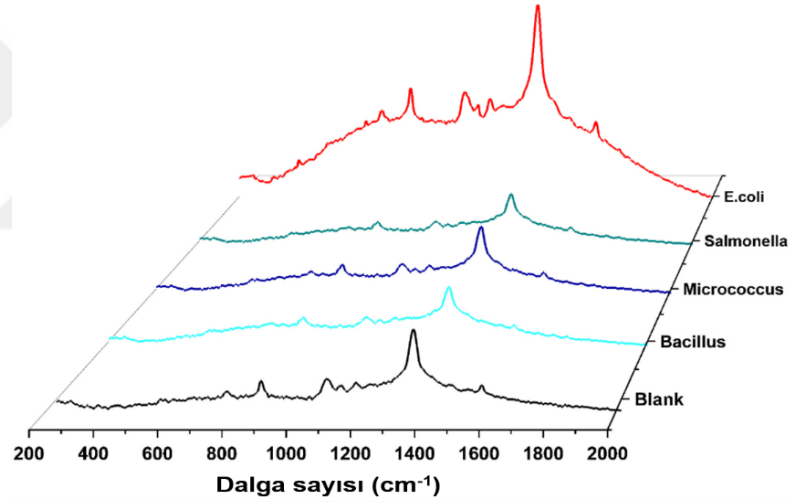
.Çizelge 3. 2. Elde edilen kalibrasyon sonuçları.

Parametreler	
Doğrusallık ve Aralık (kob/mL)	$2,7 \times 10^1 - 1,0 \times 10^6$
Eğim	114,47
Kesişim	-65,642
Korelasyon katsayısı	0,9605
Teşhis sınırı (LOD) (kob/mL)	10
Tayin alt sınırı (LOQ) (kob/mL)	27
Eğimin standart hatası	16,57
Kesişimin standart hatası	6,32
Gün içi tekrar edilebilirlik (% BSS*)	9,21
Günler arası tekrar edilebilirlik (% BSS*)	16,41

*(n=5)

3.5. Seçicilik Çalışmaları

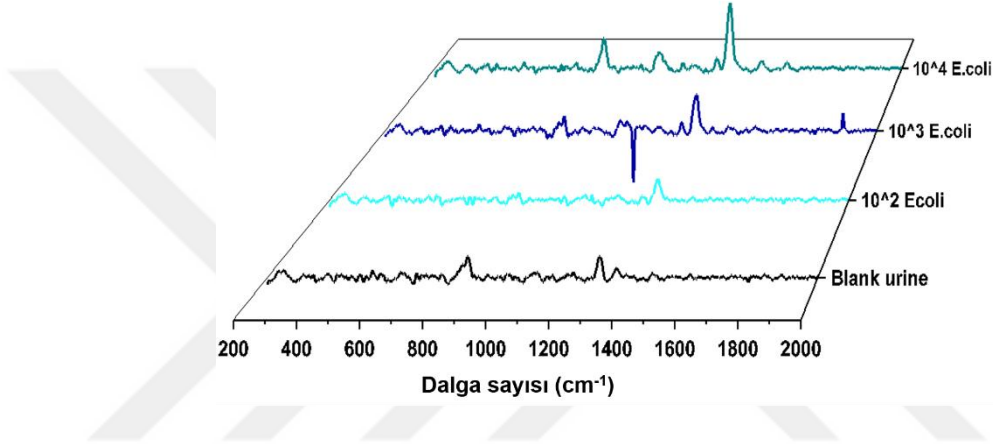
Aynı derişimde hazırlanan *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus*, *E.coli* bakterilerinin yatay akış platformuna uygulandıktan sonra test çizgilerinden elde edilen SERS spektrumları (Şekil 3.11) değerlendirildiğinde diğer bakterilerin sinyallerinin *E.coli*'den elde edilenlere göre oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Parçalanmış bakterilerden ise sinyal alınmamıştır.



Şekil 3. 11. Yatay akış immunoassay şeritlerine aynı konsantrasyonda (10^4 kob/mL) farklı bakteri örnekleri verildikten sonra alınan SERS spektrumları.

3.6. Yapay İdrar Örneklerine Uygulama

Optimize edilen koşullarda yapay idrar örneklerinin (3 farklı derişimde *E. coli* spike edilmiştir) hazırlanan yatay akış immunoassay platformlarına uygulandıktan sonra alınan SERS spektrumları Şekil 3.12’de gösterilmiştir.



Şekil 3. 12. Test çizgisi üzerinde artan bakteri derişimine karşı SERS sinyal artışını gösteren spektrumlar.

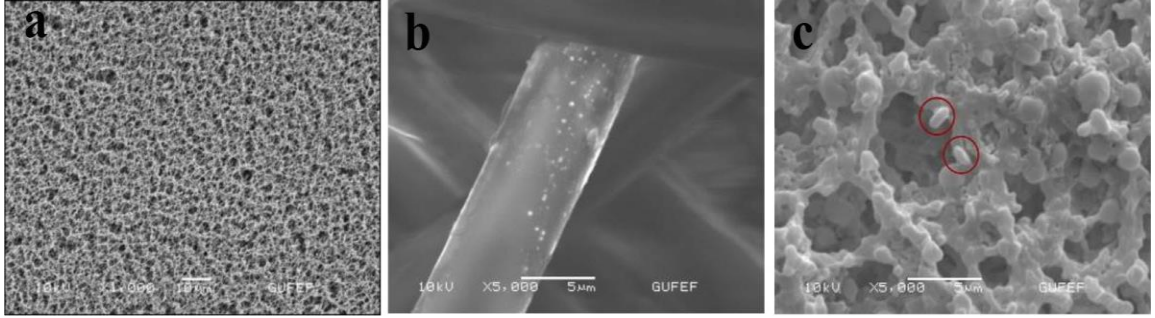
Elde edilen SERS verileri ışığında geri kazanım çalışmalarına ait veriler Çizelge 3.3’te özetlenmiştir.

Çizelge 3. 3. İdrar örneklerinden elde edilen geri kazanım sonuçları

Eklenen <i>E.coli</i> miktarı (log kob/mL)	Bulunan miktar (log kob/mL)	% Geri kazanım*	% BSS*
2	2,13	106,58	3,8
3	3,16	105,22	7,6
4	3,84	95,95	10

*n=5

Elde edilen kırmızı çizgilerde bakteri varlığını kanıtlamak amacıyla boş yüzeyler ve antikor çizilmiş test bölgesiyle karşılaştırılmalı SEM görüntüleri alınmıştır (Şekil 3.13).



Şekil 3. 13. (a) Konjugasyon pedine emdirilmiş altın nanokürelerin SEM görüntüsü, (b) İşlem görmemiş nitroselüloz membran SEM görüntüsü, (c) Antikor immobilize edilmiş nitroselüz membran test bölgesinde *E.coli* ve nanokürelerin etkileşiminin SEM görüntüsü.

Elde edilen görüntülerle de gösterildiği gibi geliştirilen yatay akış immunoassay şeridinin *E.coli* bakterisi için çalıştığı kanıtlanmıştır.

4. TARTIŞMA

Tez çalışması kapsamında, yatay akış immunoassay tekniği ile Raman spektroskopisinin birleştirilmesi ile bakteri tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Raman saçılması, örneğe zarar vermeyen bir yöntemdir ve birçok numuneye uygulanabilmektedir. Substrat olarak altın, gümüş ve bakır kullanılan SERS ile moleküllerin çok düşük miktarları tayin edilebilmektedir. Hedef biyomolekülün SERS spektrumlarından elde edilen parmak izi, az seviyede numune hazırlanma aşamasıyla molekül ve organizmaların tanımlamasını mümkün kılmaktadır. SERS'in önemi, klasik Raman spektroskopisinin tersine, yüzey seçiciliği ve yüksek hassasiyetten kaynaklanmaktadır (Moskovits ve Jeong, 2004; Talley ve ark., 2005; Anderson ve Moskovits, 2006; Aroca, 2006; Olk ve ark., 2007; Fabris ve ark., 2008).

Literatür çalışmaları incelendiğinde *Escherichia coli* O157:H7, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* ve *Enterococcus faecalis* gibi gıda patojenlerinin hassas ve seçici tayininde SERS yönteminin başarıyla kullanıldığı görülmektedir (Fan ve ark., 2011). SERS ölçümleri için yüzey hazırlama yöntemleri günümüzde hızla yaygınlaşmaktadır ve metal yüzeylere bağlanan moleküllerin titreşimsel spektroskopilerinin üretilmesinde kullanılan yaygın ve etkin bir yöntem haline gelmiştir (Kang ve ark., 2002). SERS spektrumları kullanılarak bakteri ve bakteri sporlarına özgü karakteristik parmak izi bant desenlerinin saptanabileceği ve bu sayede hedef organizmaların tanımlanabileceği farklı çalışmalarda rapor edilmektedir (Sengupta ve ark., 2005). Parmak izi bant desenleri kullanılarak tür bazında bakterilerin tanımlanmasında kullanılabilirliğini gösteren çalışmalar mevcuttur (Kahraman ve ark., 2007). Bakteri tayinine yönelik yürütülen bu çalışmalar genelde karakterizasyon çalışmaları olup gerçek bir numune ortamında analiz gerçekleştirilmemiştir. Gerçek bir

numunede farklı türde ve sayıda bakteriler olabileceği gibi ortamdan gelebilecek sinyaller Raman spektrumlarını oldukça karmaşık hale getirmekte ve analizle ilgili yorum yapmak güçleşmektedir (Cam ve ark., 2010).

Yatay akışlı immunoassay tekniği kullanıcı eğitimi ve ekipman gerektirmeyen basit ve ucuz bir analitik yöntemdir. Ayrıca çok az miktarda örnek ile çalışılma imkanı veren, çözücü kullanılmayan, yıkama işlemlerine gerek duyulmayan, gıda, çevre ve vücut sıvılarında bulunan örneklerin tayininin hızlıca gerçekleştirildiği ve kâğıt tabanlı olduğu için immunoassay kinetiğinin çok hızlı olduğu bir tayin yöntemi olarak ticari bir potansiyele sahiptir. Fakat yatay akışlı immunoassay ve kâğıt tabanlı diğer spot testlerde en büyük sorun sonuçların düşük hassasiyet ve düşük doğrulukta (yanlış negatif veya yanlış pozitif sonuçlar) elde edilmesidir. Bu kapsamda bir analitik tekniğin basit ve ucuz olması en ideal durumdur ve bu özelliklerden dolayı yatay akışlı immunoassay tekniği en yaygın kullanım alanı hamilelik ön testi uygulamasında olduğu gibi laboratuvar dışı, yerinde analiz amaçlı kullanılabilen (point-of-care) ekonomik potansiyeli yüksek popüler bir teknoloji olmuştur (Wong ve Tse, 2009). Bu yatay akış immunoassay platformları nitel (Zhang ve ark., 2009), yarı nicel (Tippkötter ve ark., 2009), nicel (Ngom ve ark., 2011), tek analit ve çoklu analit şeklinde olabilir. Çoklu analit testleri, platformların aynı etiket molekül (reporter molecule) ya da nanopartikül ile eş zamanlı çalışmasını sağlayacak şekilde emiş filmini (wicking membrane) tipik olarak farklı test alanlarına böler. Yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi nanoetiketleri de nitroselüloz membranda yapılan “yarı-sandviç” nitel immunoassayde analitleri belirlemek için kullanılmıştır (Bishnoi ve ark., 2011). Bu teknolojilerin potansiyeline rağmen, klinik açıdan önemli analitlerin (biyobelirteç ve toksin) nicel ölçümünün yatay akış immunoassay şeklinde yapılmasına ait literatürde çok az örnek bulunmaktadır (Noble ve ark., 2012; Yang ve ark., 2014). Bu kapsamda bakteri tayinine yönelik SERS tabanlı yatay akış immunoassay ile herhangi bir literatüre rastlanmamıştır.

Tez kapsamında yürütölmüş olan çalışmada *E. coli* tayini için SERS tabanlı yatay akış immünoassay yöntemi geliştirilmiştir. Çalışmanın ilk basamağını optimizasyon çalışmaları oluşturmaktadır. Bu bağlamda çalışmada kullanılacak olan altın nanopartikölün boyutları, konjugasyon için en uygun Raman etiketi, konjugasyon için en uygun antikör miktarı, test membranının (nitroselölöz membranın) gözenek boyutu belirlenmiştir.

Bu amaçla öncelikle konjugasyon çözeltisinde hedef bakteriyi yakalayacak olan antikörün etiketlenmesi için kullanılacak nanopartiköller Turkevich metoduna göre farklı konsantrasyonlarda HAuCl_4 kullanılarak çeşitli boyutlarda sentezlenmiştir. En uygun boyutta olanı belirleyebilmek için tek *E.coli* konsantrasyonunda farklı boyuttaki nanopartiköller aynı koşullar altında incelenmiştir. Hazırlanan yatay akış şeritlerine örnekler uygulanmış ve kuruduktan sonra SERS ölçümleri (300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi) alınmıştır. Elde edilen sonuçlara göre hidrodinamik çapı $21,56 \pm 4,52$ nm olan altın nanopartiköl ile elde edilen SERS sinyal şiddeti diğer partiköl boyutlarından alınan sinyallere göre daha yüksek bulunmuştur. Aynı zamanda bu parçacığın -35,3 mV zeta potansiyeline sahip olduğu ve kolay topaklanma olmadığı, konjugasyon pedine emdirildikten sonra da rengini koruduğu ve yatay akış şeritlerinde akışının kolay sağlandığı gözlemlenmiştir.

Konjugasyon pedinde kullanılacak altın nanopartiköl üzerindeki en uygun antikör miktarını saptamak için ise agregasyon testi gerçekleştirilmiştir. Altın nanopartiköl çözeltileri farklı pH değerine ayarlanarak kuyucuklu plaka içerisine alınmış ve üzerlerine çeşitli konsantrasyonlarda antikör çözeltileri ve %10'luk NaCl çözeltisi eklenerek çalkalanmıştır. Süre sonunda 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçölmüş

ve 520 nm ve 580 nm deki değerler alınmıştır. 580 nm'deki absorpsiyon değeri 520 nm'deki değerden çıkarılmış ve elde edilen en yüksek fark, en verimli konjugasyon olarak değerlendirilmiştir. Yürütülen deney sonucunda en uygun pH 9, antikor konsantrasyonu ise 15 g/mL olarak bulunmuştur.

Yatay akış immunoassay şeritlerinde kullanılacak en uygun test membranını (nitroselüloz membran) belirlemek için farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla; 5, 8, 10 ve 15 m gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Elde edilen SERS verileri değerlendirildiğinde en uygun membranın 10 m gözenek büyüklüğüne sahip membran olduğu belirlenmiştir.

Optimize edilen koşullarda *E.coli* tayini için kalibrasyon doğrusu elde etme çalışmaları yrtlmş ve bu amaçla örnek damlatılan membranların tamamen kuruması beklenerek elde edilen test çizgileri SERS ile ölçülmüştür. Her bir ölçüm test çizgisi üzerinde 5 farklı bölgelerden 5 tekrarlı olmak üzere, 300 mW lazer gücü, 20x objektif, 60 s. uygulama süresi ile alınmıştır. Ölçümlerden elde edilen spektrumlar üzerinden kalibrasyon grafiği çizilmiş ve bu değerlerden yararlanılarak elde edilen kalibrasyon sonuçları değerlendirilmiştir.

Kalibrasyon doğrusundan elde edilen sonuçlara göre farklı konsantrasyonlarda hazırlanan *E.coli* (kob/mL) miktarlarına karşı Raman şiddeti arasındaki korelasyon katsayıları kullanarak doğrusallık değerlendirilmiştir. 0.9226 olarak elde edilen bu değer geliştirilen yöntemin doğrusallık açısından kabul edilebilir olduğunu ifade etmektedir.

Çalışma aralıkları belirlenirken Raman şiddetinin bakteri konsantrasyonuna karşı doğrusal olarak arttığı sınırlar belirlenmiştir. Analiz için çalışma aralığı 10^6 kob/mL'den sonra doğrusallıktan sapma göstermiştir. Bu sapma dikkate alındığında çalışma aralığı $2,7 \times 10^1 - 1 \times 10^6$ kob/mL olarak belirlenmiştir.

Gün içi ve günler arası tekraredilebilirlik çalışmaları 1×10^2 kob/mL üzerinden gerçekleştirilmiş ve % bağıl standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Beş tekrarlı gerçekleştirilen çalışmalarda gün içi ve günler arası değerler sırasıyla % 9,21 ve % 16,41 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen bu değerler FDA ve ICH'nin biyoanalitik yöntem validasyonu kılavuzuna göre geliştirilen yöntemin kesinliği açısından kabul edilebilir olduğunu göstermektedir.

Seçicilik çalışmalarında *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* bakterilerinin yönteme etkilemesi incelenmiştir. Elde edilen SERS spektrumları değerlendirildiğinde diğer bakterilerin sinyallerinin *E.coli*'den elde edilenlere göre oldukça düşük olduğu gözlemlenmiştir. Bu sonuçta geliştirilen yöntemin *E.coli* için seçici olduğunu göstermektedir.

Geliştirilen yöntem yapay idrar örneklerine (3 farklı derişimde *E. coli* standart ekleme yöntemi kullanılarak) uygulanmış ve geri kazanım çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Elde edilen geri kazanım sonuçları değerlendirildiğinde % 106,58, % 105,22 ve %95,95 olarak bulunan geri kazanım değerleri yöntemin doğruluğunu ifade etmektedir.

Tez kapsamında geliştirilmiş olan yöntem literatürde yapılmış çalışmalarla duyarlılık açısından kıyasandığında oldukça düşük LOD değerlerine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca bazı yöntemlerde düşük LOD değerlerine ulaşılabilmesine rağmen nanopartiküllerin agregasyonundan kaynaklı seçicilik sorunları ile karşılaşıldığı görülmüştür (Çizelge 4.1).

Çizelge 4. 1. Literatürde yapılmış benzer çalışmalar

Tayin Yöntemi	LOD (kob/mL)	LOQ (kob/mL)	Doğruluk (%)	Uygulama	Kaynak
Kolorimetrik	-	$1,14 \times 10^3$	-	Süt	(Chen ve ark., 2015)
Kolorimetrik	-	$2,8 \times 10^2$	-	-	(Cui ve ark., 2015)
Kolorimetrik	1×10^5	-	-	Dana eti	(Wang ve ark., 2016)
Kolorimetrik	1×10^6	-	-	Ekmek	(Song ve ark., 2016)
Florimetrik	1×10^5	-	-	Süt Jöle	
Kolorimetrik (Cep telefonu)	1×10^2	-	-	Dana eti Elma suyu	(Jin ve ark., 2017)
Kolorimetrik	$7,8 \times 10^5$ 3×10^6	-	-	Nehir suyu Süt	(Mohammad ve ark., 2018)
Kolorimetrik	$1,58 \times 10^4$	-	70,1 - 89,6	Süt	(Wang ve ark., 2018)
Kolorimetrik	-	1×10^2	88,8 - 110,3	Süt	(Tao ve ark., 2018)
Florimetrik	$1,78 \times 10^2$ $1,33 \times 10^2$	-	92,86 - 95,02 95,11 - 97,98	Dana eti Nehir suyu	(Hassan ve ark., 2019)
SERS	-	5×10^4	94,19 - 107,59	Gıda örnekleri	(Liu ve ark., 2019)
SERS	1×10^1	$2,7 \times 10^1$	95,95 - 106,58	İdrar	Tez çalışması

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Tez çalışması kapsamında, yatay akış immunoassay tekniği ile Raman spektroskopisinin birleştirilmesi ile bakteri tayini için yeni bir yöntem geliştirilmiştir. Bu bağlamda sitrat varlığında altın nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentez parametreleri optimize edilmiş olan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları yürütülmüş ve yatay akış immunoassay inşasında performansları test edilmiştir. Elde edilen SERS spektrum sonuçlarına göre en duyarlı sonuç veren partiküllerin %0.01 H_{AuCl}₄ kullanılarak sitrat varlığında sentezlenen 21,56±4,52 nm boyutundaki parçacık olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu parçacığın -35,3 mV zeta potansiyeline sahip olduğu ve kolay agrege olmadığı, konjugasyon pedine emdirildikten sonra da rengini koruduğu ve yatay akış şeritlerinde akışının kolay sağlandığı gözlemlenmiştir.

Altın nanopartikül, antikor miktarı ve nitroselüloz membran optimizasyonları tamamlandıktan sonra elde edilen verilere göre yatay akış test şeritlerine çeşitli konsantrasyonlarda *E.coli* uygulanmıştır. Şeritler tamamen kuruduktan sonra SERS ölçümleri alınmış ve sonuçlar kalibrasyon grafiği üzerinden değerlendirilmiştir. *E.coli* bakterisi için kalibrasyon grafiğinde doğrusal aralık $2,7 \times 10^1$ - 1×10^6 kob/mL, toplam analiz süresi bir saatten az ve teşhis sınırı ise 10 kob/mL olarak tespit edilmiştir. Bakteri tayini için kullanılan nanopartiküllerin sentezi ve yüzey modifikasyonu, sentetik idrar gibi kompleks bir matristen *E.coli* bakterisinin etkili bir şekilde teşhisine olanak sağlamış ve ayrıca biotinli antikorların kontrollü bir şekilde avidin-bağlı nanopartikül yüzeyine immobilizasyonu ile de yatay akış immunoassay platformları üzerinden SERS sinyali alınarak veri analizi yapılmıştır. Ayrıca şeritler üzerinde test çizgisinden alınan SEM görüntüleri ile geliştirilen sistemin *E.coli* bakterisi için çalıştığı kanıtlanmıştır.

Belirlenen optimum koşulların yapay idrar örneklerine uygulanması ile test çizgilerinden elde edilen SERS spektrumları, *E.coli* içermeyen idrar örnekleri ile *E.coli* içeren idrar örnekleri arasında ciddi farklar olduğunu ve bakteri derişimine bağı olarak da SERS sinyallerinde artış olduğunu göstermektedir. Elde edilen sonuçların kantitatif olarak değerlendirilmesinde geri kazanım değerlerinin kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir. Yalnızca 10^4 kob/mL *E.coli* örneğinin geri kazanım sonuçlarının (Çizelge 3.3) diğer sonuçlara göre tatmin edici olmadığı gözlemlenmiştir. Bunun bir nedeni logaritmik kalibrasyonlardaki küçük sinyal farklarının yüksek hatalara yol açmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca bakteri gibi büyük boyutlu örneklerin kağıt temelli analizinde yaşanabilecek sürüklenmeme gibi sorunlar yöntemin kantitatif performansında bu gibi hatalara yol açabilmektedir.

Bu tez çalışması sonucunda nanopartikül, SERS ölçümleri ile kağıt tabanlı bakteri miktarı tayini konusunda bilgi birikimi sağlanmıştır. Bunlar arasında; nanopartiküllerin üretimi, karakterizasyonu ve bu partiküllerle kurulan sistemlerde gerçek numunelerde *E. coli* bakterisi için miktar tayini yapabilmesi önemli yer tutmaktadır. Genel olarak, yürütülen tez kapsamında bakterilerin hızlı bir şekilde tayin için yöntem geliştirilmesi, aynı zamanda ulusal ekonomi için de büyük bir öneme sahiptir. Günümüzde özellikle gelişmekte olan ülkelerde hızlı, basit ve ucuz tayin yöntemlerine ihtiyaç vardır ve tez kapsamında geliştirilen kâğıt tabanlı analitik sensörün sahada hızlı bakteri tanısında kullanılabilecek ticari ürün potansiyeli bulunmaktadır.

ÖZET

***Escherichia coli* Tayini için Yatay Akış İmmünoassay Platformlarının Geliştirilmesi**

Bakterilerin hızlı bir şekilde tespit edilmesi hastalık tanısı, çevre ve gıda analizleri için son zamanlardaki en önemli konulardan biridir. Bakterilerin varlığını gösteren en doğru ve güvenilir yöntemler kültürel yöntemlerdir, ancak bu analizlerin sonuçlanması 24 saat ya da daha uzun süreler gerektirmektedir. Bu uzun bekleme sürelerini ortadan kaldırmak için antijen-antikor reaksiyonunu temel alan hızlı antijen testleri geliştirilmiştir. Fakat hızlı antijen testlerinin en önemli dezavantajı düşük doğruluk ve düşük duyarlılıktır.

Yatay akış immunoassay sistemleri ucuz ve hızlı bir alternatif olarak son yıllarda oldukça önem kazanmıştır. Ancak bu sistemlerde nicel analiz için renk değişimi ölçümlerinin yerine, daha düşük tayin limitlerine ulaşabilecek yüksek hassasiyet ve doğrulukta tayin yöntemlerine ihtiyaç vardır. Bu amaçla tez kapsamında geliştirilen kâğıt tabanlı yatay akış immunoassay sistemi yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi (SERS) tekniği ile tayin edilmiştir. Hedef bakteri olarak seçilen *E.coli* tayini, yıkama işlemlerine gerek kalmadan ve SERS etiketi sisteme önceden yerleştirilerek gerçekleştirilmiştir. Yatay akış immunoassay platformu örnek pedi, konjugasyon pedi, nitroselüloz membran ve absorban ped olmak üzere dört bölgeden oluşacak şekilde inşa edilmiştir. Örneğin sisteme verilmesi ile konjugasyon pedindeki nanopartikül-antikor-bakteri kompleksi test pedindeki antikorlar ile yakalanmış ve bu şerit üzerinden *E.coli* tayini için SERS ölçümleri gerçekleştirilmiştir.

Yöntemin seçiciliği *Salmonella Enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* bakterileri ile test edilmiş ve bu bakterilerin SERS ölçümleri ile gerçekleştirilen *E.coli* tayininde girişim etkisi gözlenmemiştir. *E.coli* için kalibrasyon grafiğinde doğrusal aralık $2,7 \times 10^1$ - $1,0 \times 10^6$ kob/mL dir. Tayin için toplam analiz süresi bir saatten az ve teşhis sınırı ise 10 kob/mL olarak tespit edildi. Bakteri tayini için kullanılabilecek nanopartiküllerin tasarımı, sentezi ve yüzey modifikasyonu, karmaşık bir numuneden *E.coli* bakterisinin etkili bir şekilde ayrılmasına olanak sağlamış ve ayrıca biotinli antikorların kontrollü bir şekilde avidin-bağlı nanopartikül yüzeyine immobilizasyonu ile de yatay akış immunoassay platformları üzerinden SERS sinyali alınarak veri analizi yapılmıştır.

Hızlı bakteri tayin yöntemleri ülke ve dünya ekonomisinde günden güne önem kazanmaktadır, gerçekleştirilecek olan kâğıt tabanlı yatay akış immunoassay ölçümlerinin geçerli bir alternatif yöntem olarak çok yüksek bir ekonomik potansiyele sahip olduğu açıkça görülmektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteri tayini, *Escherichia coli*, Nanopartikül, Yatay akış immunoassay, Yüzeyde güçlendirilmiş Raman saçılması

SUMMARY

Development of Lateral Flow Immunoassay Platform for *Escherichia coli* Detection

The fast detection of pathogenic bacteria has one of the most significant and recent subject for food industry, environment and diagnostic analysis. The most accurate and reliable methods for the presence of bacteria are cultural methods, but the results of these analyzes require 24 hours or more. Rapid antigen tests based on the antigen-antibody reaction have been developed to eliminate these long waiting times. However, the most important disadvantage of rapid antigen tests is low accuracy and low sensitivity.

Lateral flow immunoassay systems have gained considerable importance in recent years as a cheap and fast alternative. However, in these systems, instead of color change measurements for quantitative analysis, high accuracy and accuracy determination methods are needed which can reach lower detection limits. For this purpose, the paper-based lateral flow immunoassay system developed within the scope of the thesis was determined by Raman spectroscopy (SERS) technique on the surface. The determination of *E.coli* as the target bacteria was carried out without the need for washing and pre-placing the SERS label on the system. The lateral flow immunoassay platform is constructed of four zones: sample pad, conjugation pad, nitrocellulose membrane and absorbent pad. After the sample was introduced into the system, the nanoparticle-antibody-bacteria complex on the conjugation pad was captured with the antibodies on the test pad and SERS measurements were performed for the determination of *E.coli* on this strip.

The selectivity of the method was tested with *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* and no interference effect was observed for the determination of *E.coli* by SERS measurements. The linear range in the calibration for *E.coli* is 2.7×10^1 - 1.0×10^7 cfu/mL. The total analysis time for the assay was less than one hour and the diagnostic limit was 10 cfu/mL. The design, synthesis and surface modification of the nanoparticles that can be used for bacterial determination enabled efficient separation of *E. coli* bacteria from a complex sample and also by controlled immobilization of biotinylated antibodies to the avidin-bound nanoparticle surface and data analysis by means of lateral flow immunoassay platforms.

Rapid bacterial determination methods are gaining importance day by day in the country and world economy. It is clear that the paper-based lateral flow immunoassay measurements to be performed have a very high economic potential as a viable alternative method.

Key words: Bacteria detection, *Escherichia coli*, Lateral flow immunoassay, Nanoparticles, Surface enhanced Raman scattering.

KAYNAKLAR

- ABBAS, AK, LICHTMAN, AH, PILLAI, S, BAKER, DH (2020) Basic immunology: functions and disorders of the immune system. <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C20160052403>.
- ALBERTS, B (2015) Molecular biology of the cell. 6. Baskı. Garland Science, Taylor and Francis Group.
- ANDERSON, DJ, MOSKOVITS, M (2006) A SERS-Active System Based on Silver Nanoparticles Tethered to a Deposited Silver Film. *J. Phys. Chem. B*, **110**: 13722–13727.
- AROCA, R (2006) Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy | Spectroscopy | Analytical Chemistry | Chemistry | Subjects | Wiley. 1. baskı. John Wiley & Sons, Ltd. <https://www.wiley.com/en-us/Surface+Enhanced+Vibrational+Spectroscopy-p-9780471607311>. Erişim Ağustos 6, 2019.
- BISHNOI, SW, LIN, Y, TIBUDAN, M, HUANG, Y, NAKAEMA, M, SWARUP, V, KEIDERLING, TA (2011) SERS Biodetection Using Gold–Silica Nanoshells and Nitrocellulose Membranes. *Anal. Chem.*, **83**: 4053–4060.
- BLOUNT, ZD (2015) The unexhausted potential of E. coli. *Elife*, **4**: 1–12.
- CAM, D, KESEROGLU, K, KAHRAMAN, M, SAHIN, F, CULHA, M (2010) Multiplex identification of bacteria in bacterial mixtures with surface-enhanced Raman scattering. *J. Raman Spectrosc.*, **41**: 484–489.
- CHART, H (2012) Escherichia: Urinary tract infection; travellers' diarrhoea; haemorrhagic colitis; haemolytic uraemic syndrome. *Med. Microbiol.*,: 280–289.
- CHEN, M, YU, Z, LIU, D, PENG, T, LIU, K, WANG, S, XIONG, Y, WEI, H, XU, H, LAI, W (2015) Dual gold nanoparticle lateflow immunoassay for sensitive detection of Escherichia coli O157:H7. *Anal. Chim. Acta*, **876**: 71–76.
- CLARK, LCJ (1956) Monitor and control of blood and tissue oxygen tensions. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs*, **2**: 41–48.
- CLARK, LCJ, LYONS, C (1962) Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**: 29–45.
- COSTA, MN, VEIGAS, B, JACOB, JM, SANTOS, DS, GOMES, J, BAPTISTA, P V, MARTINS, R, INÁCIO, J, FORTUNATO, E (2014) A low cost, safe, disposable, rapid and self-sustainable paper-based platform for diagnostic testing: lab-on-paper. *Nanotechnology*, **25**: 094006.
- CUI, X, HUANG, Y, WANG, J, ZHANG, L, RONG, Y, LAI, W, CHEN, T (2015) A remarkable sensitivity enhancement in a gold nanoparticle-based lateral flow immunoassay for the detection of Escherichia coli O157:H7. *RSC Adv.*, **5**: 45092–45097.
- ESCHERICH, TH (1989) The intestinal bacteria of the neonate and breast-fed infant. *Rev. Infect. Dis.*, **11**:

352–356.

- FABRIS, L, DANTE, M, NGUYEN, T-Q, TOK, JB-H, BAZAN, GC (2008) SERS Aptatags: New Responsive Metallic Nanostructures for Heterogeneous Protein Detection by Surface Enhanced Raman Spectroscopy. *Adv. Funct. Mater.*, **18**: 2518–2525.
- FAN, C, HU, Z, MUSTAPHA, A, LIN, M (2011) Rapid detection of food- and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **92**: 1053–1061.
- FERREIRA, DCM, GIORDANO, GF, SOARES, CC dos SP, DE OLIVEIRA, JFA, MENDES, RK, PIAZZETTA, MH, GOBBI, AL, CARDOSO, MB (2015) Optical paper-based sensor for ascorbic acid quantification using silver nanoparticles. *Talanta*, **141**: 188–194.
- GARIBYAN, L, AVASHIA, N (2013) Polymerase chain reaction. *J. Invest. Dermatol.*, **133**: 1–4.
- HALKMAN, AK (2005) Merck gıda mikrobiyolojisi uygulamaları. Başak Matbaacılık Ltd. Şti.
- HASSAN, AHA, BERGUA, JF, MORALES-NARVÁEZ, E, MEKOÇI, A (2019) Validity of a single antibody-based lateral flow immunoassay depending on graphene oxide for highly sensitive determination of *E. coli* O157:H7 in minced beef and river water. *Food Chem.*, **297**: 124965.
- HU, J, WANG, S, WANG, L, LI, F, PINGGUAN-MURPHY, B, LU, TJ, XU, F (2014) Advances in paper-based point-of-care diagnostics. *Biosens. Bioelectron.*, **54**: 585–597.
- JIN, SA, HEO, Y, LIN, LK, DEERING, AJ, CHIU, GTC, ALLEBACH, JP, STANCIU, LA (2017) Gold decorated polystyrene particles for lateral flow immunodetection of *Escherichia coli* O157:H7. *Microchim. Acta*, **184**: 4879–4886.
- KAHRAMAN, M, YAZICI, MM, ŞAHİN, F, ÇULHA, M (2007) Experimental parameters influencing surface-enhanced Raman scattering of bacteria. *J. Biomed. Opt.*, **12**: 054015.
- KANG, JS, HWANG, SY, LEE, CJ, LEE, MS (2002) SERS of Dithiocarbamate Pesticides Adsorbed on Silver Surface; Thiram. *Bull. Korean Chem. Soc.*, **23**: 1604–1610.
- LAW, JW-F, AB MUTALIB, N-S, CHAN, K-G, LEE, L-H (2014) Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations. *Front. Microbiol.*, **5**: 770.
- LEI, Y, CHEN, W, MULCHANDANI, A (2006) Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta*, **568**: 200–210.
- LI, H, HAN, D, PAULETTI, GM, STECKL, AJ (2014) Blood coagulation screening using a paper-based microfluidic lateral flow device. *Lab Chip*, **14**: 4035–41.
- LIU, H, CHEN, C, ZHANG, C, DU, X, LI, P, WANG, S (2019) Functionalized Au MBA @Ag Nanoparticles as an Optical and SERS Dual Probe in a Lateral Flow Strip for the Quantitative Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Sci.*, **84**. doi:10.1111/1750-3841.14766.
- MANDAL, PK, BISWAS, AK, CHOI, K, PAL, UK (2011) Methods for Rapid Detection of Foodborne Pathogens: An Overview. *Am. J. Food Technol. Am. J. Food Technol.*, **6**: 87–102.
- MCMEEKIN, TA (2003) Detecting pathogens in food. Woodhead.

- MOHAMMAD LUKMAN, Y, NOR DYANA, Z, RAHMAH, N, KHAIRUNISAK, AR (2018) Development and Evaluation of Colloidal Gold Lateral Flow Immunoassays for Detection of Escherichia Coli O157 and Salmonella Typhi. *J. Phys. Conf. Ser.*, **1082**. doi:10.1088/1742-6596/1082/1/012049.
- MORRIS, MD (2008) Review - Modern Raman Spectroscopy: A Practical Approach. *Anal. Chem.*, **78**: 33–33.
- MOSKOVITS, M, JEONG, DH (2004) Engineering nanostructures for giant optical fields. *Chem. Phys. Lett.*, **397**: 91–95.
- MOVASAGHI, Z, REHMAN, S, REHMAN, IU (2007) Raman Spectroscopy of Biological Tissues. *Appl. Spectrosc. Rev.*, **42**: 493–541.
- MURRAY, PR, ROSENTHAL, KS, PFALLER, MA (2016) Medical microbiology. <https://www.clinicalkey.com/dura/browse/bookChapter/3-s2.0-C2013019575X>.
- NERY, EW, KUBOTA, LT (2013) Sensing approaches on paper-based devices: a review. *Anal. Bioanal. Chem.*, **405**: 7573–7595.
- NGOM, B, GUO, Y, JIN, X, SHI, D, ZENG, Y, LE, T, LU, F, WANG, X, BI, D (2011) Monoclonal antibody against sulfaquinoxaline and quantitative analysis in chicken tissues by competitive indirect ELISA and lateral flow immunoassay. *Food Agric. Immunol.*, **22**: 1–16.
- NOBLE, J, ATTREE, S, HORGAN, A, KNIGHT, A, KUMARSWAMI, N, PORTER, R, WORSLEY, G (2012) Optical Scattering Artifacts Observed in the Development of Multiplexed Surface Enhanced Raman Spectroscopy Nanotag Immunoassays. *Anal. Chem.*, **84**: 8246–8252.
- OLK, P, RENGGER, J, HÄRTLING, T, WENZEL, MT, ENG, LM (2007) Two Particle Enhanced Nano Raman Microscopy and Spectroscopy. *Nano Lett.*, **7**: 1736–1740.
- PARK, TS, LI, W, MCCRACKEN, KE, YOON, J-Y (2013) Smartphone quantifies Salmonella from paper microfluidics. *Lab Chip*, **13**: 4832.
- RIVAS, L, REUTERSWÄRD, P, RASTI, R, HERRMANN, B, MÅRTENSSON, A, ALFVÉN, T, GANTELIUS, J, ANDERSSON-SVAHN, H (2018) A vertical flow paper-microarray assay with isothermal DNA amplification for detection of Neisseria meningitidis. *Talanta*, **183**: 192–200.
- SENGUPTA, A, LAUCKS, ML, DILDINE, N, DRAPALA, E, DAVIS, EJ (2005) Bioaerosol characterization by surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *J. Aerosol Sci.*, **36**: 651–664.
- SHULMAN, ST, FRIEDMANN, HC, SIMS, RH (2007) Theodor Escherich: The First Pediatric Infectious Diseases Physician? *Clin. Infect. Dis.*, **45**: 1025–1029.
- SINGH, AT, LANTIGUA, D, MEKA, A, TAING, S, PANDHER, M, CAMCI-UNAL, G (2018) Paper-based sensors: Emerging themes and applications. **18**: 1–22.
- SKOOG, DA, HOLLER, FJ, NIEMAN, TA (1998) Principles of instrumental analysis. 5th ed. Saunders College Pub. <https://www.worldcat.org/title/principles-of-instrumental-analysis/oclc/37866092>. Erişim Ağustos 7, 2019.
- SONG, C, LIU, J, LI, J, LIU, Q (2016) Dual FITC lateral flow immunoassay for sensitive detection of

- Escherichia coli O157:H7 in food samples. *Biosens. Bioelectron.*, **85**: 734–739.
- STILES, PL, DIERINGER, JA, SHAH, NC, VAN DUYNE, RP (2008) Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. *Annu. Rev. Anal. Chem.*, **1**: 601–626.
- SYAM, R, DAVIS, K, PRATHEESH, M, ANOOPRAJ, R, JOSEPH, B (2012) Biosensors: a novel approach for pathogen detection. **7**: 102.
- TALLEY, CE, JACKSON, JB, OUBRE, C, GRADY, NK, HOLLARS, CW, LANE, SM, HUSER, TR, NORDLANDER, P, HALAS, NJ (2005) Surface-Enhanced Raman Scattering from Individual Au Nanoparticles and Nanoparticle Dimer Substrates. *Nano Lett. Nano Lett.*, **5**: 1569–1574.
- TAO, Y, YANG, J, CHEN, L, HUANG, Y, QIU, B, GUO, L, LIN, Z (2018) Dialysis assisted ligand exchange on gold nanorods: Amplification of the performance of a lateral flow immunoassay for E. coli O157:H7. *Microchim. Acta*, **185**. doi:10.1007/s00604-018-2897-0.
- TIPPKÖTTER, N, STÜCKMANN, H, KROLL, S, WINKELMANN, G, NOACK, U, SCHEPER, T, ULBER, R (2009) A semi-quantitative dipstick assay for microcystin. *Anal. Bioanal. Chem.*, **394**: 863–869.
- TSAI, T-T, HUANG, C-Y, CHEN, C-A, SHEN, S-W, WANG, M-C, CHENG, C-M, CHEN, C-F (2017) Diagnosis of Tuberculosis Using Colorimetric Gold Nanoparticles on a Paper-Based Analytical Device. *ACS Sensors*, **2**: 1345–1354.
- TURKEVICH, J, STEVENSON, PC, HILLIER, J (1951) A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss. Faraday Soc.*, **11**: 55–75.
- TURNER, APF (2015) Biosensors: Fundamentals and applications - Historic book now open access. *Biosens. Bioelectron.*, **65**: A1.
- US, D (2016) Temel İmmünoloji ve Seroloji. 1. baskı. Hipokrat Kitapevi.
- WANG, C, PENG, J, LIU, DF, XING, KY, ZHANG, GG, HUANG, Z, CHENG, S, ZHU, FF, DUAN, ML, ZHANG, KY, YUAN, MF, LAI, WH (2018) Lateral flow immunoassay integrated with competitive and sandwich models for the detection of aflatoxin M 1 and Escherichia coli O157:H7 in milk. *J. Dairy Sci.*, **101**: 8767–8777.
- WANG, J, KATANI, R, LI, L, HEGDE, N, ROBERTS, EL, KAPUR, V, DEBROY, C (2016) Rapid detection of Escherichia coli O157 and shiga toxins by lateral flow immunoassays. *Toxins (Basel)*, **8**. doi:10.3390/toxins8040092.
- WONG, RC, TSE, HY (2009) Lateral flow immunoassay. 1. Baskı. Springer. https://www.worldcat.org/title/lateral-flow-immunoassay/oclc/710020626&referer=brief_results. Erişim Ağustos 6, 2019.
- YANG, H, DENG, M, GA, S, CHEN, S, KANG, L, WANG, J, XIN, W, ZHANG, T, YOU, Z, AN, Y, WANG, J, CUI, D (2014) Capillary-driven surface-enhanced Raman scattering (SERS)-based microfluidic chip for abrin detection. *Nanoscale Res. Lett.*, **9**: 138.
- ZHANG, JF, ZHOU, Y, YOON, J, KIM, JS (2011) Recent progress in fluorescent and colorimetric chemosensors for detection of precious metal ions (silver, gold and platinum ions). *Chem. Soc. Rev.*, **40**: 3416–3429.

ZHANG, M-Z, WANG, M-Z, CHEN, Z-L, FANG, J-H, FANG, M-M, LIU, J, YU, X-P (2009)
Development of a colloidal gold-based lateral-flow immunoassay for the rapid simultaneous detection
of clenbuterol and ractopamine in swine urine. *Anal. Bioanal. Chem.*, **395**: 2591–2599.



ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı	Ayşen
Soyadı	Gümüştas
Doğum yeri ve tarihi	Afyonkarahisar, 1986
Uyruğu	T.C.
Medeni durumu	Evli
İletişim adresi ve telefonu	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Tandoğan/Ankara, 06100.

II- Eğitimi (tarih sırasına göre yeniden-eskiye doğru)

Doktora	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, Ankara, 2015-
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Ankara, 2014-
Yüksek Lisans	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Dalı, Ankara, 2012-2015
Lisans	Süleyman Demirel Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, Isparta, 2014-2008
Yabancı dili	İngilizce

III- Ünvanları (tarih sırasına göre eskiden-yeniye doğru)

Uzman	Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Mikrobiyoloji Dalı, 2015
-------	---

IV- Mesleki Deneyimi

Kalite Sorumlusu/Sorumlu Yönetici Bahar Tavukçuluk Ltd. Şti., Antalya, 2009.

Sorumlu Yönetici

Aydeniz Yemek Ltd. Şti., Ankara, 2010-2012

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yayınları:

Eryilmaz, M., Kaskatepe, B., Kiymaci, M. E., Erol, H. B., Simsek, D., & **Gümüştas, A.** (2016). In vitro antimicrobial activity of three new generation disinfectants. Tropical Journal of Pharmaceutical Research, 15(10). <https://doi.org/10.4314/tjpr.v15i10.18>

Kiymaci, M. E., **Gumustas, A.**, Gumustas, M., Akin, A., & Ozkan, S. A. (2015). Comparative study for the determination of gemifloxacin by HPLC and microbiological methods from pharmaceutical preparations and biological samples. Current Pharmaceutical Analysis, 11(3).

Gumustas, A., Caglayan, M. G., Eryilmaz, M., Suludere, Z., Acar Soykut, E., Uslu, B., Boyaci, I. H. & Tamer, U. (2018). Paper based lateral flow immunoassay for the enumeration of *Escherichia coli* in urine. Analytical Methods, 10(10), 1213-1218.

Bildiriler:

Merve Eylül Bozkurt, **Aysen Gumustas**, Mehmet Gumustas, Ahmet Akin, Sibel A. Ozkan, Microbiological and HPLC method for the determination of gemifloxacin in pharmaceutical preparations and biological samples, ITP 2013, 6-9 October 2013, Tenerife, Spain, PS1-26, 148.

Aysen Gumustas, Merve Eylül Bozkurt, Mehmet Gumustas, Ahmet Akın, Sibel A. Ozkan, Comparative study for the determination of gemifloxacin by HPLC and microbiological methods from pharmaceutical preparations and biological samples.

2 nd International Conference on Analytical Chemistry RO-ICAC 2014, September 17-21, 2014, Targoviste, Romania. S4-P02.

Aysen Gumustas, Mehmet Gumustas, B. Bugra Barut, Sibel A. Ozkan and Bengi Uslu, the effect of core-shell particles on chromatographic determination and optimization of dutasteride and tamsulosin, 43rd Symposium of HPLC and related techniques (HPLC 2015), September 21-25, Beijing, China, 2015, pp. 165, P12.

Barut, B. B., Gumustas, **A.**, **Gumustas**, M., Ozkan, S.A., Uslu, B., Dutasterit ve Tamsulosin'in Eş Zamanlı Kromatografik Analizi, 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi 30 May-3 June 2016, Isparta, Turkey.

Aysen Gumustas, Elçin Ezgi Ahi, Mehmet Gokhan Caglayan, Bengi Uslu, Demet Çetin, Zekiye Suludere, Uğur Tamer, CTAB-Free Generation of SERS Active Gold Nanoparticle and Lateral Flow Immunoassay Application, 10th Aegean Analytical Chemistry Days, 29 September – 2 October, 2016, Çanakkale, Turkey, P3-48,325.

Kitap Bölümleri:

Gumustas M., Sengel-Turk C. T., **Gumustas A.**, Ozkan S. A., Uslu B. 2017. 5 - Effect of Polymer-Based Nanoparticles on the Assay of Antimicrobial Drug Delivery Systems - Grumezescu, A. M. (Ed.). Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics. Elsevier, Netherlands.

Bozal-Palabiyik, B., **Gumustas, A.**, Ozkan, S.A., Uslu, B. 2018. 12 - Biosensor-Based Methods for the Determination of Foodborne Pathogens. Grumezescu, A., Holban A. M. (Eds.) Foodborne Disaeses. Elsevier, Netherlands.

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Mevlana Değişim Programı, Ankara Üniversitesi

Prof. Dr. Nina Chanishvili, George Eliava Institute of Bacteriophages, Microbiology, and Virology, R&D Department, Tiflis, Gürcistan, 24.02.2014 - 31.08.2014

Projeleri

Proje adı: Yatay Akış İmmunoassay Platformlarının Hızlı Bakteri Tayini için Geliştirilmesi.

Proje yürütücüsü: Prof. Dr. Uğur Tamer

Projedeki görevi: Bursiyer

Destekleyen kuruluş: TÜBİTAK

Proje No: COST CA15114-114Z783

Tarih: 01.05.2015 - 01.05.2017