



EGE ÜNİVERSİTESİ



DOKTORA TEZİ

**KÖTÜYE KULLANILAN MADDELERİN
ANALİZİNDE *IN VITRO* DİAGNOSTİK TESTLER
İÇİN FARKLI NANOBIYOKONJUGATLAR VE TEST
BİLEŞENLERİNİN HAZIRLANMASI VE
UYGULAMALARI**

Emine GÜLER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 06.09.2017

Bornova-İZMİR

2017

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

(DOKTORA TEZİ)

**KÖTÜYE KULLANILAN MADDELERİN
ANALİZİNDE *IN VITRO* DİAGNOSTİK TESTLER
İÇİN FARKLI NANOBİYOKONJUGATLAR VE TEST
BİLEŞENLERİNİN HAZIRLANMASI VE
UYGULAMALARI**

Emine GÜLER

Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR

İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL

Biyokimya Anabilim Dalı

Sunuş Tarihi : 06.09.2017

Bornova-İZMİR

2017

Emine GÜLER tarafından doktora tezi olarak sunulan “**Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizinde In Vitro Diagnostik Testler İçin Farklı Nanobiyokonjugatlar ve Test Bileşenlerinin Hazırlanması ve Uygulamaları**” başlıklı bu çalışma EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliği ile EÜ Fen Bilimleri Enstitüsü Eğitim ve Öğretim Yönergesi'nin ilgili hükümleri uyarınca tarafımızdan değerlendirilerek savunmaya değer bulunmuş ve 06/09/2017 tarihinde yapılan tez savunma sınavında aday oybirliği/oyçokluğu ile başarılı bulunmuştur.

Jüri Üyeleri:

Jüri Başkanı : Prof. Dr. Suna Timur
Raportör Üye : Doç. Dr. Dilek Odacı Demirkol
Üye : Prof. Dr. Sarhan Sakarya
Üye : Prof. Dr. Perihan Ünak
Üye : Doç. Dr. Mustafa Emrullahoğlu

İmza

.....
.....
.....
.....
.....

EGE ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ETİK KURALLARA UYGUNLUK BEYANI

EÜ Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili hükümleri uyarınca Yüksek Lisans Tezi / Doktora Tezi olarak sunduğum “**Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizinde *In Vitro* Diagnostik Testler İçin Farklı Nanobiyokonjugatlar ve Test Bileşenlerinin Hazırlanması ve Uygulamaları**” başlıklı bu tezin kendi çalışmam olduğunu, sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgeleri bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara atıf yaptığımı ve bunları kaynaklar listesinde usulüne uygun olarak verdiğimi, tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya diğer bir üniversitede başka bir tez çalışması içinde sunmadığımı, bu tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda bilimsel etik kurallarına uygun olarak davrandığımı ve aksinin ortaya çıkması durumunda her türlü yasal sonucu kabul edeceğimi beyan ederim.

06/09/2017

İmzası



Adı-Soyadı

Emine GÜLER

ÖZET**KÖTÜYE KULLANILAN MADDELERİN ANALİZİNDE *IN VITRO*
DİAGNOSTİK TESTLER İÇİN FARKLI
NANOBIYOKONJUGATLAR VE TEST BİLEŞENLERİNİN
HAZIRLANMASI VE UYGULAMALARI**

GÜLER, Emine

Doktora Tezi, Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR

İkinci Danışmanı: Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL

Eylül 2017, 106 sayfa

“*In vitro* diagnostik, (IVD), Point of care (POC)” teknolojiler; klinik bir konu hakkında diagnostik sonuca yerinde, hızlı ve pratik bir biçimde ulaşmayı sağlamaları açısından geleceğin teknolojisi olarak gösterilmektedir. IVD kitler yasadışı maddelerin hızlı ve yerinde dedeksiyonu açısından çok kritik araçlardır. Madde kullanımının oluşturduğu sorunlara paralel olarak sağlık, adli durumlar, bazı işyerlerinde ve trafikte olmak üzere farklı uygulamalarla madde kullanımının tespiti zorunlu hale gelmiştir. Geniş bir kullanıcı ağına sahip bu ürünlerin geliştirilmesi ve iyileştirilmesine katkıda bulunacak bilimsel ve teknolojik altyapının oluşturulması bu tez projesinin konusunu oluşturmaktadır. Nanomateryal teknolojileri ile pratik dedeksiyon teknolojilerinin kombine edildiği bu tez projesinde, yasadışı/bağımlılık yapıcı maddelere yönelik farklı metodolojik yaklaşımlarla IVD test kitleri tasarlandı. Tasarımı yapılan test kitlerinde farklı ölçüm teknikleri dolayısıyla farklı sinyal ajanları ve yüzey kimyası kullanıldı. Yeni tekniklerle hazırlanan mikropılaka temelli ve lateral flow test (LFA) temelli test kitlerinin çalışma performansları detaylı bir şekilde araştırıldı ve sentetik biyolojik matrikslerin kullanılmasıyla örnek uygulama ve kromatografik doğrulama adımları başarıyla tamamlandı. Geliştirilen test kitlerinin akıllı telefon uygulamasıyla kombine edilmesi sonucu test yanıtları bir cep telefonu ile ölçüldü. Cep telefonu ile analize imkan sunan, yenilikçi, yerinde uygulanabilir hızlı tanı kitleri prototipleri tez projesinin çıktılarını oluşturmaktadır.

Anahtar sözcükler: *in vitro* diagnostik kitler, madde analizi, mikropılaka testler, lateral flow testler, nanomateryal biyokonjugasyonu, yüzey kimyası.

ABSTRACT**DRUGS OF ABUSE TESTING: DESIGN AND APPLICATION OF
NANOBIOCONJUGATES AND TEST COMPONENTS FOR *IN*
VITRO DIAGNOSTIC ASSAYS**

GÜLER, Emine

PhD in Biochemistry Department

Supervisor: Prof. Dr. Suna TİMUR

Co-Supervisor: Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL

September 2017, 106 pages

“*In vitro* diagnostic, (IVD), Point of care (POC)” detection technologies are emerged as futuristic technologies because of that they provide on-site, rapid and practical diagnostic information for a clinical situation. IVD kits are critical tools in terms of rapid and near-patient analysis of abused drugs. In parallel with the problems caused by substance addiction, drugs of abuse testing is required for wide range of applications including health, forensic field, workplace and traffic conditions. The main goal of this thesis project is the development and improvement of the so-called POC products, which have wide end-user network. For this aim, illicit drug IVD tests with novel methodological approaches were created *via* the combination of nanomaterial technologies with practical detection ways. In the design strategy of the developed test kits, various measurement principles were applied by using different signal agents and surface chemistry. The newly constructed microplate based assays and lateral flow based assays were investigated in detail for their working performances. Afterwards synthetic biological matrices were applied to the developed assays and their chromatographic confirmation was carried out successfully. Test signals in the designed test kits were measured by a mobile phone because of the combination with a smart phone application. Innovative, on-site and rapid test kits with possibility for mobile phone sensing are the prototypes of thesis project.

Keywords: *in vitro* diagnostic kits, abused drug analysis, microplate assays, lateral flow tests, nanomaterial bioconjugation, surface chemistry.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca maddi manevi her yönden desteğini eksik etmeyen, üretme ve sorun çözme becerisi kazandıran, tezimin oluşturulması ve yayınlanması aşamalarında deneyimleri ile yol gösteren saygı değer hocam Sayın Prof. Dr. Suna TİMUR'a, değerli görüşlerinden yaralandığım Sayın Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL'a, bilgisini ve desteğini hiçbir zaman esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Dilek ODACI DEMİRKOL'a, deneysel kısımlardaki yardımlarından dolayı Sayın Dr. Zinar Pınar GÜMÜŞ, YL Öğrencisi Tülay YILMAZ ve Güliz BOZOKALFA'ya, her zaman yanımda olan çalışma arkadaşım Bilal DEMİR'e, denemeler sırasında kullanılan polimerin sentezini yapan ve her zaman yol gösterici olan değerli hocam Prof. Dr. Yusuf YAĞCI ve araştırma ekibine ve bu aşamaya gelmemde katkıları olan tüm HOCALARIM ve laboratuvarda birlikte çalıştığım ARKADAŞLARIMA teşekkürü borç bilirim. Ayrıca lisansüstü eğitimime başlamamdaki en büyük desteğim olan AİLEM'e, tüm desteklerinden ve göstermiş olduğu sabır ve fedakarlıklar için Erdem ÇELİK'e minnettarım.

Bu çalışma **T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı, SAN-TEZ projesi** (Proje no: 0620.STZ.2014), **T.C. Kalkınma Bakanlığı, Araştırma Altyapısı Destek Programı** (Proje no: 2016K121190) ve **Ege Üniversitesi Araştırma Projeleri (BAP)** (Proje no: 16-FEN-004) fonları tarafından desteklenmiştir.

Ayrıca SAN-TEZ projesinde ortaklığından dolayı **Ege LS Tıbbi Ürünler Danışmanlık Reklamcılık San. Tic. Ltd. Şti.**'ye sonsuz teşekkürler.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
TEŞEKKÜR	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xxii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xxiii
1. GİRİŞ	1
1.1. Modern Biyosensör Teknolojileri: POC, IVD Testler	1
1.2. Bağımlılık Yapan Maddelerin Analizi	3
1.2.1. Biyolojik örneğin alınması ve örnek türünün seçimi	4
1.2.2. Örnek stabilitesi	8
1.2.3. Maddelerin dedeksiyon süreleri	8
1.3. Madde Dedeksiyon Teknolojileri ve Uygulamaları: Tarama ve Doğrulama ...	8
1.3.1. Tarama teknikleri: Moleküler tanıma ve ligand bağlama temelli testler	9
1.3.1.1. Lateral flow testler	9
1.3.2. Doğrulama teknikleri: Kromatografik yöntemler	11
1.4. Test Kitlerinde Kullanılan Sinyal Ajanları	11

İÇİNDEKİLER (devam)

1.4.1. Altın nanopartiküller	13
1.4.2. Floresans nanopartiküller	15
1.4.3. Diğer nanopartiküller	18
1.5. Test Kitlerinde Kullanılan Biyotanıyıcı Moleküller	21
1.5.1. Antikorlar	21
1.5.2. Aptamerler	23
2. MATERYAL VE METOT	25
2.1. Materyal	25
2.2. Kullanılan Cihaz ve Sistemler.....	25
2.3. Metot	26
2.4. ALSA Floresans Mikroplaka Test Kitinin Tasarımına Yönelik Çalışmalar...27	
2.4.1. Lipozom sentezi	29
2.4.2. Apta-lipozom sentezi	31
2.4.3. Karakterizasyon çalışmaları	32
2.4.4. ALSA tasarımı	33
2.4.5. ALSA ile kantitatif madde analizi	35
2.4.6. ALSA ile kalitatif madde analizi	35
2.4.7. Örnek uygulama ve test sisteminin doğrulanması	35
2.5. AFSD Floresans Mikroplaka Test Kitinin Tasarımına Yönelik Çalışmalar ...35	

İÇİNDEKİLER (devam)

2.5.1. AuNP'lerin aptamer ile konjugasyonu	37
2.5.2. μ -plaka yüzeylerinin tasarımı	38
2.5.3. AFSD test prosedürü.....	39
2.5.4. Örnek uygulama ve kromatografik doğrulama.....	39
2.6. Mobil LFA Kit: β -CD/LFA Test Kitine Yönelik Çalışmalar	39
2.6.1. β -CD/LFA lateral flow testin tasarımı.....	39
2.6.2. Mobil LFA kit ile analiz	44
2.7. Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti	44
2.7.1. Biyokonjugatların Hazırlanması.....	48
2.7.2. Biyokonjugatların karakterizasyonu	50
2.7.3. Mobil floresans mikroplaka test kiti: Tasarım.....	51
2.7.4. Mobil floresans mikroplaka test kiti: Ölçüm prensibi	52
2.7.5. Kromatografik doğrulama	53
3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	54
3.1. ALSA Floresans Mikroplaka Test Kitine İlişkin Sonuçlar.....	54
3.1.1. Apta-lipozomların karakterizasyonuna ilişkin bulgular	54
3.1.2. ALSA – Kantitatif analiz.....	56
3.1.3. ALSA – Kalitatif analiz.....	58
3.1.4. ALSA – Örnek uygulama ve kromatografik doğrulama	60

İÇİNDEKİLER (devam)

3.2. AFSD Floresans Mikroplaka Test Kitine İlişkin Sonuçlar	61
3.2.1. Karakterizasyon çalışmaları	61
3.3. Mobil LFA Kitine İlişkin Sonuçlar	69
3.3.1. Test membranlarının hazırlanmasına ilişkin optimizasyonlar	69
3.3.2. Cep telefonuna entegre LFA testi ile kokain analizi	71
3.4. Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti	74
3.4.1. Biyokonjugatların karakterizasyonuna ilişkin bulgular	74
3.4.2. Mobil floresans mikroplaka test kiti- Met analizi	76
3.4.3. Mobil floresans mikroplaka test kiti- BE analizi	77
3.4.4. Mobil floresans mikroplaka test kiti- Kromatografik doğrulama	78
4. GENEL DEĞERLENDİRME	80
KAYNAKLAR DİZİNİ	83
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1 POC ürünlere ilişkin bazı özellikler.	2
1.2 Madde analizinde izlenen temel aşamalar	4
1.3 Yarışmasız LFA yanıtlarının değerlendirilmesi.	10
1.4 Yarışmalı LFA sonuçlarının değerlendirilmesi.	11
1.5 AuNP'lerin konjugasyonu şematik gösterim.	15
1.6 AuNP'lerin kovalent konjugasyonunda kullanılan kimyasal gruplar.	15
1.7 QD'lerin biyomateryallerle modifikasyonu. (1) Floresans çekirdek (Genellikle CdSe ya da CdTe); (2) Koruyucu kabuk (Genellikle ZnS); (3) Kolloidal stabiliteyi sağlamak ya da biyoaktif moleküllerin bağlanması için fonksiyonel yüzey oluşturmak için polimer kaplama.	17
1.8 Biyosensör uygulamalarında lipozom tasarımı.	19
1.9 Antikor konjugatlarının oluşturulduğu fonksiyonel gruplar.	22
1.10 Aptamer temelli sistemlerde kullanılan formatlar a) Hedef olan küçük molekülün aptamerin yapısında bulunan bağlanma bölgesine girmesi, b) Tek taraflı format, c) Çift taraflı (sandviç) formatı ile iki aptamerin kullanıldığı bağlanma, d) Sandviç formatında aptamer ve antikorun birlikte kullanılması.	24
2.1 Geliştirilen test kitlerine ait özelliklerin şematik gösterimi.	26
2.2 Tez projesinde tasarlanan ALSA'nın çalışma prensibinin şematik gösterimi.	29
2.3 ALSA test kitinin tasarımındaki deneysel adımlar.	29

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2. 4 Lipozom sentezinin şematik gösterimi	31
2.5 Apta-lipozom sentezinin şematik gösterimi.....	32
2.6 a) ALSA tasarımı ve b) ALSA ile kokain/BE analizinin şematik gösterimi.	34
2.7 AFSD test sisteminin şematik gösterimi.....	36
2.8 AFSD test kiti tasarımında yürütülen deneysel adımlar.	37
2.9 a) AFSD tasarımı ve b) AFSD ile kokain/BE analizinin şematik gösterimi....	38
2.10 a) β -CD temelli lateral flow testin bileşenlerinin şematik gösterimi. b) CD-LFA ile yanıt oluşumunun şematik gösterimi.	40
2.11 Geliştirilen Mobil Floresans Mikropłaka Test Kitine ilişkin şematik gösterim.	45
2.12 Mikropłaka yüzeylerinin hedef maddeye seçimli antikor ile modifiye edilmesi.....	45
2.13 Model yasadışı maddelerin test kitine uygulanması.	46
2.14 Dedeksiyon konjugatlarının test kitine uygulanması.	46
2.15 Test kitinin UV lamba altında fotoğraflarının çekilmesi.	47
2.16 Test kitinde oluşan renklerin cep telefonu uygulaması ile ölçülmesi.	47
2.17 FITC/Antikor biyokonjugasyonu şematik gösterim.	49

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
2.18 QD/Antikor biyokonjugasyonu şematik gösterim.....	50
2.19 Mobil floresans mikropilaka test kitinin tasarımının şematik gösterimi.	52
2.20 a) Test plakasının UV lamba altında görüntülenmesi, b) Mobil-DopSENS sisteminin UV lamba ve cep telefonu kullanılarak ölçüm prensibinin şematik gösterimi.	52
3.1 Farklı total lipid konsantrasyonlarında hazırlanan Texas Red işaretli lipozom örneklerinin floresans spektrumları (Ex/Em : ~595/615 nm).	55
3.2 a) Texas Red DHPE lipidinin moleküler yapısı, b) Tex Red'in floresans Ex/Em spektrumu.....	56
3.3 ALSA kullanılarak farklı konsantrasyonlarda BE analizlendiğinde elde edilen floresans sinyalleri.....	57
3.4 ALSA kullanılarak elde edilen BE doz-cevap grafiği. (İçteki grafik: BE kalibrasyon grafiği.)	57
3.5 ALSA kullanılarak elde edilen kokain doz-cevap grafiği. (İçteki grafik: kokain kalibrasyon grafiği.)	58
3.6 ALSA'ya a) örnek uygulanmadığında, b) 2,5 µM BE, c) sentetik tükürük (2,5 µM BE içeren) ve d) sentetik idrar (2,5 µM BE içeren) uygulandığında elde edilen floresans mikroskop görüntüleri.	59
3.7 ALSA ile artan konsantrasyonlarda BE ve kokain örneklerine alınan UV lamba altında görüntüleri.....	60

ŞEKİLLER DİZİNİ (devam)

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.8 a) μ -well yüzeyinin modifikasyonunu gösteren floresans spektrum. Kokain (5,0 nM) ve BE (10 μ M). b) AFSD ile artan konsantrasyonlarda kokaine alınan yanıt.	62
3.9 AFSD sisteminin artan konsantrasyonlarda BE uygulandığında verdiği floresans cevap.....	63
3.10 AFSD sisteminin artan konsantrasyonlarda Kokain uygulandığında verdiği floresans cevap.	64
3.11 Farklı konsantrasyonlarda standart katma ile hazırlanmış sentetik idrar örneklerinin AFSD ile analizlenmesi ve HPLC ile doğrulanması.	66
3.12 AFSD sistemine Kokain ve BE eş zamanlı uygulandığında elde edilen yanıt.....	68
3.13 Girişim yapma potansiyeli olan maddelerin AFSD test sistemine uygulandığında alınan test yanıtları.	69
3.14 Bloklama solüsyonu 1 ile hazırlanan kit.	69
3. 15 Bloklama solüsyonu 2 ile hazırlanan kit.	70
3.16 Bloklama solüsyonu 3 ile hazırlanan kit.	70
3.17 Farklı seyreltmelerde hazırlanan AuNP konjugatları ile oluşturulan test ve kontrol çizgileri.	71
3.18 Cep telefonu ile sinyallerin ölçülmesi-şematik gösterim.	72

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
3.19 Geliştirilen β -CD/LFA ile kokain için alınan yanıtlar ve cep telefonu ile ölçülen renk şiddeti değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.	73
3.20 β -CD/LFA testine girişim yapma potansiyeli olan maddeler uygulandığında alınan yanıtlar. BE: Benzoilekgonin; THC: Tetrahidrokannabinol; MET: Metamfetamin.	74
3.21 FITC, FITC/Antikor biyokonjugatı ve diyaliz suyuna ilişkin floresans spektrumları ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: ~492 nm/518 nm).....	75
3.22 QD, QD/Antikor biyokonjugatı ve yıkama suyuna ilişkin floresans spektrumları ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: ~380 nm/606 nm).....	75
3.23 a) Geliştirilen test sistemi ile artan MET konsantrasyonlarına alınan floresans yanıt, b) Mobil floresans mikroparka test kiti ile MET için doz-yanıt grafiği (İçteki grafik: MET kalibrasyon grafiği), c) Cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile renk analizi.	77
3.24 a) Geliştirilen test sistemi ile artan BE konsantrasyonlarına alınan floresans yanıt, b) Mobil floresans mikroparka test kiti ile BE için doz-yanıt grafiği (İçteki grafik: BE kalibrasyon grafiği), c) Cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile renk analizi.	78

ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
2. 1 Geliştirilen test kitlerine ilişkin özelliklerin özeti.....	27
3. 1 Hazırlanan lipozom veziküllerinin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri	54
3.2 ALSA ile örnek uygulama elde edilen yanıtlar ve kromatografi sonuçları.....	60
3.3 AuNP ve sentezlenen AuNP konjugatına ilişkin partikül boyutu analizi	61
3. 4 AFSD sistemine ilişkin bazı analitik performans parametreleri.	64
3.5 AFSD ile örnek uygulama ve kromatografik doğrulama.....	65
3.6 QD ve Antikor biyokonjugatı için partikül boyutu ve yüzey yükü sonuçları.....	76
3.7 Sentetik biyolojik sıvılarda örnek uygulama ve kromatografik doğrulama	79

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
POC	Point of care
IVD	<i>in vitro</i> diagnostik
GC	Gaz kromatografisi
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
TLC	İnce tabaka kromatografisi
CE	Kapiller elektro kromatografi
MS	Kütle spektroskopisi
PCP	Fensiklidin
LFA	Lateral flow assay
AuNP	Altın nanopartikül
GC-MS	Gaz kromatografisi-Kütle spektroskopisi
DMPC	1,2- dimiristoil-sn-glisero-3- fosfokolin
PE	Fosfatidiletanolamin
BE	Benzoilekgonin
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür
NHS	N-hidroksisüksinimid
QD	Kuantum nokta

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ (devam)

<u>Kısaltmalar</u>	<u>Açıklama</u>
DLS	Dynamic light scattering
ALSA	Apta-Lipozom Sandviç Testi
AFSD	Aptamer katlanmasına dayanan sensör platformu
Apt-AuNP	Aptamer-Altın nanopartikül konjugatı
β -CD	Beta-siklodekstrin
PVA	Poli vinil alkol
BSA	Bovin (sığır) serum albumin
PVP	Poli vinil pirolidin
Anti-IgG	İmmunoglobulin G antikoru
MET	Metamfetamin
FITC	Fluorescein isothiocyanate
Anti-MET	Metamfetamin antikoru
Anti-BE	Benzoilekgonin antikoru
THC	Tetrahidrokannabinol

1. GİRİŞ

1.1. Modern Biyosensör Teknolojileri: POC, IVD Testler

“Point of care (POC)” test terimi; hastanın (kişinin) bulunduğu yerde ya da hastaya (kişiye) yakın bölgede uygulanabilen testleri tanımlamak için kullanılmıştır. Günümüze kadar farklı analitik tekniklerin kombine edildiği çok sayıda biyosensör sistemi; biyomedikal, çevresel, güvenlik ve araştırma amaçlı geliştirilmiştir. Basit anlamıyla bir biyolojik tanıyıcı ve bir sinyal ileticiden (transducer) oluşan bilinen biyosensör sistemlerinin yerini daha kompleks, multi-analit (aynı anda birden fazla maddenin analizi) ve daha kapsamlı analizler yapabilen biyosensör teknolojileri almaktadır. POC diagnostik, *in vitro* diagnostik (IVD) testlerin kullanımı laboratuvar personeli ya da laboratuvar deneyimi gerektirmemektedir. Bu diagnostik testlerde; proteinler, nükleik asitler, metabolitler, ilaçlar, çözünmüş iyon ve gazlar, insan hücreleri ve mikroorganizmalar hedef analitleri oluştururken kan, tükürük, idrar ve diğer vücut sıvıları analizin yapıldığı örneklerdir (Şekil 1.1). Hastane, klinik ya da özel muayenehanelerde veya evde bir hastalığın takibi, su ya da gıda güvenliğinin takibi, yasal düzenlemelere ilişkin takipler gibi geniş bir alanda POC ürünlere ihtiyaç duyulmaktadır. Çünkü bu ürünler çok az miktarda örnekle ve ön hazırlama işlemi gerektirmeden çok kısa bir sürede test yanıtı vermektedirler. Basit kullanım talimatlarıyla çoklu analiz ya da belirteci (marker) pratik bir biçimde dedekte etmektedirler (Vashist et al., 2015; Luppá et al., 2011; Syedmoradi et al., 2017; Gubala et al., 2012). Polimer ya da kağıt temelli bir strip üzerinde renkli bir çizgi ya da spot oluşumu ile test sonucu basit bir şekilde yorumlanmaktadır. Ayrıca son dönemlerdeki gelişmeler sayesinde elde taşınabilir cihazlar ya da masaüstü cihazların kullanımıyla birlikte analitik test yanıtlarının kantitatif verilere dönüştürülmesi de mümkün olmuştur (Gubala et al., 2012). Tüm bunlar POC dedeksiyon teknolojilerine gösterilen yüksek talebi açıklamaktadır çünkü bu diagnostik platformlar duyarlı, çevre-dostu, taşınabilir, yerinde uygulanabilir (on-site) ve düşük maliyetli olması gibi yüksek avantajlarıyla birlikte analitik bilgiye hızlı ulaşım sağlamaktadırlar (Syedmoradi et al., 2017; Gao et al., 2017). POC ürünleri geliştiren firmalar ve araştırmacılar bu ürünlerin pratik uygulamalarını arttırmak ve geliştirmek için sürekli bir çaba içindedirler. Bu Ar-Ge ve üretim

çalışmaları sırasındaki temel stratejiler; minyatürizasyon, hassasiyet ve güvenilirlik, kolay kullanım, hızlı cevap alınması üzerine odaklanmıştır (St-louis, 2000). Modern laboratuvar cihazlarındaki çeşitliliğin kümülatif bir biçimde büyümesine paralel olarak, cep telefonlarının POC ürünlerde dedeksiyon aracı olarak kullanılması ideal sistemler olarak gün yüzüne çıkmıştır (Gopinath et al., 2016). Akıllı telefonların biyosensör sistemlerine entegrasyonu uluslararası literatürde oldukça popüler bir konudur. (“Smartphone analysis”, “Portable smartphone laboratory”, “Smartphone as a biosensor”) Fakat ticari bir ürün haline getirilmesi ile ilgili süreçler hala devam etmektedir. Günümüzde cep telefonlarının kullanım oranı düşünüldüğünde, POC ürünlerin cep telefonları ile kombine edilmesinin insan sağlığı açısından ne kadar değerli olduğu açıktır. Cep telefonu gibi elde taşınabilir ve kolay ulaşılabilir teknolojilerle de bir araya getirilebilen POC ürünler hem taşıdıkları avantajlar hem de kullanım alanlarının yaygınlığı sayesinde geleceğin sensör teknolojileri olarak gösterilmektedirler (Eltzov et al., 2015; Mudanyali et al., 2012; Quesada-González and Merkoçi, 2017; Roda et al., 2016; Zhang and Liu, 2016). POC ürünler sınıfında yasadışı/bağımlılık yapıcı maddelerin dedeksiyonu büyük bir paya sahiptir. Trafikten iş yerlerine ve kliniklere kadar pek çok alanda taşınabilir hızlı tanı kitlerine gereksinim olduğu açıktır.



Şekil 1.1 POC ürünlere ilişkin bazı özellikler.

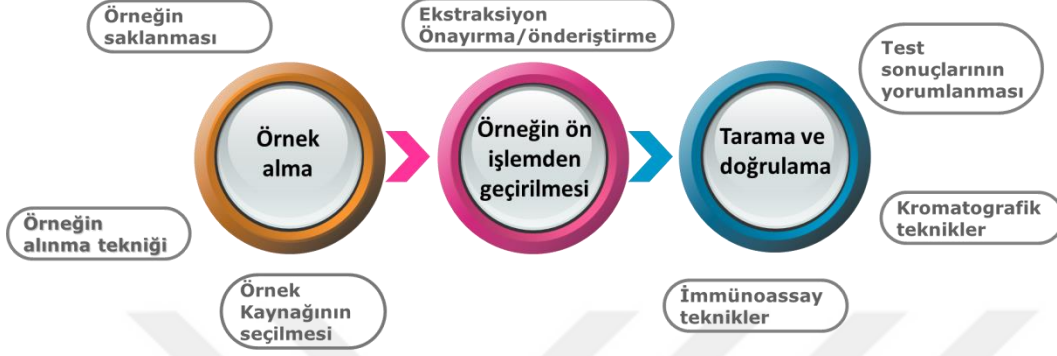
1.2. Bağımlılık Yapan Maddelerin Analizi

Madde bağımlılığı toplumsal bir halk sağlığı sorunudur ve günümüz hayatının her alanında büyük bir yer tutmaktadır. Madde kullanım bozuklukları halen dünyanın en önemli sağlık ve güvenlik sorunlarından biri olma özelliğini sürdürmektedir. Madde bağımlılığı ile mücadelede en önemli noktalardan biri de bu maddelerin ya da metabolitlerinin biyolojik sıvılarda hızlı, pratik ve güvenilir yöntemlerle tespit edilmesidir. Tükürük, idrar, kan, saç ve ter gibi biyolojik matrislerde madde analizinin yapılması adli bilimler ve sağlık bilimleri için bir gerekliliktir. Klinik ve adli toksikolojik analizlere ek olarak son zamanlarda yasal düzenlemelerde yer alan iş yeri madde testi (workplace drug testing) uygulamaları da madde analizine ihtiyaç duyan alanlardır. Bağımlılık yapan maddelerin analizinde kullanılan mevcut teknikler genel olarak üç ana kategoride gruplandırılır:

1. Moleküler tanıma ve ligand bağlama temelli immünoassayler, madde tarama testlerinin içinde en çok tercih edilenidir.
2. İlgilenilen analitin diğer örnek bileşenlerinden fiziksel ayrımını sağlamada çeşitli kromatografik ve elektroforetik teknikler (Gaz kromatografisi (GC), yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), ince tabaka kromatografisi (TLC), kapiller elektroforez (CE) ve kapiller elektrokromatografi gibi)
3. Kütle spektroskopisi (MS), numune matrisinin çeşitli türlerinde maddelerin tanımlanması, miktarının belirlenmesi ve/veya yapısının ortaya çıkarılmasında kullanılabilir (Wong and Tse, 2005).

Madde kullanımının tespiti; analizin yapılacağı örneğin seçilmesinden, örneğin kişiden alınma yöntemi, örneğe ön işlem yapılıp yapılmayacağı, örneğin saklama koşullarının belirlenmesi, hangi analiz yönteminin kullanılacağı ve analiz sonuçlarının yorumlanmasına kadar uzanan kapsamlı aşamalar sonucu tamamlanmaktadır (Şekil 1.2). Kan, idrar ve oral sıvı (tükürük) en yaygın tercih edilen biyolojik matrisler olmakla birlikte ter, saç, nefes, tırnak, yeni doğanlarda göbek kordonu, plasenta gibi diğer biyolojik materyaller de alternatif olarak kullanılabilir. Madde analizinin yapılacağı biyolojik örneğin seçilmesinde; maddelerin örnekte dedeksiyon süreleri, matris bileşenleri ve özellikleri, örnek

alma koşulları, kullanılan yöntem, analizin yapılacağı yer gibi parametreler etkilidir. Madde analizinde genel olarak iki kategoriden söz edilmektedir; Ön tarama testleri ve doğrulama testleri. Ön tarama testlerinde immünoassay tabanlı yöntemler kullanılırken doğrulama testlerinde ise kromatografik yöntemler uygulanmaktadır.



Şekil 1.2 Madde analizinde izlenen temel aşamalar

1.2.1. Biyolojik örneğin alınması ve örnek türünün seçimi

Madde analizinin yapılacağı örnek türünün seçilmesinde örneğin alınma biçiminden saklanma koşuluna ve analizi hedeflenen maddenin özelliklerine kadar detaylı parametreler etkilidir. Bu nedenle farklı örnek türlerinin birbirlerine üstünlük ve dezavantajları vardır. Bu özellikler aşağıda özetlendiği gibidir;

Kan: Kan örnekleri klinik uygulamalarda yaygın olarak tercih edilen matriks türüdür. Kanda madde analizi açısından bilinmesi gereken en kritik bilgi; kan örneklerinin kişinin o an madde etkisi altında olduğunu gösteriyor olmasıdır. Aynı zamanda madde kullanımından kısa bir süre sonra da maddenin varlığı saptanabilir. Bu durumlar kan örneklerinin idrar örneklerine karşı olan üstünlükleridir. Fakat kan örneklerinin saklanması bazen sorunlar yaratmaktadır. Beklemiş kan örneklerinde maddelerin stabiliteyi düşük olabilmektedir. Bu da bazı durumlarda kan örneklerinin tercih edilmesini kısıtlamaktadır. Aynı zamanda örnek alımı kolay olan ve invaziv olmayan, örnek alma aşamasında kişiye rahatsızlık vermeyen metotlara olan eğilimin artması kan örneklerinin dezavantajları arasındadır.

İdrar: Madde analizinde çok sık kullanılan vücut dışı sıvıdır. Matriks yapısının kan gibi karmaşık olmaması, örnek almanın kolay olması, madde metabolitlerini uzun süre bulundurması nedeniyle dedeksiyon süresini uzatması

gibi nedenler idrar matriksinin tercih edilmesinde önemli sebeplerdir. Fakat idrar örneklerinin kullanılmasında karşılaşılan en büyük problemlerden biri dışarıdan müdahalelere açık olmasıdır. Örneğin değiştirilmesi ya da örnek bileşenlerine dışarıdan müdahalede bulunulması gibi hilelerle karşılaşılmıştır. Bununla başa çıkmak için örnek alımı gözetim altında yapılmaktadır. Fakat oral yolla idrar bileşenlerine müdahale edilmesi de mümkün olabildiğinden hilesel girişimlerin tamamen engellendiği söylenemez. Bu gibi hileler test sonuçlarının yanlış negatif olarak yorumlanmasına yol açabilmektedir (Wong and Tse, 2005; Rouen et al., 2001).

Tükürük (Ağız sıvısı, oral sıvı): Ağızdan toplanan tükürük sıvısına, oral sıvı (oral fluid) adı verilir. Tükürük bileşenleri; %99 su, proteinler ve mineral tuzlarından oluşur. Ağız sıvısının içeriğinde; karışık tükürüğe ek olarak; kan, lenf, kreviküler (dişeti oluğu sıvısı) sıvı, dişeti ve yanaklardan gelen hücreler bulunur. Tükürük başlıca üç büyük tükürük bezinden salgılanmaktadır fakat tükürük sıvısına katkıda bulunan çok sayıda tükürük bezi bulunmaktadır. Oral kaviteye ilaç transfer mekanizmalarının aydınlatılması ile birlikte oral sıvıların diagnostik amaçlı kullanımı artmıştır. Tükürük; ilaç ve hormonların kan seviyelerinin bir aynası olarak kabul edilmektedir. Yasadışı ilaçlar serum/plazma oranı 1'den yüksektir ve tükürük konsantrasyonları kandan daha yüksektir. Dolayısıyla tükürük; roadside (yol üzerinde) madde testi ve kriminal madde testleri açısından avantajlı bir matriks olarak seçilmiştir. Tükürük kompozisyonu değişiklik gösterebilmektedir. Parotid bez dinlenme durumundaki tükürüğün %25'i uyarılmış tükürüğün %50'sini üretmektedir ve sadece seröz tükürük üretir. Submandibular bez (%70 dinlenme durumunda tükürük), hem seröz hem mukus tükürük salgılar. Sublingual bezler ise müsinin %70'ini salgılar. Tükürük; %99 su, %0,7 protein ve %0,26 müsin içerir. Madde testi yanıtlarının yorumlanması açısından tükürük ilaç transfer kinetikleri dikkatli irdelenmelidir. İlaçların çoğu, hücre membranlarından tükürüğe pasif difüzyonla geçer. Hücrelerden pasif difüzyonla geçen ilaçların tükürük konsantrasyonları; bağlanmayan (unbound), iyonize olmayan (unionized) ana ilaç (parent drug) konsantrasyonlarına ya da lipofilik metabolitlerine bağlıdır. Tükürük/plazma oranı (S/P) teorik olarak Henderson-Hasselbach eşitliğinden türetilen aşağıdaki formül ile hesaplanabilir:

Bazik ilaçlar için:
$$S/P = \frac{[1 + 10(pK_b - pH_s)]}{[1 + 10(pK_b - pH_p)]} + \frac{f_p}{f_s}$$

Asidik ilaçlar için:
$$S/P = \frac{[1 + 10(pH_s - pK_a)]}{[1 + 10(pH_p - pK_a)]} + \frac{f_p}{f_s}$$

S/P: Tükürük/plazma oranı

S: Tükürükteki ilaç konsantrasyonu

P: Plazmadaki ilaç konsantrasyonu

pK_b: Bazik ilaçlar için iyonizasyon sabitinin logaritması

pK_a: Asidik ilaçlar için iyonizasyon sabitinin logaritması

pH_s: Tükürük pH'sı

pH_p: Plazma pH'sı

f_p: Plazmadaki protein bağlı ilaç fraksiyonu

f_s: Tükürükteki protein bağlı ilaç fraksiyonu

İlaçlar S/P oranına göre sınıflandırılmıştır. Asidik ilaçlar (pK_a 5,5'ten düşük) ve/veya yüksek oranda protein bağlayanlar genellikle 1,0'den düşük S/P oranına sahiptir. Örneğin; benzodiazepinler, barbituratlar ve kannabinoidler

Nötral ilaçlar ($5,5 \leq pK_a \leq 8,5$) ve alkol S/P oranı hemen hemen 1,0'dir. Tükürük oluşma oranı ya da toplama koşullarına göre değişiklik göstermez.

Üçüncü grup S/P oranı 1,0'den büyük olan ilaçları kapsar. Oral sıvıda plazmadan daha yüksek konsantrasyonlarda bulunurlar.

Bağımlılık yapıcı maddeler oral sıvıya pasif difüzyonla geçen sınıfta yer almaktadır. Ağız dokularındaki depolardan oral sıvıya girerler. Oral dokulardaki depolardan oral sıvıya geçen ilaçlar, Henderson-Hasselbach eşitliği ile hesaplanan teorik S/P oranı ile tahmin edilenden daha yüksek konsantrasyonlardadır.

Bağımlılık yapıcı maddeler çoğunlukla nefes yoluyla kullanılır/içilir (smoke). Bu da önemli ölçüde oral doku depolarının oluşmasını sağlar. Bazı maddeler (kokain, eroin, kannabis, metamfetamin (MET) ve fensiklidin (PCP)) içildikten sonra S/P oranlarının 100 kattan daha fazla yükseldiği rapor edilmiştir.

Sublingual absorpsiyon yoluyla alınan maddeler (fentanil ya da buprenorfin) ve sıvı preparasyonlar olarak verilenler (kodein, morfin ve metadon) oral doku depoları oluşturması beklenir ve bu yüzden S/P oranları oral kullanım sonrasında artar. Tablet formunda alınan ilaçlar da S/P oranını arttırabilir – hap materyali ağızda tutunuyorsa ya da hap parçaları ağızda kalırsa. (Ekstazi ve fenitoin). Burundan çekilen maddeler (kokain ve eroin) de oral sıvının bulunduğu doku depoları oluşturabilirler. Oral sıvı; ekspektorasyon (tükürme) (0.5 mL/min), draining (akıtma), absorpsiyon, suction (emme), gibi farklı yollarla toplanabilir. Örnek toplama sırasında tükürük üretimi sitrik asit tuzları (5–10 mL/min) ya da asidik ekşi şeker ya da mekanik yollar (parafin (1–3 mL/min) ya da kauçuk bant/strip çiğneme) ile arttırılabilir.

Ağızda bir absorptif kollektör olması saliva salımını stimüle eder. Stimülasyon metodu müsin miktarı ve tükürük pH'sını etkiler. Tükürük salımının uyarılmasıyla birlikte tükürük pH'sı artar (yaklaşık olarak 6,2'den 7,4'e) ve oral sıvıdaki bazik ilaçların miktarı azalır.

Tükürük pH'sı normalde 6,7'dir. (5,6-7,9 akış hızına bağlı olarak)

Kontrollü kodein alımından sonra, oral sıvı kodein konsantrasyonlarının, uyarılmamış oral sıvıdan tükürme ya da akıtma yoluyla toplanan örneklerde absorptif aparatlarla alınanlardan daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Uyarılmış ve uyarılmamış tükürük örneklerinde kokain oral sıvı konsantrasyonları kıyaslanmıştır. Uyarılmamış tükürükten toplanan örneklerde, uyarılmış örneğe kıyasla ortalama 5,2 kat fazla kokain tespit edilmiştir. BE ve ekgonin metil ester için ise bu oranlar sırasıyla 6 ve 5,5'tir (Cooper and Cooper, 2008; Bosker and Huestis, 2009; Spiehler, 2000).

Kan, tükürük ve idrar örnekleri ile kıyaslandığında bazı durumlarda diğer matriksler tercih edilmektedir; sonuçların geniş bir alanı kapsamaması nedeniyle **saç** örnekleri, invaziv olmaması, hile girişimine açık olmaması ve bazı maddeler için plazma ve idrara kıyasla daha geniş bir dedeksiyon süresine sahip olması gibi nedenlerden dolayı **ter** örnekleri; kan, idrar ve tükürüğe kıyasla daha az karmaşık bir yapı olması, invaziv olmaması ve hilesel girişimlere kapalı olması gibi nedenlerle **nefes** (Gallardo and Queiroz, 2008).

1.2.2. Örnek stabilitesi

İlaç seviyelerinin zamanla azaldığı biliniyor olmasına rağmen, biyolojik matrislerde ilaç stabilitesi hakkında yeterli bilgi maalesef yoktur.

İlaç degradasyonu farklı faktörlerle ilişkilendirilebilir;

- Depolama koşulları
- Mikrobiyal etki
- Örnek kabı yüzeyine ilaç tutunması
- Üreticiler bazı çözümler uygulamaktadır;
- Tampon çözeltilerin eklenmesi (örnek ve ilacın örnek kollektöründen salınması)
- Koruyucuların eklenmesi (oral sıvıda ilaçların stabilizasyonu)

1.2.3. Maddelerin dedeksiyon süreleri

Maddelerin biyolojik matrislerdeki dedeksiyon süreleri;

- Kullanılan miktar ve kullanım sıklığı
- Metabolik hız
- Vücut kütlesi
- Fiziksel aktivite
- Yaş
- Genel sağlık durumu
- İlaç toleransı
- Vücut sıvısı pH'sına göre değişkenlik göstermektedir.

1.3. Madde Dedeksiyon Teknolojileri ve Uygulamaları: Tarama ve Doğrulama

Kullanılacak analiz tekniği tercih edilirken analizlenecek örnek sayısı, analiz süresi, işlemin maliyeti ve test sonuçlarının ne amaçla kullanılacağı gibi faktörler değerlendirilmelidir. Madde kullanım bozukluklarının tespit edilmesinde hızlı, pratik ve yerinde uygulanabilir olması özellikleri nedeniyle önce tarama testleri ve sonrasında onu izleyen doğrulama testleri gerçekleştirilir. Tarama amacıyla immünoassay teknikler kullanılırken kromatografik teknikler doğrulama yöntemi olarak uygulanmaktadır.

1.3.1. Tarama teknikleri: Moleküler tanıma ve ligand bağlama temelli testler

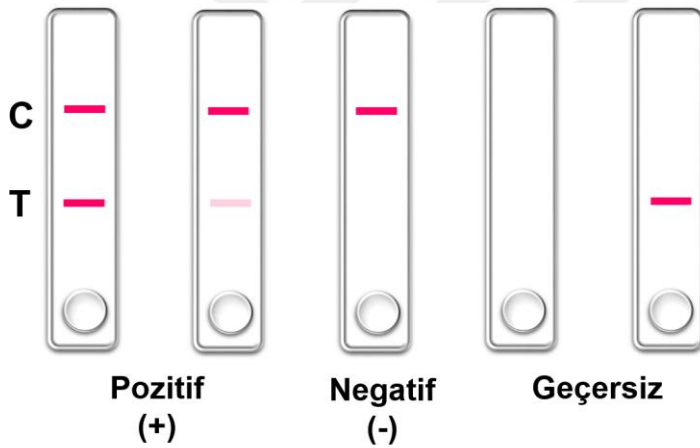
Antijen-antikor etkileşimine dayanan analiz metodu olan immünoassay teknikler; yüksek duyarlık, seçicilik ve hızlı olma özellikleri nedeniyle çok sayıda ve miktarca az numunenin ön işlem gerektirmeden çok kısa sürede analizinin yapılmasını mümkün kılmaktadır. Fakat bu testlerde yanlış pozitif ve yanlış negatif sonuçlarla karşılaşılabilir. Bu nedenle immünoassay testlere uygulanan örnekler sonrasında doğrulamaya gitmektedir. Dolayısıyla immünoassay temelli testler daha çok tarama testi olarak tercih edilmektedir. Hatalı pozitif ve hatalı negatif test yanıtları ile karşılaşılıyor olmasına rağmen bu testlerin çok yaygın bir biçimde kullanılıyor olmasının nedeni çok hızlı ve eş zamanlı bir biçimde çok sayıda numunenin analiz sonuçlarına ulaşılmasına imkan sunmasıdır. Bu sayede kromatografik tekniklere kıyasla kısa sürede çok sayıda örnek değerlendirilebilmektedir (Wong and Tse, 2005).

1.3.1.1. Lateral flow testler

Lateral flow testler (LFA), taşınabilirlik, pratiklik ve hızlı olmaları nedeniyle madde analizi için ideal seçim olarak gösterilmektedir. LFA temelli yerinde uygulanabilen hızlı tarama testleri, kısa süren analiz sonucunda pozitif ya da negatif yanıt alınmasını sağlar. LFA ürünleri 100'den fazla şirketle, POC markette büyük bir paya sahiptir (Syedmoradi et al., 2017).

LFA'ların pazardaki ticari payı yıllar öncesine dayanmaktadır. İlk geliştirildiğinde gebeliğin belirlenmesi ve kötüye kullanımı olan ilaçların tespit edilmesi için kullanılmıştır (Andreotti et al., 2003). Son yıllarda LFA'ların çeşitliliğinde dikkate değer bir artış gözlenmiştir. Hormonlar (gebelik, fertilité, ovulasyon, menapoz, cinsel hastalıklar, tiroid işlevleri), tümör belirteçleri, enfeksiyonel hastalıklar (HIV, Hepatit B ve C), bakteriler (*Streptococcus A* ve *B*, *Chlamydia trachomatis*, *Treponema pallidum*, *Helicobacter pylori* vb.), kardiyak belirteçler, ilaç ve madde tayinine yönelik testler ticari olarak mevcuttur (Verheijen et al., 1998). LFA sistemlerinde analiz edilecek maddenin özelliklerine göre test formatı yani tasarımı ve çalışma prensibi değişmektedir. Eğer tayin edilmesi hedeflenen madde büyük molekül ağırlığına sahip ise (hormonlar, tümör belirteçleri, virüsler, kardiyak belirteçler vb.); yarışmasız test (sandviç test)

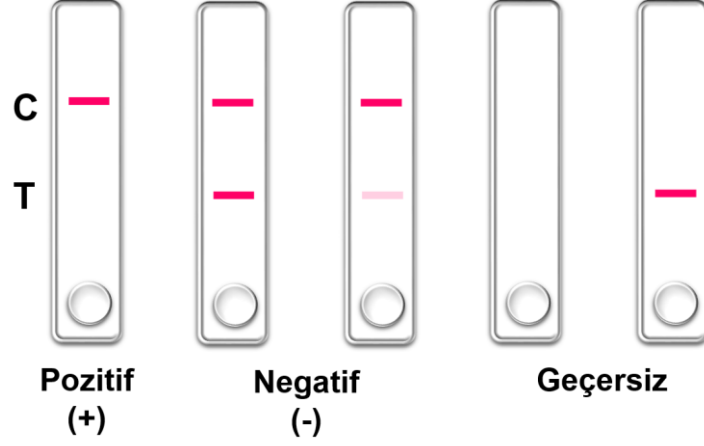
formatı uygulanır. Yarışmasız test formatının çalışma prensibi kısaca açıklanacak olursa; hedef analite spesifik yakalama reaktifi, analitik membrana emdirilir (Test çizgisi). Dedektör konjugat-çoğunlukla antikor ile konjuge edilmiş altın nanopartiküller (AuNP)- “konjugat ped”e emdirilir. Analizi hedeflenen maddeyi içeren örnek (idrar, kan vb.), “örnek uygulama pedi”ne damlatılır ve dedektör konjugatın konjugat petten ayrılmasına ve analitik membran boyunca yürütmesine neden olur. Eğer uygulanan örnekte hedef analit varsa önce dedektör konjugata bağlanır sonra analitik membran üzerindeki analite spesifik yakalama reaktifi tarafından ‘analit-dedektör konjugat kompleksi’ yakalanacaktır. Yani kısaca; uygulanan örnek içerisinde analit varsa test çizgisinde renk oluşumu gözlenecektir. Bu çizgide yakalanmayan konjugatlar ise genel bir yakalayıcı reaktifin immobilizasyonu ile oluşturulan C çizgisinde tutulacaktır (Zhang et al., 2006). Bu çalışma prensibi dikkate alındığında yarışmasız LFA striplerde test sonuçlarının değerlendirilmesi Şekil 1.3’de şematize edilmiştir.



Şekil 1.3 Yarışmasız LFA sonuçlarının değerlendirilmesi.

Diğer test formatı ise düşük molekül ağırlıklı analitler için kullanılır ve yarışmalı LFA olarak adlandırılır. Bağımlılık yapan maddelerin analizlendiği LFA türü bu formatlı testlerdir. Bu tür testlerde, dedektör reaktif; bir proteine bağlı olan analit, lateks veya koloidal metale (genelde koloidal altın) bağlı antikor olabilir. Analizi hedeflenen maddeyi içeren örnek ve dedektör reaktif, analitik membran üzerine immobilize edilmiş yakalama reaktifi bölgesinden (T çizgisi) geçer. Örnekte bulunan analit, sınırlı miktardaki dedektör konjugat antikorlarına bağlanmak için membran üzerine immobilize edilen yakalama reaktifi ile yarışır. Örnekte analit varlığında T çizgisinde bir renk oluşumu gözlenmezken, analit

yokluğunda T çizgisinde renk oluşur. Bu gibi bir yarışmalı immünoassayde analit miktarındaki artış T çizgisinde sinyalde bir azalmaya neden olur (Verheijen et al., 1998). Bu bilgilere dayanarak yarışmalı LFA striplerde sonuçların değerlendirilmesi Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



Şekil 1.4 Yarışmalı LFA sonuçlarının değerlendirilmesi.

Hızlı test imkanı sağlayan LFA teknolojileri günümüzde birçok madde ve belirtecin incelenmesinde rutin olarak kullanılmaktadır. Bu test stripleri az miktarda örnek preparatı gerektirir ve kompleks ekipmanlara ihtiyaç duymaz.

1.3.2. Doğrulama teknikleri: Kromatografik yöntemler

Tarama testlerinden geçirilen ve pozitif sonuç alınan örnekler mutlaka bir doğrulama testi ile analizlenmelidir. Bu amaçla en çok kullanılan yöntemler; LC-MS-MS, GC-MS ve HPLC'dir.

1.4. Test Kitlerinde Kullanılan Sinyal Ajanları

Test kitlerinde sonuçların değerlendirilmesi; optik, elektrokimyasal, akustik ya da magnetik tekniklerin kullanılması sonucu oluşan sinyallerin ölçülmesine dayanır (Jianrong et al., 2004; Bauer et al., 1999). Bunlar arasında optik teknikler, yasadışı maddelerin analizinde oldukça yaygın olarak kullanılmaktadır. Genellikle renk değişimi ya da renk oluşumunun gözle izlenmesi veya bu renk değişiminin optik dedeksiyon teknolojilerinin kullanılmasıyla kantitatif verilere dönüştürülmesi sayesinde test sinyalleri elde edilir. Test kitlerinde sinyal ajanı olarak kullanılan işaretleyiciler ve belirteçlerde olan gelişmeler, dedeksiyon metodolojileri ve aletleri konusundaki ilerlemeleri de beraberinde getirmiştir.

İdeal bir sinyal probunda olması gereken özellikler aşağıda belirtilmiştir;

- Çoklu metot ve dedeksiyon teknolojilerine uyumlu olması dolayısıyla geniş bir kullanım alanına sahip olması.
- Kullanılan konjugasyon kimyasının kolay olması, konjuge edilen biyolojik/kimyasal maddelerin biyolojik/kimyasal bütünlük ve aktivitede herhangi bir bozulmaya neden olmaması.
- Spesifik olmayan bağlanmaların düşük olması ya da hiç gözlenmemesi.
- Farklı sıcaklıklarda ve kimyasal koşullar altında stabil olması.
- Düşük maliyetlerle temin edilebilmeli.
- Prosesin sonraki adımları kolay olmalı.
- Multi-analit dedeksiyonuna imkan sunmalı.
- Teknolojide beklenen ilerlemelere katkıda bulunmalı.

Fakat bir işaretleyici tüm bu karakteristik özellikleri taşımayabilir. Bu durumda aşağıdaki kullanım koşullarına göre seçim yapılır;

- Dedeksiyon ve görüntüleme metodu
- Dedekte edilecek analit türü
- Dedeksiyon aralığı
- Testin uygulanacağı çevre koşulları ve depolama ortamı
- İşaretleyiciye bağlanacak biyolojik ve kimyasal maddeler ve kullanılacak yüzey kimyası, konformasyonda değişikliğe ve sterik engel oluşmasına neden olmamalı
- Kullanılan maddelerin nitelik ve niceliği
- Maliyet
- İleri aşamalarda beklenenler (Wong and Tse, 2008).

Tanı kitlerinde işaretleyici prob olarak kullanılan bazı nanopartiküllere ilişkin bilgiler aşağıdaki başlıklar altında incelenmiştir. Özellikle LFA'lar için optik metotların kullanıldığı çok sayıda çalışma yapılmasına rağmen optik dedeksiyon tekniği basit (Çıplak gözle dedeksiyon) ve etkili (yüksek hassasiyet) olması nedeniyle hala en yaygın kullanılan yöntem olmaya devam etmektedir (Quesada-González and Merkoçi, 2015). Tez projesi kapsamında kullanılan

dedeksiyon tekniklerinin de optik temelli olması nedeniyle bu amaçla kullanılan nanopartiküllere ait bilgilere yer verilmiştir.

1.4.1. Altın nanopartiküller

Altın nanopartiküller (AuNP), altın partiküllerin nanometre boyutlu kolloidal süspansiyonlarıdır. AuNP'ler, ticari LFA'larda bugüne kadar belki de en yaygın kullanılan nanopartiküllerdir (Chandler et al., 2000). Laboratuvarda hazırlanması kolay ve düşük maliyetlidir. Renk yoğunluğu yüksektir ve görünür olması için ekstra bir işlem gerektirmez. Literatürde AuNP'lerin konjugasyon ve uygulamaları için çok sayıda protokol bulunmaktadır. Sıvı ve kuru formda da oldukça stabildir ve membranlar üzerine uygulandıktan sonra da renk verme özelliklerini kaybetmez. Ayrıca kolloidal altının hem konjuge edilmemiş formlarının (işaretleme için uygun) hem de konjuge edilmiş formlarının (biyolojik maddeler ile bağlanmış) çok sayıda ticari ürünü mevcuttur. Dolayısıyla bu ürünlere ulaşmak oldukça kolay ve hızlı olmaktadır (Wong and Tse, 2008).

İlk olarak 1971'de Faulk ve Taylor, immunoelektron mikroskopisi için beyaz fosfor kullanarak indirgeme ile kolloidal altın üretmişlerdir. Daha sonrasında Frens (1973), kontrol edilebilir ve homojen boyutlarda kolloidal altın sentezi için basit sodyum sitrat ile indirgeme metodunu tanımlamıştır. Bu basit yöntemin geliştirilmesi ile birlikte AuNP'lerin kullanım yaygınlığı genişlemiştir. AuNP ve antikör konjugatı, immün tanıma temelli bir diagnostik testte ilk kez 1981'de kullanılmıştır (Leuvering, et al., 1981).

AuNP'lerin üretimi 1-100 nm boyut aralığında gerçekleştirilebilir. Genelde kloroaurik asitin (HAuCl_3) bir stabilizasyon ajanı varlığında indirgenmesi ile sentezlenir. En çok kullanılan sentez yöntemi, trisodyum sülfat varlığında kloroaurik asitin indirgenmesiyle AuNP'lerin sentezidir (Wong and Tse, 2008).

AuNP'lerin LFA ve diğer immün tanıma temelli testlerde çok tercih edilmesinin nedeni aşağıda özetlenmiştir;

- Kolloidal altın inerttir ve mükemmel küresel partiküller oluştururlar.
- AuNP'ler biyomoleküllere yüksek affinite gösterirler ve kolaylıkla fonksiyonelleştirilebilirler.
- Optik özellikleri, AuNP'lerin boyut ve şekillerine bağlıdır.

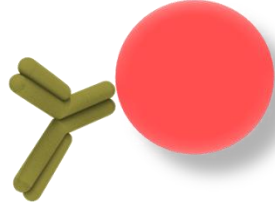
- Partikül boyutları uygun kimyasalların kullanılması ile kolaylıkla ayarlanabilir.
- Çevre dostu sentez adımlarına sahiptir.
- Proteinler ve biyomoleküllere yüksek affinite gösterirler.
- Konjugasyonlara karşı stabilitesi yüksektir.
- Optik özellikleri iyidir dolayısıyla testin hassasiyetini artırır (Sajid, 2015)

AuNP'ler, uygun biyomoleküller (monoklonal/poliklonal antikor, antijen vb.) ile fiziksel adsorpsiyon ya da heterobifonksiyonel çapraz bağlayıcılar ve/veya ara moleküller kullanılarak kovalent bağlanma vb. yöntemler ile konjuge edilebilirler (Şekil 1.5 ve Şekil 1.6).

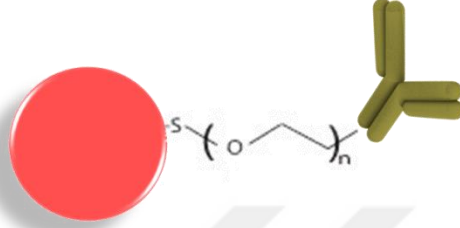
Makromoleküler ligandlar kolloidal altın yüzeyine elektrostatik ve hidrofobik etkileşimlerin kombinasyonu ile adsorplanırlar (Geoghegan and Ackerman, 1977; Geoghegan, 1988). Kolloidal altın ile adsorblanan makromolekül arasındaki uygun miktar sağlandığında yüksek tuz konsantrasyonlarında agregasyona karşı dayanıklıdır. Bu durumdan yararlanarak kolloidal altın yüzeyinin biyomolekül ile uygun ve yeterli şekilde bağlanıp bağlanmadığı test edilebilmektedir.

Kolloidal altınların konjugasyonu sırasında, kolloidal altın ve ligandın pH'sının kontrol edilmesi çok önemlidir. Konjugasyon öncesinde, çözeltilerin pH'sı ligandın izoelektik noktasının biraz üzerindeki bir pH'ya ayarlanmalıdır. Ligandın pKi'sinin altındaki pH'larda ligandın neden olduğu agregasyon meydana gelir ve diğer yandan pKi'nin üzerinde ise ligand ve kolloidal altın arasındaki yük itmeleri adsorpsiyonu kısıtlar. pH değişimleri protein ligantlarını etkilemektedir ve poliglikoller için geçerli değildir. Bu nedenle kolloidal altınları stabilize etmek için polietilenglikoller (PEG) kullanılmaktadır (Wong and Tse, 2008).

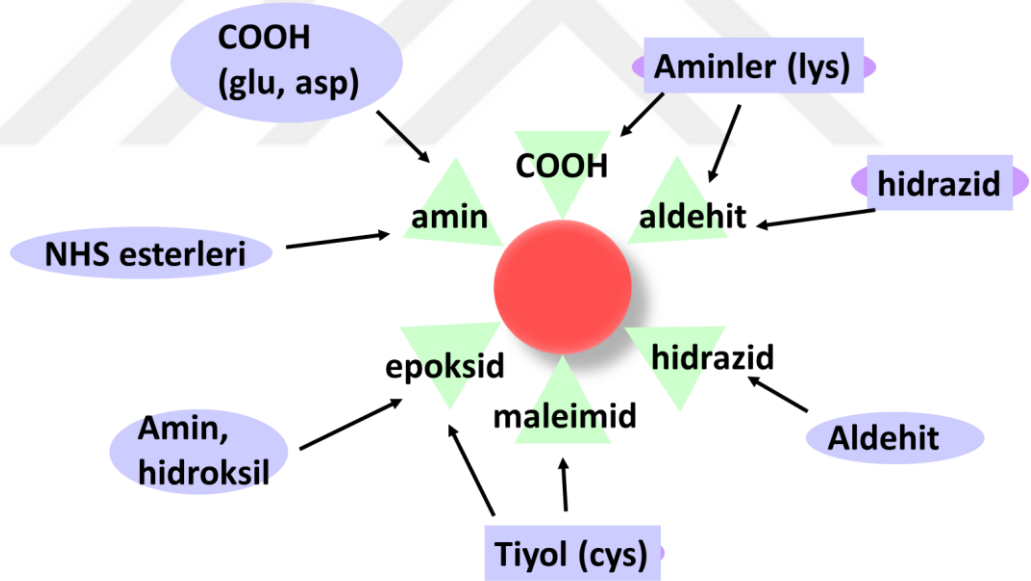
Pasif Protein Konjugasyonu



Kovalent Protein Konjugasyonu



Şekil 1.5 AuNP'lerin konjugasyonu şematik gösterim.



Şekil 1.6 AuNP'lerin kovalent konjugasyonunda kullanılan kimyasal gruplar.

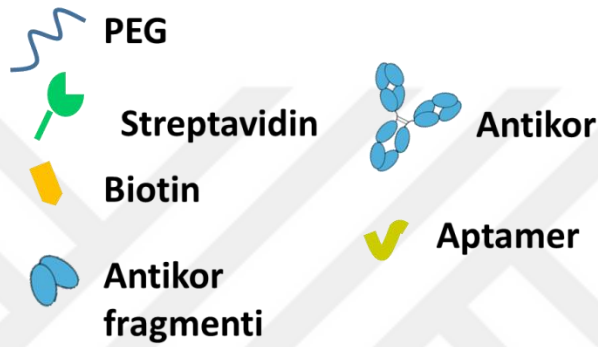
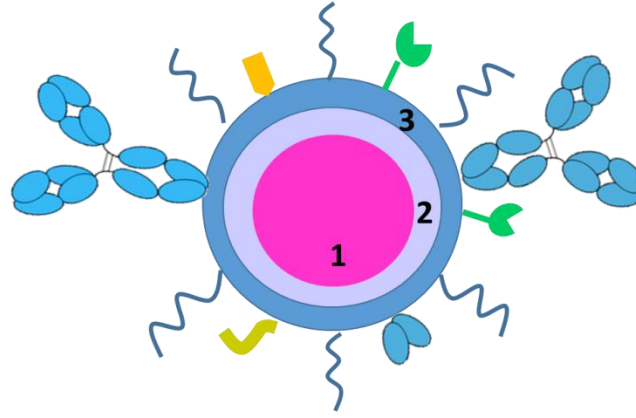
1.4.2. Floresans nanopartiküller

Floresans metotların, absorpsiyon kolorimetrisi temelli metotlarla kıyaslandığında daha yüksek hassasiyet gösterdikleri bilinmektedir (Quesada-González and Merkoçi, 2015). Floresans moleküller LFA'larda ve diğer immünoassay temelli testlerde yaygın olarak kullanılmaktadır ve floresans miktarı

ölçülerek örnekteki analit konsantrasyonu hakkında kantitatif verilere ulaşılabilmektedir. Fakat organik floroforlarda yaşanan en büyük problem fotosönümlenme nedeniyle test hassasiyetinde azalma olmasıdır. Aynı zamanda kimyasal ve metabolik degradasyonlar yaşanan problemlerdir. Özellikle LFA'lar söz konusu olduğunda yüksek fotostabilite ve floresans yoğunluk gerekmektedir (Sajid et al., 2015). Daha önce yürütülen bir çalışmada floresans mikrokürelerin altın kolloidler ile kıyaslandığında *Escherichia coli* O157:H7 tayininde daha iyi hassasiyet gösterdikleri gözlenmiştir (Xie et al., 2014). LFA'lar ve μ -plaka temelli testlere uygulanan ve literatürde iyi tanımlanmış bazı floresans materyallere ilişkin bilgilere aşağıda yer verilmiştir.

1.4.2.1 Kuantum noktalar

Kuantum noktaların (QD) biyosensör sistemlerinde kullanımını rapor eden çok sayıda çalışma vardır. Fakat diğer yandan LFA'lar için yeni bir floresans sınıfıdır (Chan and Nie, 1998; Murphy and Coffey, 2002). QD'ler CdSe, CdS, ZnSe, InP ya da InAs'lerden oluşan nanokristaller ya da yarı iletken nanokristallerdir. Nanomalzeme alanındaki güncel gelişmeler, eşsiz elektriksel ve optik özellikler sergileyen QD'lerin üretimini ve uygulamalarını ön plana çıkartmıştır. Bu yarı iletken partiküller hem suda çözünür özelliklidirler hem de yakın boyutlara sahip olmaları nedeniyle biyomoleküllerle kolaylıkla bir araya getirilebilirler (Şekil 1.7). QD'ler taşıdıkları benzersiz optik özellikleri sayesinde organik floresans boyaların yerini almaya başlamıştır. AuNP'ler gibi QD'lerin de optik özellikleri boyuta bağlı olarak değişmektedir ve geniş dalga boyu spektrumuna sahiptirler. Farklı boyutlardaki QD'eri uyarmak için tek bir ışık kaynağı yeterlidir. Yüksek foto stabiliteye ve absorpsiyon katsayısına sahiptirler (Chan et al., 2002). İnorganik doğaları nedeniyle metabolik degradasyon için düşük risk oluştururlar bu nedenle floresans özelliklerini hücrelerin içinde ve insan vücudunda koruyabilirler (Jaiswal and Simon, 2004). AuNP'lerle kıyaslandığında uygulamalarını kısıtlayan bir neden QD-biyomolekül komplekslerinin oluşturulmasının zor olmasıdır (Costa-Fernandez et al., 2006). Ayrıca toksisiteleri ayrı bir tartışma konusudur (Shiohara et al., 2004).



Şekil 1. 7 QD'lerin biyomateryallerle modifikasyonu. (1) Floresans çekirdek (Genellikle CdSe ya da CdTe); (2) Koruyucu kabuk (Genellikle ZnS); (3) Kolloidal stabiliteyi sağlamak ya da biyoaktif moleküllerin bağlanması için fonksiyonel yüzey oluşturmak için polimer kaplama.

QD'lerin tercih edilmesini etkileyen bazı karakteristik özellikleri aşağıda belirtilmiştir;

- Kuantum verimleri sayesinde yüksek floresans göstermeleri.
- Fotosönümlenmeye karşı dayanıklı olmaları.
- Dar bir bant emisyon spektrumunda kolloidal süspansiyonlarının üretilebilmesi.
- Üretimleri sırasında, farklı renklerde emisyon floresansları elde etmek için QD çaplarının seçilebilir olması. Aynı zamanda nanokristal kompozisyonunun değiştirilmesi ile de renk çeşitliliğini sağlamak mümkündür. (Örneğin; CdS mavi ışık yayarken InP kırmızı yaymaktadır.) (Rosenthal, 2001; Han, 2002)
- QD'ler ultraviyole (UV) bölgeye kadar uzanan geniş absorpsiyon bantlarına sahiptirler. QD'lerin emisyon dalga boyu temelde eksitasyon dalga boyundan bağımsızdır, dolayısıyla görünür spektrum dalga

boylarında dar emisyon bant genişliğine sahip QD'ler tek bir eksitasyon dalga boyu, spektrumun dalga boyu parçası veya kaynak tarafından uyarılabilirler.

- QD'ler ticari olarak kolaylıkla temin edilebilmektedirler.

QD'lerin tüm bu özellikleri göz önünde bulundurulduğunda sensör sistemlerine entegrasyonlarının ne kadar kritik avantajlar sağlayacakları oldukça açıktır. QD'lerin farklı emisyon dalga boylarında ışımalar yapıyor olması sayesinde çok renli (multi-color) testlerin tasarımı gündeme gelmiştir. Örneğin; farklı analitleri tanıyan antikolar farklı emisyon dalga boylarında floresans özelliği olan QD'ler ile işaretlenebilir ve böylece tek bir test platformunda farklı maddelerin analizi eş zamanlı olarak gerçekleştirilebilir (Chan et al., 2002; Lambert and Fisher, 2006). Tüm bu umut verici özellikler nedeniyle biyosensör teknolojilerini temel alan daha çok sayıda araştırma çalışmasında ya da ticari ürünlerde QD'lerin karşımıza çıkacağı söylenebilir.

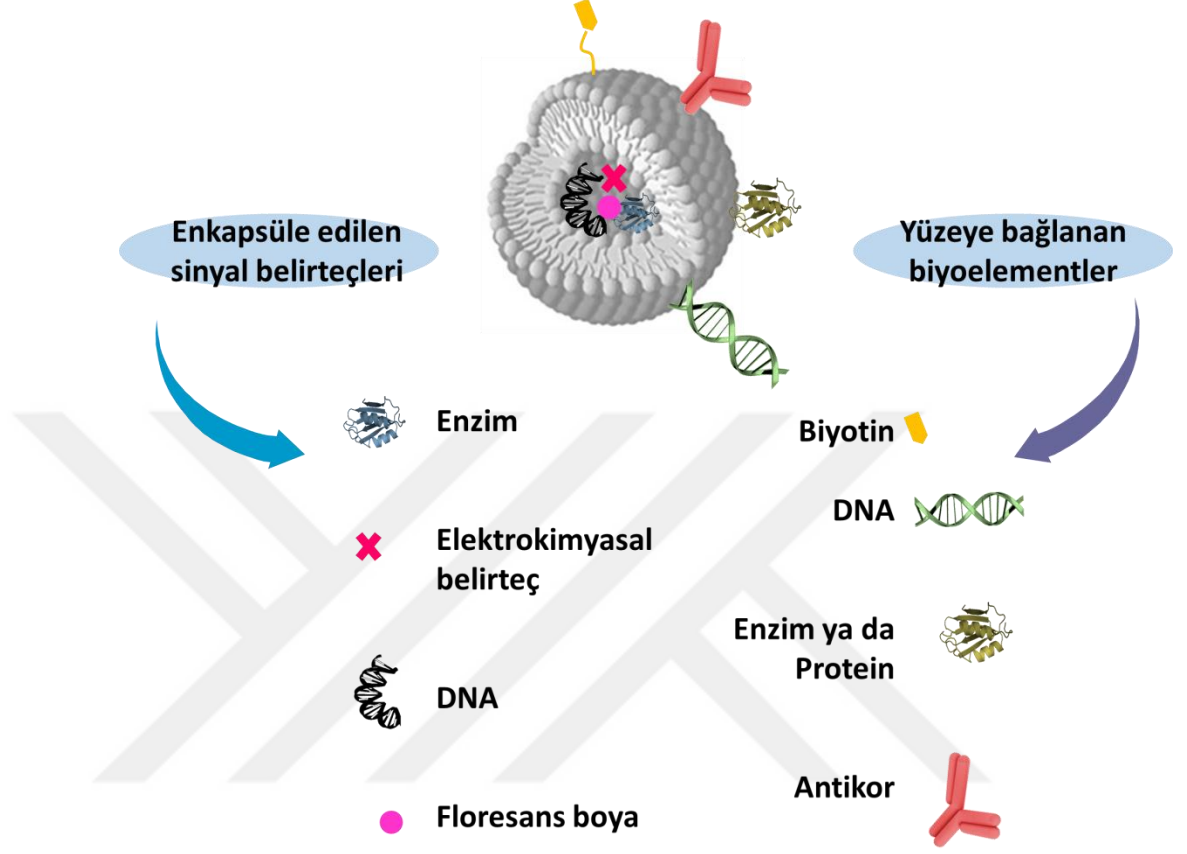
1.4.3. Diğer nanopartiküller

1.4.3.1 Lipozomlar

Lipozomlar lipid tabakasından oluşan veziküler yapılardır. Lipozomlar floresans ya da floresans olmayan boyaları enkapsüle etmek için kullanılabilir (Edwards and Baeumner, 2006; Khreich et al., 2008). Lipozomların LFA'larda kullanımını gösteren farklı çalışmalar bulunmaktadır ve bu çalışmalar lipozomlar içerisine yüklenen yüksek miktarlardaki boyalar sayesinde test hassasiyetinin yüksek olduğu sonuçlar elde edildiğini rapor etmiştir (Ho and Wauchope, 2002; Baeumner et al., 2004a, 2004b; Wen et al., 2005; Edwards and Baeumner, 2006; Ho et al., 2008; Khreich et al., 2008; Shukla et al., 2011; Leem et al., 2014).

Kullanılan dedeksiyon metoduna ve hedeflenen test hassasiyetine bağlı olarak 50nm'den 800 nm boyutlarında lipozomlar sentezlenebilir ve içerisine görünür boyalar, floresans boyalar, enzimler ya da elektroaktif bileşikler kolaylıkla enkapsüle edilebilir (Şekil 1.8). Lipoproteinler, glikolipidler ve diğer çeşitli lipid içeren bileşikler doğrudan lipid tabakasına katılabilir. Ayrıca lipid yüzeyi üzerinde yoğunluğu ayarlanabilecek şekilde kimyasal olarak aktif gruplar

oluşturulabilir ve bu gruplar sayesinde biyolojik ya da kimyasal maddelerin kovalent konjugasyonu sağlanabilmektedir (Şekil 1.8) (Edwards and Baeumner, 2006).



Şekil 1. 8 Biyosensör uygulamalarında lipozom tasarımı.

Lipozomlar, içine enkapsüle edilmiş materyali salması için lizise uğratılabilir. Örneğin; elektroaktif bir bileşik enkapsüle edilmiş bir lipozom uygun surfaktanlarla lizise uğratıldığında enkapsülant dışarı salınır, elektriksel potansiyelin uygulanacağı küçük bir alanda dedekte edilebilir elektrik akımı oluşabilir.

Lipozomların olumsuz yanlarından biri stabilitelerinin kısmen düşük olması ve surfaktanlar tarafından lizise uğrama yatkınlıklarıdır. Bu bir problem olarak görülse de ticari lipozom temin eden firmalar 36 ay stabilite gösterdiklerini öne sürmektedirler. Diğer bir dezavantaj ise lipozomların kurutulması ve yeniden oluşturulması ile ilgili az miktarda literatür bulunması ve dolayısıyla yapısında lipozom bulunduran “tek-adımlı” testlerin üretimi zorlaşmaktadır. Bu zorluk

nedeniyle lipozomlarla çalışan ticari testler sıvı reaktifler şeklindedir ve LFA formatında değildir (Wong and Tse, 2008).

1.4.3.2 Karbon temelli materyaller

Tanı kitlerinin ve diğer biyosensör teknolojilerinin dedeksiyon limitlerinin düşürülmesi bu alanda çalışan bilim insanlarının amacı olmuştur. Bu nedenle dedeksiyon limiti ile doğrudan ilişkili olan sinyal problemlerinin iyileştirilmesi ya da alternatiflerinin geliştirilmesi her zaman çalışma konuları arasında gelmektedir. Karbon nanopartiküller (CNP) sinyal probu olarak kullanılabilir alternatif nanomateryal sınıfıdır. Özellikle *in vitro* tanı kitleri sınıfında önemli bir yere sahip LFA'larda kullanımlarının bu testler açısından iyi bir alternatif olarak gösterilmektedir (Quesada-González and Merkoçi, 2015). Daha önce rapor edilen bir çalışmada, AuNP'lerle tasarlanan LFA'lara kıyasla, CNP'lerle hazırlanan LFA'ların dedeksiyon limitlerinin 10 kat daha düşük olduğu belirtilmiştir (Linares et al., 2012). CNP'ler oldukça koyu renkli nanopartiküllerdir ve dolayısıyla AuNP'lere kıyasla arkaplan rengine olan kontrastları daha yüksektir. LFA'larda test çizgisinde oluşan kontrast, testin duyarlılığı, çalışma aralığı ve dedeksiyon limitini etkileyen önemli bir faktördür ve kontrastın yüksek olması tüm bu parametrelerin iyileştirilmesine yardımcı olur. Ayrıca koloidal karbon kısmen düşük maliyetlidir ve büyük ölçeklerde üretimi kolaydır. Düşük ya da yüksek moleküler ağırlıklı analitlerin dedeksiyonu için çok sayıda biyomolekül ile kolaylıkla modifiye edilebilirler. Düzensiz şekilli büyük partiküllerin varlığı ve proteinler ya da biyomoleküllerin adsorpsiyonunda spesifik olmayan etkileşimlerin olması koloidal karbonlarla yaşanan en büyük problemlerdendir (Quesada-González and Merkoçi, 2015; Posthuma-Trumpie et al., 2012).

Karbon nanotüplerin (CNT) de biyosensör sistemlerinde kullanımı söz konusudur. CNT'ler büyük moleküller olduğu için LFA'larda kullanıldıklarında onları yavaş yanıt veren testlere çevirir. Diğer yandan AuNP'lere kıyasla dedeksiyon limitlerini iyileştirdikleri rapor edilmiştir (Qiu et al., 2015). Ayrıca CNT'ler süreye bağlı olarak stabil olmaları ve agregasyona karşı dayanıklı olmalarının bir sonucu olarak konjugatların yarı ömrünü de arttırlar (Quesada-González and Merkoçi, 2015).

1.4.3.3 Renkli nanopartiküller

Selenyum nanopartiküller (Wang et al., 2014), koyu kahverengi renkleri ve manyetik özellikleri ile manyetik nanopartiküller (Liu et al., 2011), boyut ve şekline bağlı olarak farklı renkleri olan gümüş nanopartiküller (Yen et al., 2015) ve platin nanopartiküller (Park et al., 2015) LFA'larda ve diğer sensör platformlarında kullanılabilecek her biri kendi avantaj ve dezavantajlarını barındıran alternatif nanomateryallerdir.

1.5. Test Kitlerinde Kullanılan Biyotanıyıcı Moleküller

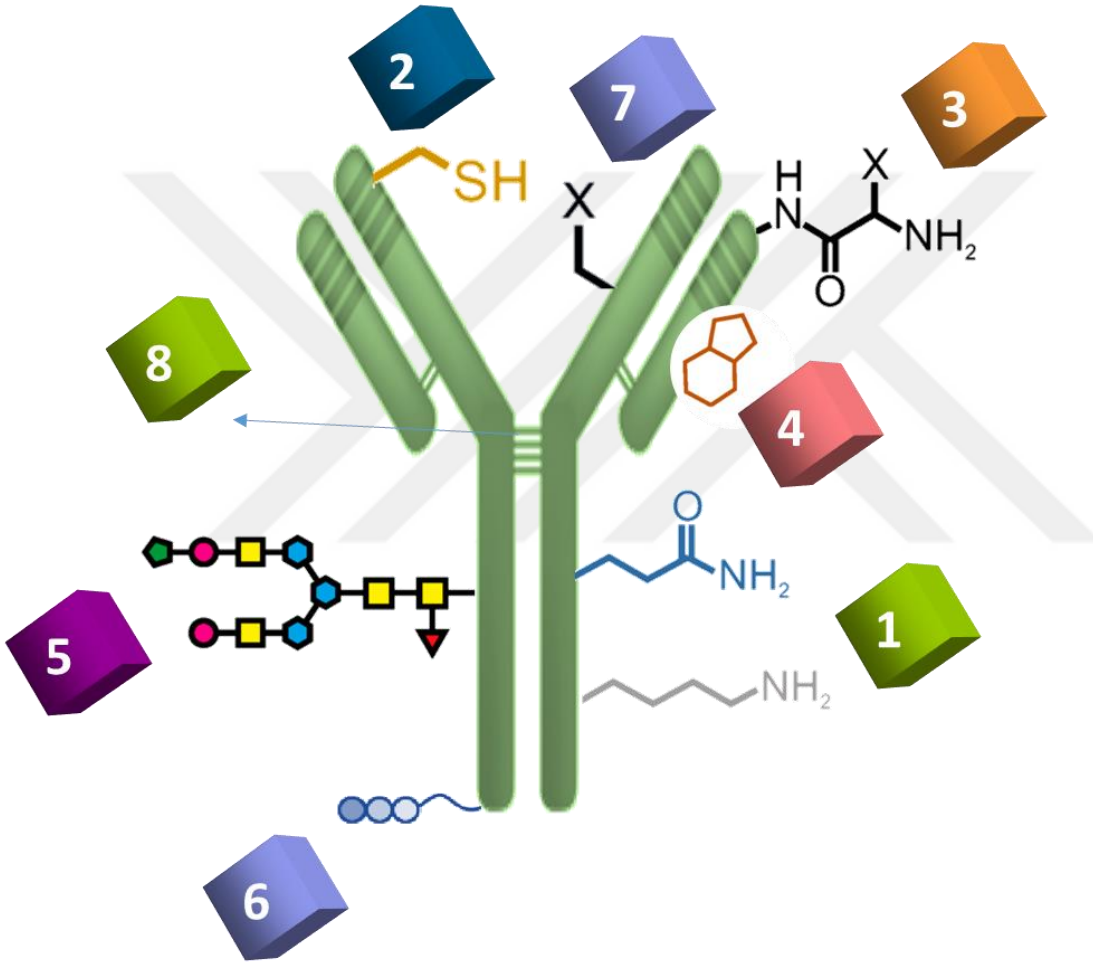
1.5.1. Antikorlar

Antikorlar antijenlerine olan yüksek spesifiklikleri ve güçlü affiniteleri sayesinde ideal biyotanıyıcı materyallerdir. Antikorlar, üretim aşamalarının bir sonucu olarak poliklonal (Kendall, 2007; Leenaars and Hendriksen, 2005), monoklonal (Leenaars and Hendriksen, 2005; Sheehan, 2007) ve rekombinant (Hoogenboom, 2005; Daly et al., 2002) antikorlar olarak sınıflandırılabilirler. Diagnostik alanında monoklonal ve poliklonal antikorların biyosensör sistemlerine başarılı bir şekilde uygulandığını gösteren çok sayıda çalışma vardır (Mosiello et al., 2003; Zhuo et al., 2008; Halámek et al., 2005; Bulukin et al., 2007).

Poliklonal antikorlar çoklu plazma hücrelerinden elde edilmektedirler. Monoklonal antikorlar ise tek bir klonal hibridomadan türevlendirilir (Palmer, 1999; Kendall, 2007). Rekombinant antikorlar, antikor genlerinin genetik manipülasyonu sonucu elde edilirler. Biyosensör uygulamalarında antikorların kullanılmasında bazı anahtar parametreler şu şekildedir;

- Duyarlılık (Hassasiyet)
- Seçimlilik (Selektivite)
- İmmobilizasyon (Yüzey üzerinde oryantasyon)
- İşaretleme
- Antikor boyutu (Sensör yüzeyinin yoğunluğunu etkiler)

Rekombinant antikorlar bu faktörlerin optimize edilmesine imkan sunarlar. Genetik modifikasyonlar sonucu, antikorların seçicilik, stabilite, boyut ve efektif immobilizasyonları açısından iyileşme ve gelişmeler sağlanmaktadır. Uygun konjugasyon kimyalarının kullanımı ve/veya genetik eklemeler ile yeni rekombinant antikorların oryantasyonu ve immobilizasyonunun ayarlanması mümkün olmaktadır. Antikorların boyut ve affinitelerinde değişiklik yapılabilmesi diagnostik ve terapötik amaçlarla yeni kullanımlarının önünü açmıştır (Conroy, 2009).



Şekil 1.9 Antikor konjugatlarının oluşturulduğu fonksiyonel gruplar.

Antikorlar kendi doğal yapıları gereği ya da protein mühendisliği uygulamalarının bir sonucu olarak farklı materyallerle konjugasyonlara çok açıktır. Çok sayıda fonksiyonel grup içerirler veya fonksiyonelleştirilebilirler. Şekil 1.9 antikor konjugatları hazırlanırken kullanılan fonksiyonel grupları göstermektedir. Şekil 1.9'da numaralandırılan grupların açıklamaları aşağıda verilmiştir;

- (1) Doğal aminoasitler
- (2) Sisteinler
- (3) N-terminal
- (4) Nükleotid bağlama bölgesi
- (5) Karbohidrat kısmı
- (6) Protein mühendisliği ile eklenmiş kuyruklar
- (7) Doğal olmayan aminoasitler
- (8) Zincirler arası disülfidler

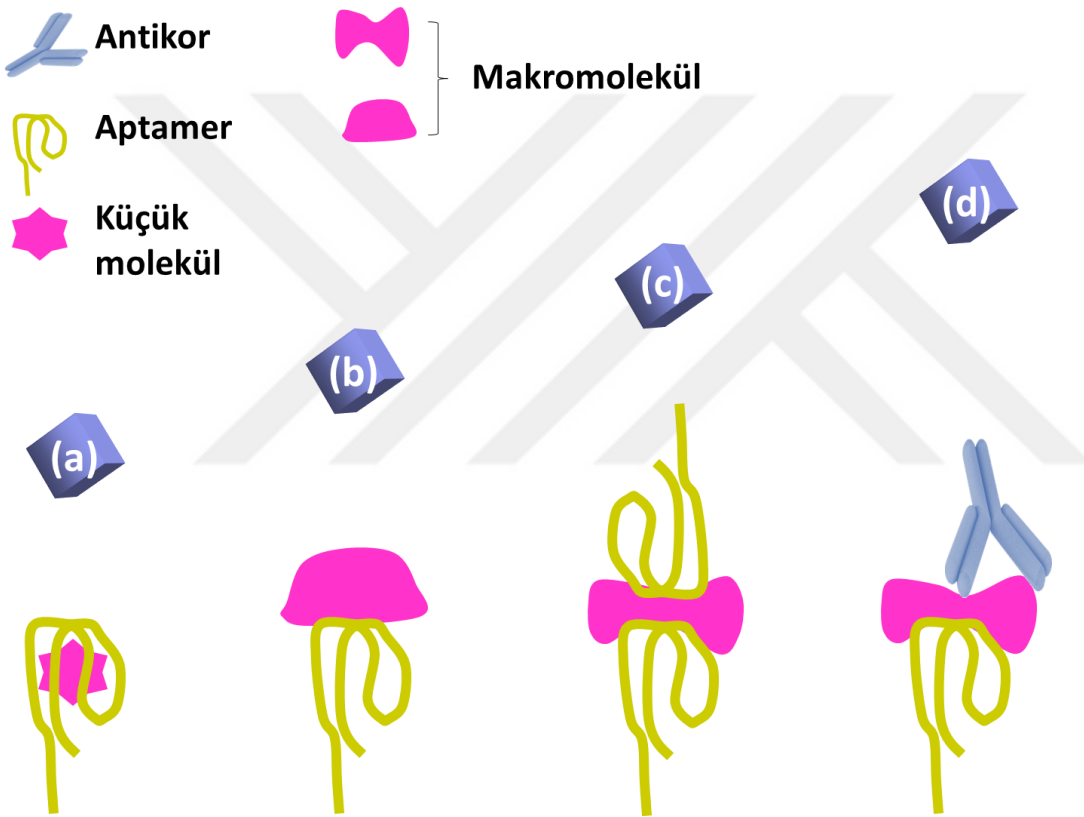
1.5.2. Aptamerler

Güncel çalışmalarda sensör tasarımında tanıyıcı biyomolekül olarak aptamerlerin kullanılması oldukça ilgi çekici konular olarak karşımıza çıkmaktadır (Toh et al., 2015). Aptamerler ilk defa 1990 yılında tanımlanan yapay nükleik asit ligandlarıdır ve hedefe spesifik olarak üretilirler. Aptamerler; çok küçük moleküllerden hücresel kofaktörler, organik boyalar, antibiyotikler, diğer ilaçlar, peptidler, proteinler, virüsler, sporlar ve aynı zamanda tüm hücrelere spesifik olarak hedeflenebilirler. Sentezleri için eksponansiyel zenginleştirme ile ligandların seçimli evrimi (Selective Evolution of Ligands by Exponential enrichment; SELEX) olarak adlandırılan özel bir teknik kullanılmaktadır (Szeitner et al., 2014). Aptamerlerin DNA ya da RNA dizilerine ve antikora kıyasla daha avantajlı olarak gösterilmelerinin nedenleri şöyle özetlenebilir:

- Aptamerler daha uzun ömürlüdürler ve proteinlere kıyasla geri dönüşümsüz denatürasyonla daha az karşılaşılır.
- Tekrarlı dondurma-çözme işlemlerine daha dayanıklıdırlar.
- Antikorlardan daha spesifiklerdir (Munoz-Berbel et al., 2008; Fowler et al., 2008).

Aptamerler; terapötik amaçlı, sensörlerde tanıyıcı molekül ve proteinlerin saflaştırılması gibi çok farklı alanlarda kullanılabilirler. Aptamerlerin uygun bir dedeksiyon sistemi ile kombinasyonu sonucu hazırlanan aptasensörler analitlerin spesifik ve hızlı bir şekilde belirlenmesine olanak sağlarlar (Bang et al., 2005). Antijen-antikor etkileşimlerini temel alan immunoassaylerde biyo-tanım için kullanılan yaklaşımlar aptamer temelli sistemlere de adapte edilebilirler. Dizayn edilen sistemlerdeki tanımanın temel olarak 2 farklı formatta gerçekleştiği

söylenbilir: 1) Tek taraflı bağlanma ve 2) Çift taraflı bağlanmadır. Tanıma modları her bir aptamerin hedefi ile oluşturduğu çifte bağlı olmaktadır. Nükleer manyetik rezonans (NMR) çalışmaları küçük moleküllerle bağlanmanın tek taraflı format ile gerçekleşirken bir ikinci molekülün bağlanabilmesi için de küçük bir boşluğun oluştuğunu göstermektedir (Şekil 1.10). Ancak proteinler gibi çok daha büyük moleküllerle etkileşim gerçekleştiği zaman; yapısal uyum, elektrostatik etkileşimler ve hidrojen bağlarının oluşumu gibi çeşitli parametreler bu durumu etkilemektedir. Bazı durumlarda ikinci bir aptamer ya da antikor kullanılarak sandviç tip formatta analiz yapılabilmektedir (Song et al., 2008). (Şekil 1.10)



Şekil 1.10 Aptamer temelli sistemlerde kullanılan formatlar a) Hedef olan küçük molekülün aptamerin yapısında bulunan bağlanma bölgesine girmesi, b) Tek taraflı format, c) Çift taraflı (sandviç) formatı ile iki aptamerin kullanıldığı bağlanma, d) Sandviç formatında aptamer ve antikorun birlikte kullanılması.

2. MATERYAL VE METOT

2.1. Materyal

Tez projesi yürütülürken kullanılan kimyasal malzemeler ve temin edildikleri firmalara ilişkin bilgiler aşağıda verilmiştir.

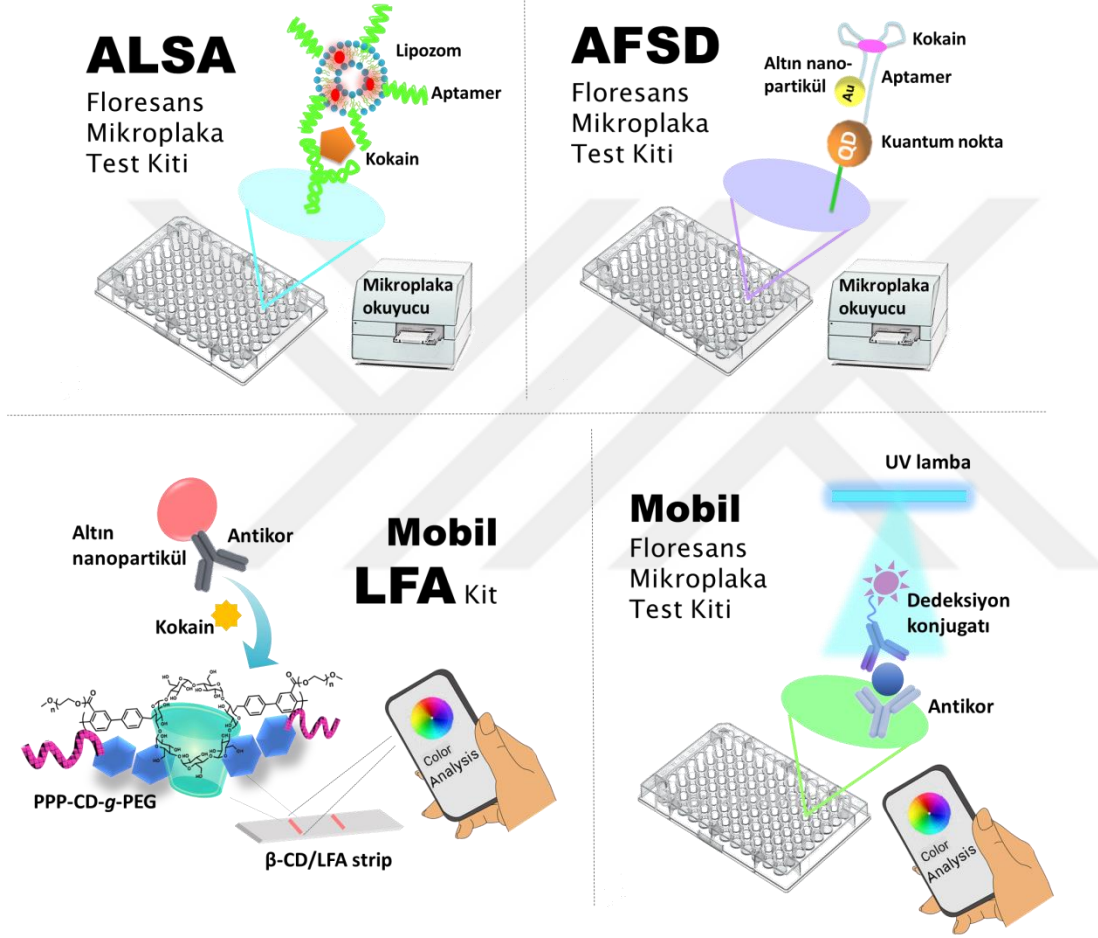
1,2- dimiristoil-sn-glisero-3- fosfokolin (DMPC), fosfatidiletanolamin (PE) ve kolesterol Avanti Polar Lipids firmasından Texas Red® 1,2-Dihekzadekanoil-sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin, Trietilamonyum Tuzu (Texas Red® DHPE) Molecular Probs firmasından temin edilmiştir. 5'-C₆-NH₂-AGACAAGGAAAATCCTTCAATGAAGTGGGTCG-SH₂-3' dizisine sahip kokain aptameri Metabion firmasından satın alınmıştır. Sulfo- SMCC (sulfosuccinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate) Thermo Scientific'ten alınmıştır. Benzoilekgonin (BE), kokain ve metamfetamin (MET) standartları Cerilliant'tan satın alınmıştır. Altın nanopartiküller (AuNP) Cytodiagnosics'ten temin edilmiştir. N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC), N-hidroksisüksinimid (NHS) ve Tween 20 Sigma-Aldrich firmasından satın alınmıştır. Karboksil fonksiyonel CdSe/ZnS kuantum noktalar (QD) Life Technologies'ten temin edilmiştir. Poli-L-lisin kaplı 96-kuyucuklu μ -plakalar BD BioCoat (San Diego, CA, USA) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan diğer tüm kimyasal malzemeler analitik saflıktadır.

2.2. Kullanılan Cihaz ve Sistemler

Lipozom sentezi için rotary evaporator (Büchi R3) ve extruder düzeneği (Avanti Polr Lipids) kullanılmıştır. Konjugatların hazırlanmasında mini termal çalkalayıcı (Biosan TS-100C Thermo Shaker) ve soğutmalı santrifüj (Hettich) kullanılmıştır. Konjugatların karakterizasyonunda partikül boyutu ölçüm cihazı (Dynamic Light Scattering (DLS), Malvern Nano ZS), mikroplaka okuyucu (Thermo Scientific) ve floresans mikroskop (Olympus) kullanılmıştır. LFA'ların tasarımında dispenser (IsoFlow Dispenser, Imogene Technology) ve membran kesici (A-Point Guillotine cutter) kullanılmıştır. Geliştirilen test kitlerinin doğrulanmasına yönelik çalışmalarda ise yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) (Agilent) kullanılmıştır.

2.3. Metot

Tez projesi kapsamında model olarak seçilen yasadışı maddelerin dedeksiyonuna yönelik farklı metodolojik yaklaşımlarla test kitleri tasarlandı. Tasarımı yapılan test kitlerinde farklı ölçüm teknikleri dolayısıyla farklı sinyal ajanları ve yüzey kimyası kullanılmıştır. Tüm bu testleri birbirinden ayıran ve tez projesinde uygulanan özellikler Şekil 2.1’de şematize edilmiştir ve Çizelge 2.1’de açıklanmıştır.



Şekil 2.1 Geliştirilen test kitlerine ait özelliklerin şematik gösterimi.

Çizelge 2. 1 Geliştirilen test kitlelerine ilişkin özelliklerin özeti.

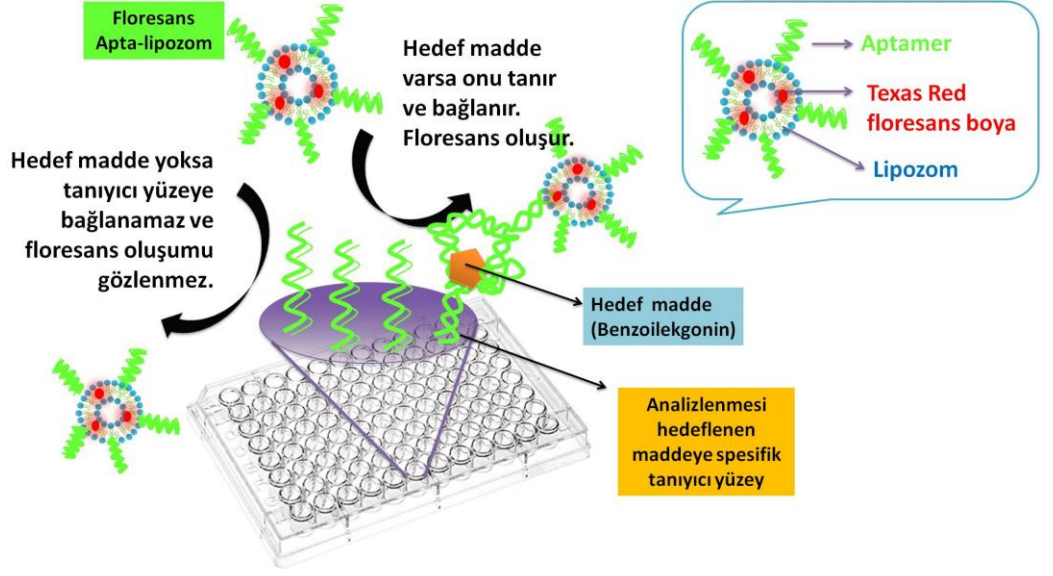
Testin kısa adı	Testin açıklaması	Dedekte edilen madde	Sinyal Ölçümü ve Ölçüm prensibi	Sinyal ajarı	Sinyal ajarı dışında kalan diğer test bileşenleri
ALSA Floresans Mikroplaka Test Kiti	Apta-Lipozom Sandviç Testi (Apta-Liposome Sandwich Assay)	Kokain ve metaboliti Benzoilekgonin (BE)	Floresans mikroplaka okuyucu (Floresans ölçüm)	Floresans nanomateryal (Floresans lipozomlar)	-96 kuyucuklu mikro plakalar -Kokain aptameri
AFSD Floresans Mikroplaka Test Kiti	Aptamer katlanmasına dayanan sensör platformu (Aptamer Folding based Sensory Platform)	Kokain ve metaboliti BE	Floresans mikroplaka okuyucu (Floresans ölçüm)	Floresans nanomateryal (QD)	-96 kuyucuklu mikro plakalar -Kokain aptameri -AuNP
Mobil LFA Kit (β -CD/LFA)	Cep telefonu uygulamasıyla çalışan lateral flow test. β -siklodekstrin temelli lateral flow test (β - cyclodextrin based lateral flow test)	Kokain	Cep telefonu (Test ve kontrol çizgilerinde gözle görülebilir sinyal oluşması ve oluşan renk şiddetinin ölçülmesi)	AuNP	-Test membranları - β -CD içeren polimer
Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti	Cep telefonu uygulamasıyla çalışan mikroplaka temelli floresans test	Kokain ve metamfetamin (MET)	Cep telefonu (Cep telefonu ile renk şiddeti ölçülmesi)	Floresans nanomateryal (Fluorescein isothiocyanate (FITC) ve QD)	-96 kuyucuklu mikro plakalar -Antikorlar

2.4. ALSA Floresans Mikroplaka Test Kitinin Tasarımına Yönelik Çalışmalar

Tez projesinin bu kısmında; kötüye kullanılan maddelerin tespitinde kullanılacak yeni aptamer ve nanoparçacık temelli bir test platformunun geliştirilmesi üzerine çalışmalar yapılmıştır. Proje dahilinde, hedef molekül olarak

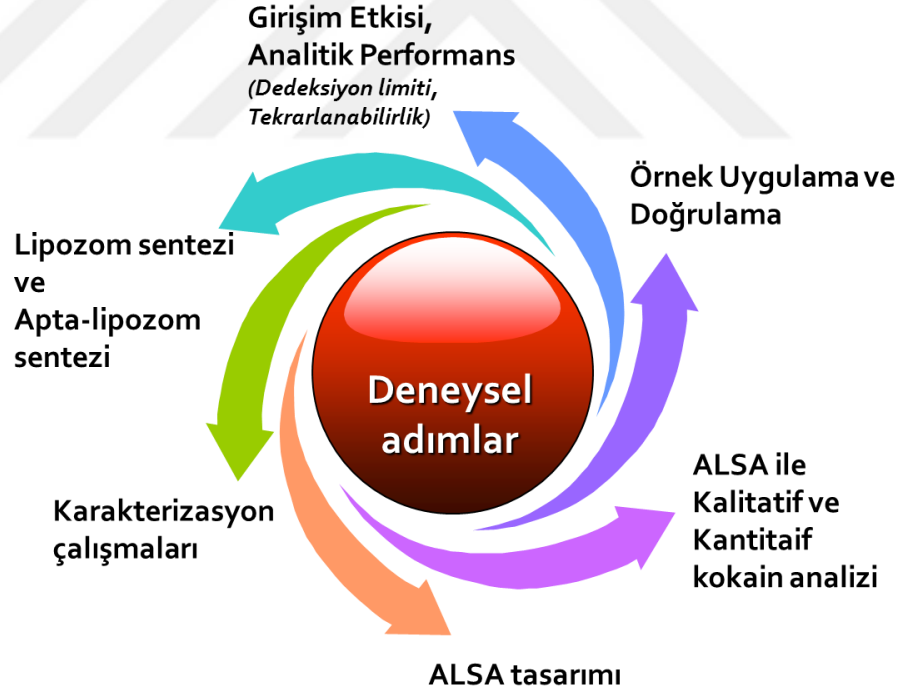
seçilen kokainin tespitine yönelik olarak tasarlanan test sistemi ELISA benzeri bir prensiple çalışmaktadır. Kokain kullanıldıktan sonra karaciğer ve plazmada bulunan kolinesteraz enzimi ile yıkılır ve idrarla atılan çözünen metabolitler oluşur. Çok az bir kısmı da değişime uğramadan idrarla atılır. İdrarla ve diğer vücut sıvıları ile atılan temel metaboliti BE'dir. Dolayısıyla kokain kullanımının belirlenmesi için, vücuttan atılım metaboliti olan BE tespitine gereksinim duyulmaktadır. Proje kapsamında kokain kullanımının tespitine yönelik olarak geliştirilen analiz sistemi; BE tayini için tasarlanmıştır ve bundan sonraki basamaklar bu metabolitin analizi için anlatılacaktır. Kokain analizi için geliştirilen proje çıktısı test sistemi 'Apta-Lipozom Sandviç Testi ('Apta-Liposome Sandwich Assay', ALSA)' olarak adlandırılmıştır ve bu test sisteminin tasarım adımları aşağıdaki gibidir (Şekil 2.2);

- 96 kuyucuklu plaka yüzeyleri kokaine (ve metaboliti BE) spesifik aptamer ile modifiye edilmiştir.
- Aptamer modifiye yüzeylerin üzerine ticari olarak temin edilen BE standartları eklenmiştir.
- Sonrasında ortama yine analizlediğimiz örneğe spesifik aptamer ile modifiye edilmiş floresans özellikli lipozom nano vezikülleri (Apta-lipozom) eklenmiştir.
- 96 kuyucuklu plakanın yüzeyinde bulunan aptamerlere BE bağlanırken, BE ile de floresans lipozomların bağlanması sayesinde madde miktarına paralel olarak floresans bir sinyal oluşmaktadır.
- Test sistemi de bu oluşan floresans sinyalin ölçülmesi ile hem kantitatif hem de kalitatif sonuçlar vermektedir.



Şekil 2.2 Tez projesinde tasarlanan ALSA'nın çalışma prensibinin şematik gösterimi.

ALSA test kiti tasarlanırken ve çalışma performansı araştırılırken izlenen deneysel adımlar Şekil 2.3' de belirtilmiştir.

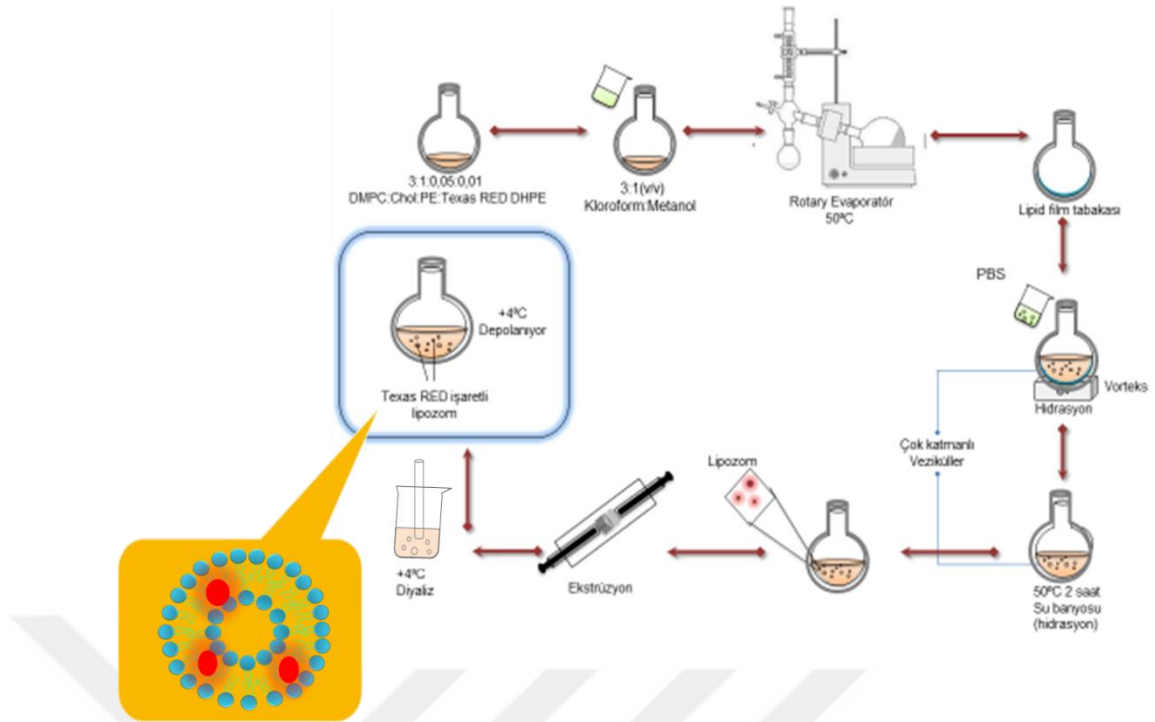


Şekil 2.3 ALSA test kitinin tasarımındaki deneysel adımlar.

2.4.1. Lipozom sentezi

Lipozomlar ince film hidrasyon tekniğine göre hazırlanmıştır. İlk olarak 3:1:0,05:0,01 oranında DMPC:Chol:PE:Texas RED DHPE (1,2-dimiristoil-sn-

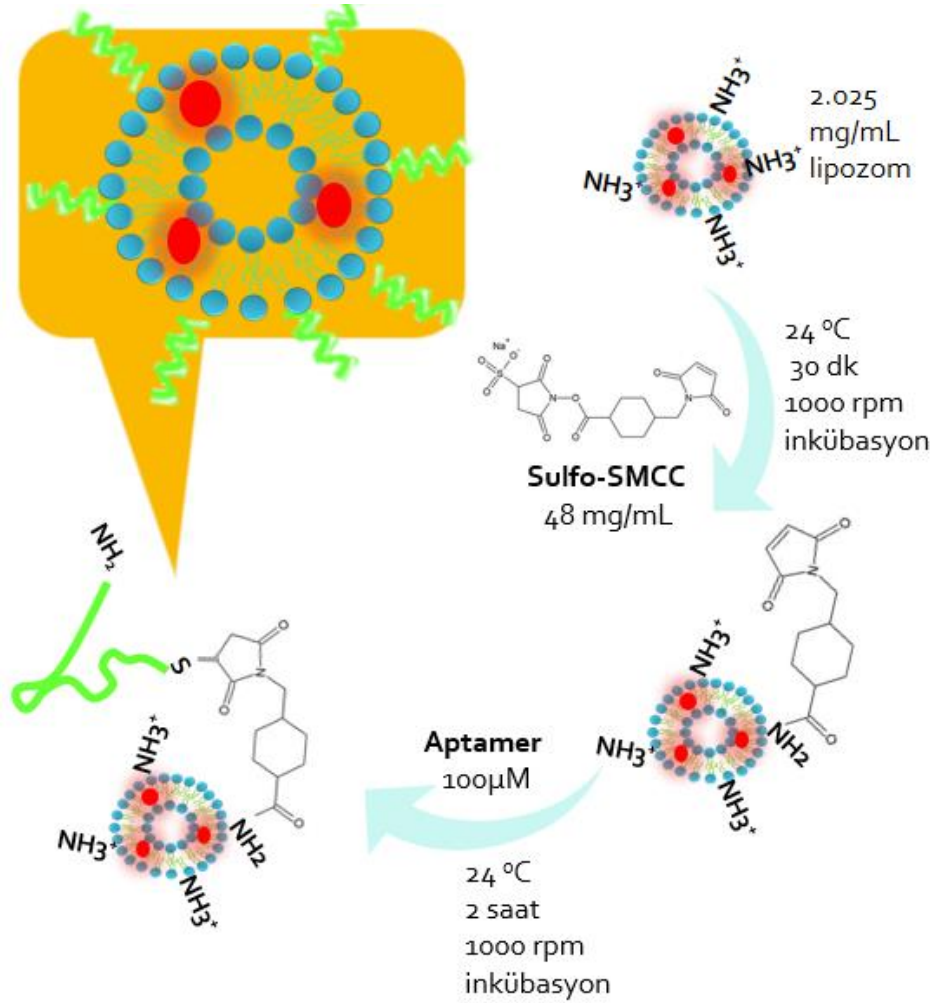
glisero-3-fosfokolin : Kolesterol : Fosfatidiletanolamin : Texas Red® 1,2-Dihekzadekanoil-sn-Glisero-3-Fosfoetanolamin, Trietilamonyum Tuzu) yuvarlak dipli balona eklenmiştir. 3:1 (v/v) oranında kloroform:metanol karışımında bulunan yukarıda oranları verilen kolesterol ve lipid karışımı rotay evaporatörde 50 °C’de vakum altında organik çözümler tamamen uzaklaşmaya kadar işleme bırakılmıştır. Organik çözümler uçurulduktan sonra yuvarlak dipli balonda kalan kısım lipid film tabakasıdır. Sonrasında lipid film tabakası üzerine pH’sı 7,4 olan PBS tamponu eklenerek balon uygun hızda bir süre vortekslenmiştir. Bu sayede çok katmanlı veziküller (MLVs) oluşur. Oluşan lipozomlar su banyosunda iki saat boyunca hafif çalkalama altında 50 °C’de hidrasyonun gerçekleşmesi amacı ile bırakılır. Enkapsüle etmek istediğimiz materyal, hidrofilik karakterde ise lipozom sentezi sırasında hidrasyon aşamasında eklenmelidir. Eğer hidrofobik karakterde ise film tabakası oluşturulmadan önce lipidlerle birlikte eklenmelidir. Böylece hidrofobik maddeler, lipozomun membranında yer alırken; hidrofilik maddeler ise vezikülün içinde yer alır. Texas Red floresans boyası, DHPE lipidine bağlı formda olduğu için lipozomun hidrofobik kısım olan membran kısmında yer almaktadır. İki saatlik hidrasyon işleminden sonra lipozomlar Hamilton şırıngalarına alınarak ekstrüzyon işlemine başlanmıştır. 80 nm por çaplı polikarbonat membranlar kullanılarak çok katmanlı veziküller tek katmanlı vezikül şeklini alırken aynı zamanda veziküllerin boyutları da küçülür (~ 80 nm). Aynı örnek on bir kez ekstrüzyon işleminden geçirilmiştir. Elde edilen lipozom vezikülleri gece boyu +4 °C’de diyalize bırakıldı. Serbest halde bulunan maddeler (yapıya katılmayan lipid molekülleri) bu aşamada PBS tampon çözeltisine geçerken geriye sadece lipozom örnekleri kalır. Diyaliz sonrasında elde edilen lipozomlar sonraki aşamalarda (Apta-lipozom sentezi) kullanılmak üzere +4 °C’de depolanmıştır (Şekil 2.4).



Şekil 2.4 Lipozom sentezinin şematik gösterimi

2.4.2. Apta-lipozom sentezi

Bu basamakta, bir önceki adımda sentezlenen floresans lipozomlar kokain aptameri ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla sulfosuksinimidil 4-(N-maleimidometil)sikloheksan-1-karboksilat (sulfo-SMCC) reaktifi kullanılarak lipozomların yapısında bulunan PE lipidinin amino grupları ile aptamerin sülfür grupları arasında kovalent bağ oluşturulmuştur (Şekil 2.5). İşlem adımları şu şekildedir; total lipid konsantrasyonu 2.025 mg/mL lipozom örneğinin 1,0 mL'si için 40 µL (48 mg/mL) sulfo-SMCC reaktifi eklenerek 24 °C'de 30 dakika 1000 rpm'de inkübasyona bırakıldı. Bu basamakta lipozomun amino grupları reaksiyon için aktif hale getirilmiş olur. İnkübasyon sonrasında örneğe 25 µL aptamer (100µM, suda) eklenip tekrar 24 °C'de 2 saat inkübasyona bırakıldı. Bağlanmayan aptameri uzaklaştırmak için gece boyu diyalize bırakıldı.



Şekil 2.5 Apta-lipozom sentezinin şematik gösterimi.

2.4.3. Karakterizasyon çalışmaları

2.4.3.1. Partikül boyutu analizi

Sentez adımları önceki bölümlerde anlatılan lipozomların hem aptamer modifikasyonu öncesinde hem de sonrasında partikül boyutları ve yüzey zeta potansiyelleri ölçüldü. Bu amaçla Dynamic light scattering (DLS) (Partikül boyutu ölçüm cihazı) kullanıldı. Bunun için +4 °C de tutulan örneklerden 50 μL alınarak saf su ile 1,0 mL'ye tamamlandı ve üç tekrarlı ölçümler alındı.

2.4.3.2. Floresans ölçümler

Sentezlenen Apta-lipozomlar içeriğinde bulunan Texas Red işaretli lipid sayesinde floresans özelliğe sahiptir. Proje kapsamında geliştirilmesi hedeflenen kokain biyodetektörü floresans ölçüm temellidir ve sentezlenen Apta-lipozomlar

floresans ölçümlerin yapılabilmesinde kullanılacak işaretleyici görevi görmektedir. Bu basamakta ise, sentezlenen floresans lipozomların hangi konsantrasyonlarında dedekte edilebilir olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle farklı seyreltmelerde hazırlanan lipozom örnekleri Mikroplaka okuyucu ile uygun eksitasyon (ex) ve emisyon (em) aralığında taranmıştır. Texas Red floresans boyası için Ex/Em : ~595/615 nm'dir.

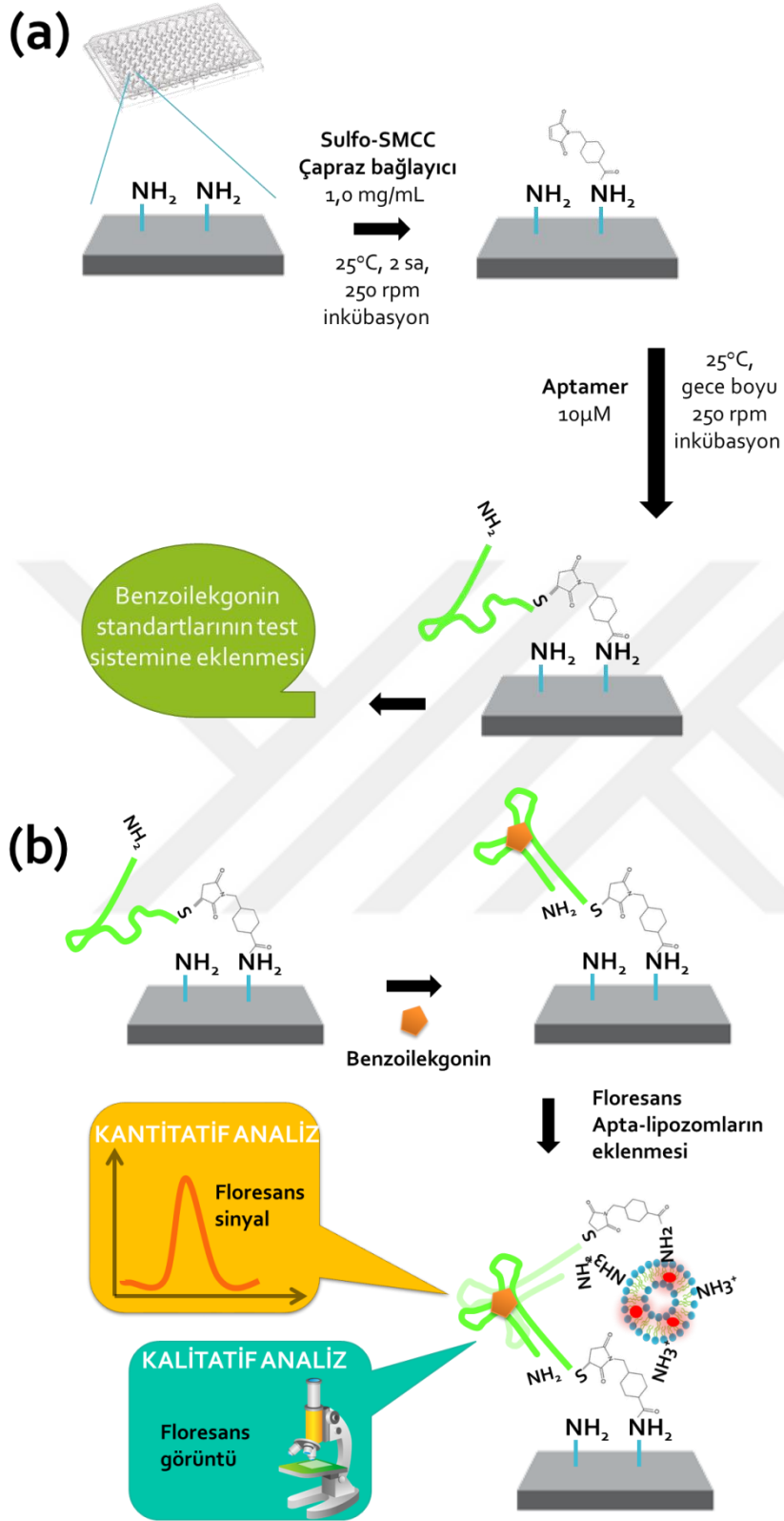
2.4.4. ALSA tasarımı

Kötüye kullanılan maddelerin en yaygın kullanılanlarından biri olan kokainin idrar, tükürük gibi fizyolojik sıvılarda, ekonomik ve hızlı, güvenilir sonuç veren yöntemler (tanı kitleri) ile analizlenmesini sağlayabilecek nanoparçacık temelli test sistemi olan ALSA'nın tasarımına ilişkin deneysel aşamalar aşağıdaki gibidir.

Poli-L-lizin kaplı 96 kuyucuklu plakaların (96-well plate) yüzeyleri, kokain ve kokain metabolitini (BE) tanıyıcı aptamer ile modifiye edildi. Bunu için lizin aminoasitlerinin amino grupları ile aptamerin tiyol grubu arasında sulfo-SMCC çapraz bağlayıcısı kullanılarak kovalent bağ oluşturuldu (Şekil 2.6 (a)).

İlk olarak plakadaki her kuyucuğa 50 µL sulfo-SMCC (1,0 mg/mL suda) eklendi ve 2 saat 250 rpm'de 25°C'de inkübasyona bırakıldı. Süre sonunda etkileşmeyen reaktifi uzaklaştırmak için yüzey sodyum fosfat tamponu (10 mM pH 7,4) ile 2 kez yıkandı ve kuyucuklara 50 µL aptamer (10µM) eklendi. Gece boyu 25°C'de inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından yüzey 3 defa sodyum fosfat tamponu (10 mM pH 7,4) ile yıkandı.

Ticari olarak temin edilen sertifikalı yasadışı madde standartları farklı konsantrasyonlarda hazırlandı ve test sistemine uygulandı. Bu doğrultuda, aptamer kaplı her kuyucuğa 0,5-50 µM aralığında değişen konsantrasyonlarda 75 µL kokain metaboliti (BE) eklendi, 30 dakika 25 °C'de inkübasyona bırakıldı. Daha sonra 2 kez sodyum fosfat tamponu (10mM pH7,4) ile yıkandı. Yıkanan yüzeye 100 µL Apta-lipozom örneklerinden eklendi, 30 dakika oda sıcaklığında reaksiyona bırakıldı. Daha sonra 96 kuyucuklu plakadaki örnekler kokainin hem kalitatif hem de kantitatif analizi için kullanıldı (Şekil 2.6 (b)).



Şekil 2.6 a) ALSA tasarımı ve b) ALSA ile kokain/BE analizinin şematik gösterimi.

2.4.5. ALSA ile kantitatif madde analizi

Test sistemi tasarlandıktan sonra BE'nin kantitatif analizi için; mikropilaka okuyucu ile Apta-lipozomların floresans yoğunluğu ölçülerek standart grafik çizildi.

2.4.6. ALSA ile kalitatif madde analizi

Test sistemi tasarlandıktan sonra plakalardaki kuyucuklar floresans mikroskop yardımıyla görüntülendi. Görüntüler hem kör hem de BE içeren kuyucuklar için alındı. Bu aşamada, BE miktarıyla ilgili veri elde edilmezken analizlenen örnekte BE var mı yok mu şeklinde sonuç elde edilmektedir. Aynı zamanda standart katma ile hazırlanmış sentetik idrar ve sentetik tükürük örnekleri için de floresans görüntüler alındı.

Diğer yandan floresans mikroskop görüntülerine ilave olarak, artan konsantrasyonlarda kokain ve BE örnekleri uygulanan 96 kuyucuklu plakaların UV lamba altında görüntüleri alındı. Böylece sistemin, ekstra ekipman ve cihaz gereksinimini ortadan kaldıran basit bir UV lamba kullanılarak da kokainin kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla kullanılabileceği gösterildi.

2.4.7. Örnek uygulama ve test sisteminin doğrulanması

Laboratuvarda hazırlanan sentetik tükürük ve sentetik idrara BE standardı katılarak ALSA ile analizlendi. Böylece geliştirilen yeni test sisteminin biyolojik sıvılarda da doğru çalışıp çalışmadığı araştırıldı.

Test sisteminin doğrulanması için, standart katma ile hazırlanan sentetik idrar ve sentetik tükürük örnekleri HPLC ile de analizlendi. Her iki metotla aynı örnek için elde edilen sonuçlar kıyaslandı. Böylece geliştirilen sistemin başarılı bir şekilde çalışıp çalışmadığı değerlendirildi.

2.5. AFSD Floresans Mikropilaka Test Kitinin Tasarımına Yönelik Çalışmalar

Aptamer katlanmasına dayanan sensör platformu ('An Aptamer Folding based Sensory Platform' AFSD') olarak adlandırılan mikro-kuyucuk temelli kokain testine ilişkin bilgiler aşağıdaki gibidir (Guler et al., 2017a);

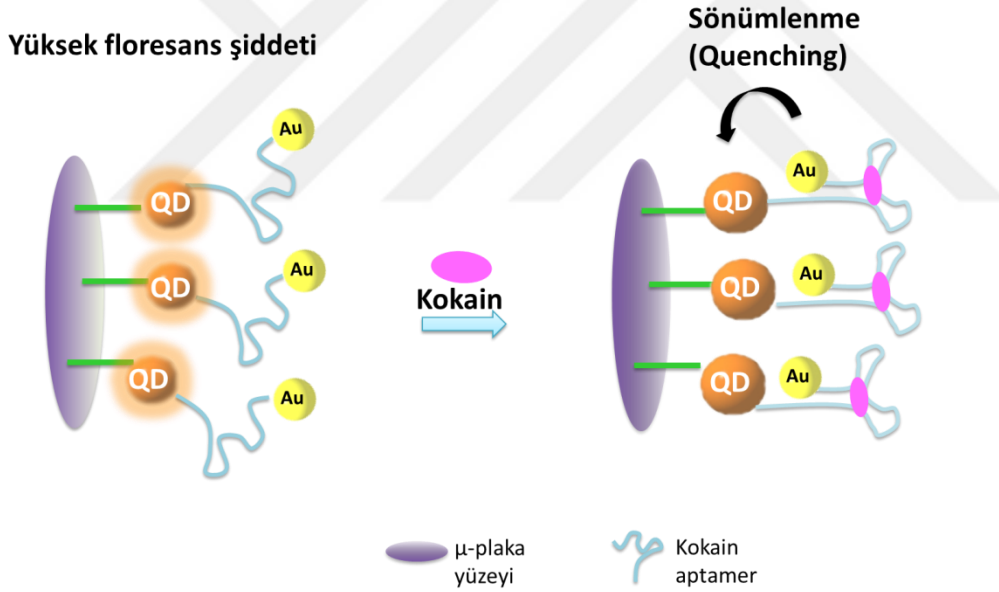
- 96-kuyucuklu plakanın kuyucuklarının yüzeylerinde bulunan poli-L-lizinden kaynaklanan fonksiyonel gruplar kullanılarak, QD'ler kovalent yöntem olan EDC/NHS kimyası kullanılarak yüzey modifikasyonları gerçekleştirilmiştir.

- Taniyıcı biyomolekül olan aptamer ile AuNP'ler modifiye edilmiştir.

- Laboratuvarda hazırlanan sentetik idrara, ticari olarak temin edilen sertifikalı yasa dışı madde standartları katılarak ve eklenen madde konsantrasyonuna bağlı sinyal değişimleri bir mikroluka okuyucu ile belirlenmiştir.

- Tasarlanan biyo-analiz kitinin, kromatografik yöntemlerle doğrulanması gerçekleştirilmiştir.

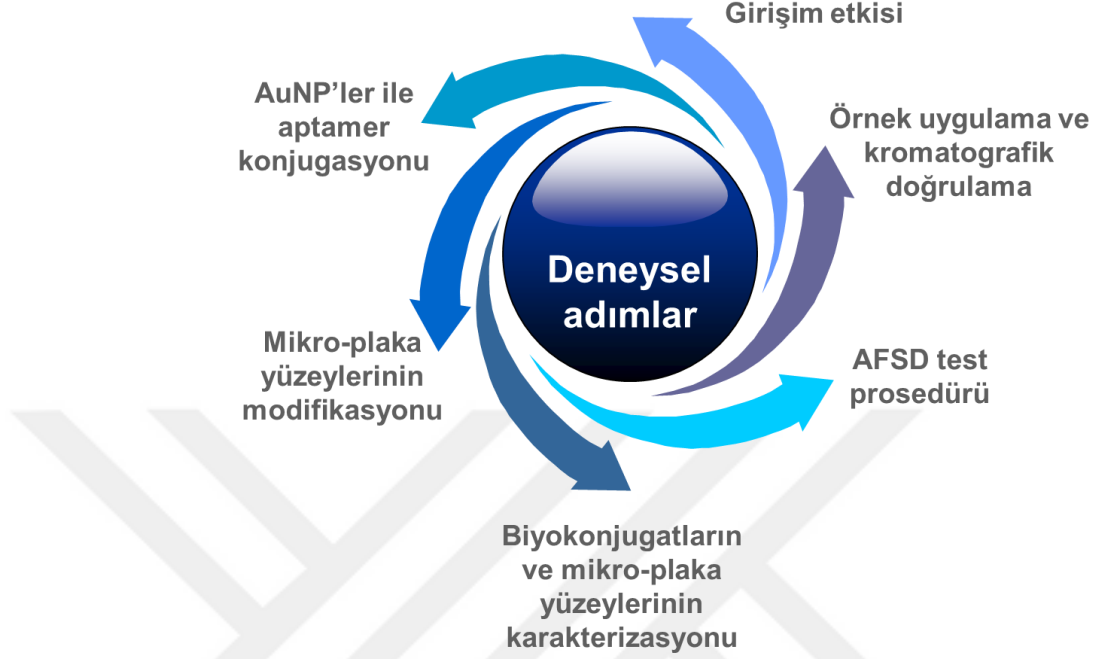
- Son olarak, hazırlanan biyo-analiz kitinde, pozitif sonuç verme potansiyeli olan bazı maddelerin girişim etkisi araştırılmıştır.



Şekil 2.7 AFSD test sisteminin şematik gösterimi.

Geliştirilen test sistemi AFSD'nin çalışma prensibi Şekil 2.6'da verilmiştir. Sırasıyla, QD'ler, onun ucunda aptamer, aptamerin ucunda da AuNP bulunan μ -well yüzeyine, kokain eklendiğinde, aptamer kokain bağlanması nedeniyle konformasyon değiştirir yani katlanır. Aptamerin şekilsel değişimi nedeniyle ucunda bulunan AuNP, yüzeyde bulunan QD'ye yaklaşır ve AuNP'ler QD'nin quencher ı (sönümleyicisi) olduğundan, floresansta azalma meydana gelir. Floresans sinyalde azalma, kokain konsantrasyonuna paraleldir ve böylece test

sistemi kullanılarak dedekte edilebilir sinyaller elde edilmiştir. Bu test kitinin tasarımı ve çalışma performansının değerlendirilebilmesi için yürütülen çalışmaların temel başlıkları Şekil 2.8’de verilmiştir.



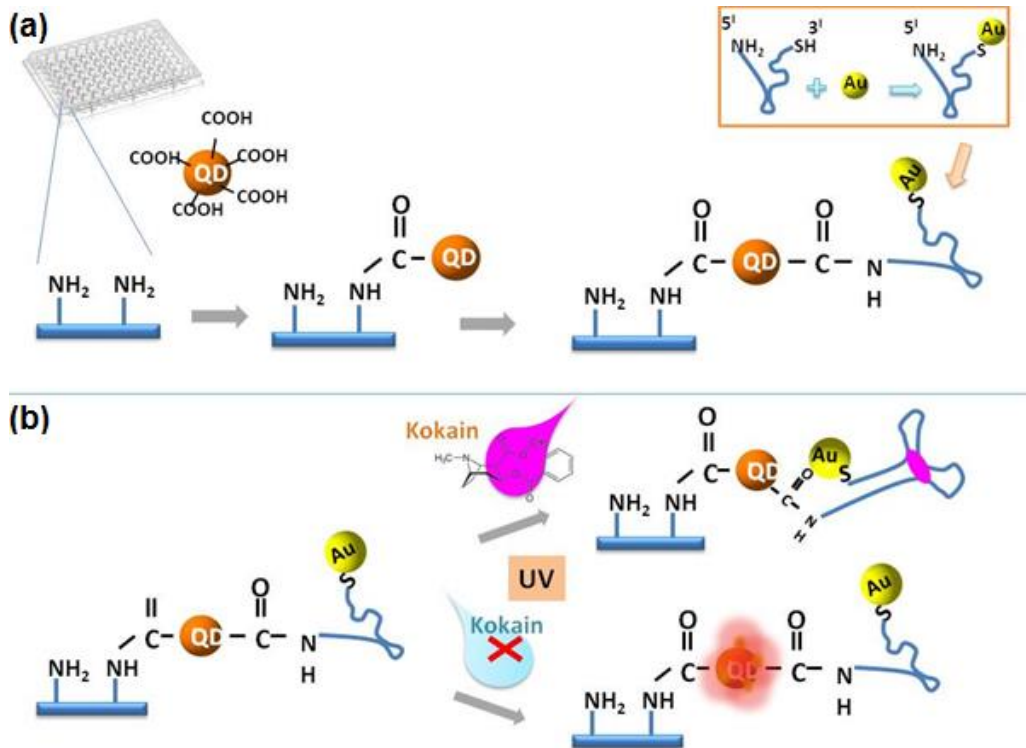
Şekil 2.8 AFSD test kiti tasarımında yürütülen deneysel adımlar.

2.5.1. AuNP'lerin aptamer ile konjugasyonu

AuNP'lerin kokain aptameri ile konjugasyonu (Apt-AuNP) daha önce rapor edilen bir çalışmanın modifiye edilmesi ile gerçekleştirilmiştir (Xu et al., 2011). İlk olarak 100 μ L AuNP ve 1,80 mg/mL Tween 20 içeren 100 μ L sodyum fosfat tamponu (10mM pH 7,4) ile 40 dk boyunca 1000 rpm'de inkübe edildi. İnkübasyon süresinin sonunda santrifüj işlemi ile fazla Tween 20 uzaklaştırıldı. Santrifüj sonrasında kalan AuNP pelleti üzerine 100 μ M, 25 μ L kokain aptameri eklendi ve son hacim 1,0 mL'ye ayarlandı. Elde edilen karışım, kokain aptameri ve AuNP'ler arasında Au-SH bağı elde etmek için 3 saat, 25 °C'de 1000 rpm karıştırma altında inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında Apt-AuNP çözeltisi sodyum fosfat tamponuna (10 mM, pH 7,4) karşı diyalize (12-14 kDa) bırakıldı. Sonrasında elde edilen Apt-AuNP konjugatlarının DLS cihazı ile partikül boyutu karakterizasyonları tamamlandı. DLS ölçümleri için 100 μ L örnek 1,0 mL'ye saf su ile seyreltilti. Örneklerin hem partikül boyutu hem de zeta potansiyeli ölçüldü.

2.5.2. μ -plaka yüzeylerinin tasarımı

Floresans kokain tayini için uygun yüzey modifikasyonunu sağlamak amacıyla ticari olarak satılan poli-L-lisin kaplı 96-kuyucuklu μ -plakalar kullanıldı. 0,5 M N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC), 0,125 M N-hidroksisüksinimid (NHS) ve suda çözünür -COOH fonksiyonel QD'ler MES tamponunda (25 mM, pH 6) ayrı ayrı çözüldü. Her kuyucuğa 100 μ L QD, 40 μ L EDC ve NHS eklendi ve 3 saat boyunca 1000 rpm karıştırma altında oda sıcaklığında ışıktan koruyarak inkübe edildi. Reaksiyona katılmayan QD'leri uzaklaştırmak amacıyla 2 kez sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) ile yıkandı (Demirkol and Timur, 2016). Modifikasyonun ikinci aşamasında, her kuyucuğa Apt-AuNP konjugatları (60 μ L) eklendi. EDC ile aktive edilmiş QD yüzeyleri, aptamerin -NH₂ uçları ile bağ yapması için reaksiyona bırakıldı. İnkübasyon süresi dolduğunda her kuyucuk sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) ile yıkandı. Poli-L-lizin, QD ve Apt-AuNP arasında kovalent bağ ile oluşturulan yüzey, kokain ve metaboliti BE dedeksiyonu için kullanıldı. AFSD test sisteminin tasarımını gösteren şema Şekil 2.9 (a)'da verilmiştir.



Şekil 2.9 a) AFSD tasarımı ve b) AFSD ile kokain/BE analizinin şematik gösterimi.

2.5.3. AFSD test prosedürü

AFSD olarak adlandırılan madde dedeksiyon sisteminin adım adım modifikasyonu sonrasında floresans taramaları yapıldı. Floresans ölçümler QD'lere ait eksitasyon/emisyon (400 nm/655 nm) piklerinde gerçekleştirildi. İlk olarak kokain ya da kokain metaboliti olan BE her bir kuyucuğa 100 µL olacak şekilde eklendi ve 30 dk inkübe edildi. Sonrasında sodyum fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) ile yıkandı. Floresans sinyallerin hesaplanmasında Apt-AuNP içeren yüzeylerin floresans şiddeti ile örnek eklendikten sonra ölçülen floresans şiddeti arasındaki fark kullanıldı. Özetle her kuyucuk için emisyon piklerindeki azalma test yanıtı olarak kullanıldı. AFSD test sisteminin çalışma prensibini gösteren şema Şekil 2.9 (b)'de verilmiştir.

2.5.4. Örnek uygulama ve kromatografik doğrulama

Son olarak, kokain ve BE standart katma ile hazırlanan sentetik idrar örnekleri AFSD test sistemine uygulandı ve aynı örnekler Agilent marka HPLC ile DAD dedektör (Santa Clara, CA, USA) ve Eclipse XDB-C18 kolon kullanılarak analiz edildi.

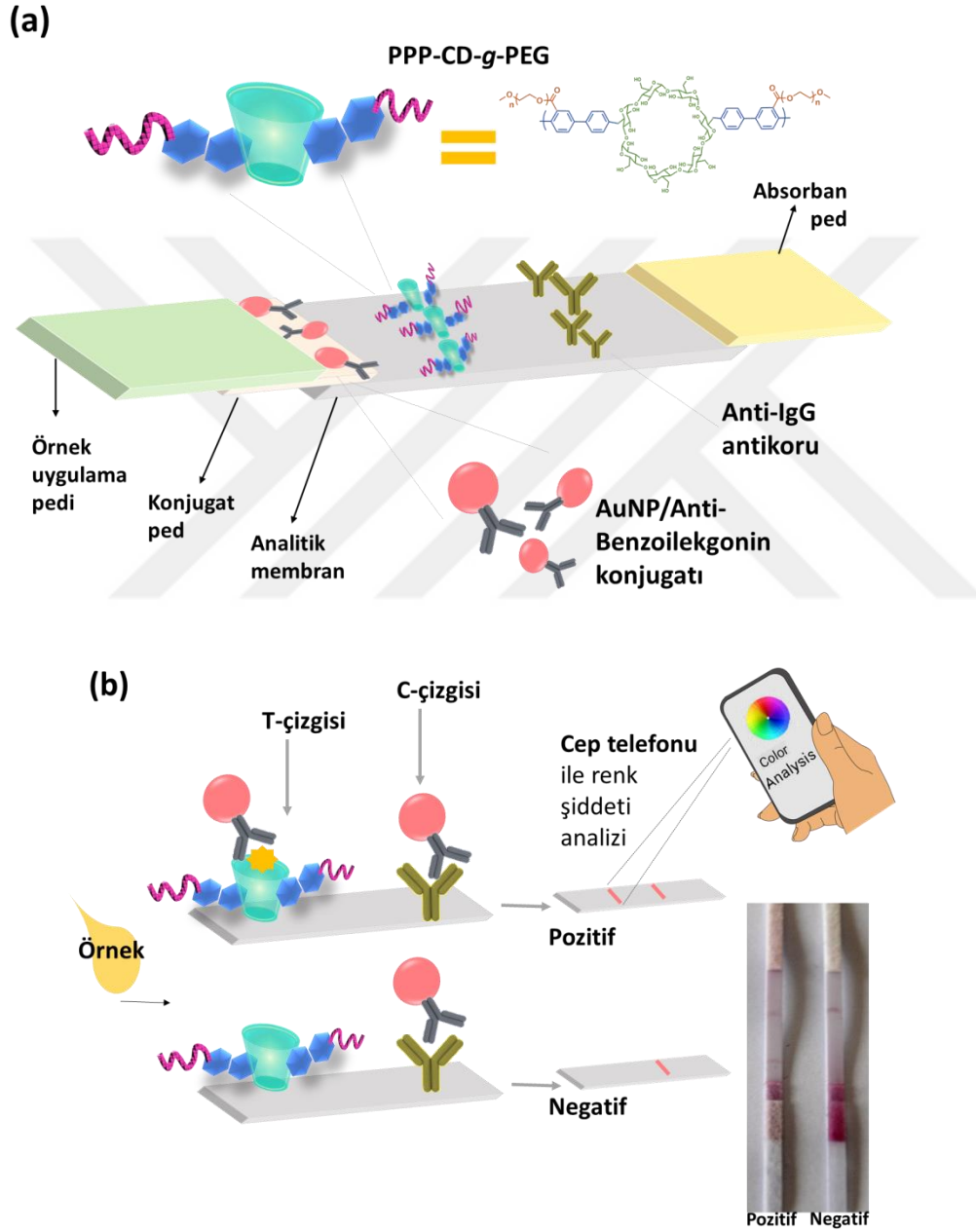
2.6. Mobil LFA Kit: β -CD/LFA Test Kitine Yönelik Çalışmalar

µ-kuyucuk temelli floresans tekniğe dayanan test kitlerine ek olarak LFA temelli madde tanı kitlerinin geliştirilmesine ilişkin çalışmalar yapılmıştır.

2.6.1. β -CD/LFA lateral flow testin tasarımı

Tez projesinin bu bölümünde, yeni bir teknikle LFA temelli kokain test kiti tasarlandı. LFA'ları temel alan klasik madde testleri yarışmalı formattadır. Bu formattaki testlerde, test çizgisinde analizlenmesi hedeflenen maddenin BSA ile konjuge edilmiş standardı yer alırken kontrol çizgisinde ise AuNP konjugatını yakalayacak ikincil antikor yer almaktadır. Bu geleneksel testlerden farklı olarak test çizgisine analit-BSA konjugatı yerine PPP-CD-g-PEG (poly(p-phenylene-co-cyclodextrin-g-poly(ethyleneglycol)) polimeri immobilize edilmiştir. Bu polimerin kullanılma nedeni yapısında bulunan β -CD birimlerinin kokaine seçicilik göstermesidir. Şekil 2.10 (a)'da görüldüğü gibi, PPP-CD-g-PEG test çizgisine emdirildi. Test bölgesinde bulunan β -CD birimleri kokaini yüksek

seçimlilikle tanır ve bağlar. Konjugat pedte bulunan Altın nanopartikül/Anti-Kokain antikor (AuNP/Anti-Kokain) da test çizgisine bağlanan kokaine bağlanır. Böylece eğer uygulanan örnekte kokain varsa test çizgisinde renk oluşur. Diğer yandan uygulanan örnek kokain içermiyorsa AuNP/Anti-Kokain konjugatı test çizgisine bağlanamaz ve test çizgisinde renk oluşmaz (Şekil 2.10 (b)) (Guler et al., 2017b).



Şekil 2.10 a) β -CD temelli lateral flow testin bileşenlerinin şematik gösterimi. b) CD-LFA ile yanıt oluşumunun şematik gösterimi.

2.6.1.1. Test komponentlerinin optimizasyonu ve hazırlanması

Tek bir test membranı beş bileşenden oluşmaktadır: PVC sırtlık, örnek uygulama pedi, konjugat ped, analitik membran (nitroselüloz membran), absorblayıcı ped. Test reaktifleri membranlara emdirilmeden önce örnek uygulama pedi ve analitik membran bloklama çözeltileri ile ön işlemden geçirildi. Konjugat ped ve absorban ped ise bir ön işlem uygulanmadan kullanıldı. Test sisteminin başarılı bir şekilde çalışmasında önemli parametrelerden biri de uygun membran sistemlerinin seçilmesidir. Bunun için farklı firmalarla bilgi alışverişinde bulunuldu. Bazı firmalardan free sample membranlar temin edildi. Test performansını etkileyen önemli parametrelerden biri olan optimum membran bileşenlerinin belirlenmesi için optimizasyon çalışmaları yapıldı. Kullanılan test komponentlerine ilişkin bilgiler aşağıdaki gibidir:

Örnek Uygulama pedi – Sample pad

Ahlstrom Glass fiber pedler kullanıldı.

Bloklama Çözeltisi:

%0,5 Tween 20

%5,0 Sükroz

%5,0 Dekstran

% 0,05 Sodyum azid

- Bloklama işlemi için uygun boyutlarda kesilen örnek uygulama pedleri bloklama çözeltilerinde (8-10 mL) 30 dk boyunca bekletilir.

- Bloklama işlemi sonrası, 2 defa 10 dk boyunca 10 mM pH 7.4 sodyum fosfat tamponunda bekletilerek yıkama yapılır.

- Son olarak yıkama çözeltisinden alınan pedler gece boyu oda sıcaklığında desikatörde kurumaya bırakılır.

Konjugat Ped

Ahlstrom ReliaFlow conjugate release pad kullanıldı. Konjugat ped için farklı bloklama çözeltileri hazırlandı ve testin performansına olan etkisi değerlendirildi. Hazırlanan ve test edilen bloklama çözeltileri aşağıdaki gibidir;

1. Bloklama çözeltisi:

% 0,5 Poli vinil alkol (PVA)

% 0,1 Triton-X 100

50 mM Na₂HPO₄ (pH: 7,4)

% 0,5 BSA

2. Bloklama çözeltisi:

% 0,5 Poli Vinil Alkol (PVA)

% 0,1 Triton-X 100

50 mM Na₂HPO₄ (pH: 7,4)

% 5,0 BSA

3. Bloklama çözeltisi:

% 0,5 Poly Vinil Alkol (PVA)

% 0,1 Triton-X 100

50 mM Na₂HPO₄ (pH: 7,4)

% 1,0 Kazein

% 4,0 BSA

- Bloklama işlemi için uygun boyutlarda kesilen konjugat pedleri bloklama çözeltisinde (8-10 mL) 30 dk boyunca bekletilir.

- Bloklama işlemi sonrası, 2 defa 10 dk boyunca 10 mM pH 7,4 sodyum fosfat tamponunda bekletilerek yıkama yapılır.

- Son olarak yıkama çözeltisinden alınan pedler gece boyu oda sıcaklığında desikatörde kurumaya bırakılır.

Bunlara ek olarak; bloklama işlemi konjugatın uygulanması aşamasında yapılmıştır. Burada temel hedef; maliyeti düşürmek açısından kullanılan malzemelerin miktarını azaltmak ve ön işlemi de minimuma indirmektir. Aynı zamanda testin performansında çok önemli bir parametre; AuNP konjugatlarının konjugat pedten kolaylıkla ayrılması ve test/kontrol çizgilerinde görülebilir bir sinyal oluşturmasıdır. AuNP konjugatları aşağıda verilen çözelti ile seyreltilmiş ve konjugat pede bu şekilde uygulanmıştır.

4. Bloklama Çözeltisi:

- % 5,0 Sükroz
- % 1,0 BSA
- % 0,8 NaCl
- % 0,3 Tween 20
- % 0,05 Sodyum azid

Analitık Membran

MDI firmasından alınan nitroselüloz membranlar kullanıldı ve nitroselüloz membran bloklanması ve bloklanmaması durumunda hazırlanan kitlerin performansı karşılaştırıldı.

1. Bloklama Çözeltisi:

- 10X Tris Buffer Saline (TBS) (200 mM Tris, 1,37 M NaCl)
- % 2,0 PVP
- % 0,15 Kazein
- % 5,0 Tween 20
- % 1,0 BSA

2. Bloklama Çözeltisi:

- % 0,05 BSA
- % 0,02 PVP
- % 0,005 Kazein
- 1X TBS (50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl içeren)
- % 0,002 Tween 20

Bloklama işlemi, nitroselüloz membranların üzerine 6,0 mL bloklama çözeltisi eklenmesiyle 1 dk boyunca yapıldı. Sonrasında, ultra saf su ile yıkama işlemi yapıldı. Son olarak kuru peçeteye fazla sıvı emdirilerek gece boyu oda sıcaklığında desikatör içerisinde kurumaya bırakıldı.

2.6.1.2. Test bileşenlerinin membranlara emdirilmesi

AuNP/Anti-Kokain konjugatı ve analitik membran çizgileri dispenser (The IsoFlow Dispenser, Imagen Technology) yardımı ile membranlara uygulandı. Test çizgisine 1,0 mg/mL PPP-CD-g-PEG ve kontrol çizgisine 2,0 mg/mL Anti-

IgG antikoru uygandı. Reaktifleri emdirilen konjugat ped ve nitroselüloz membran 4 saat 37 °C de %20 nem altında kurutuldu.

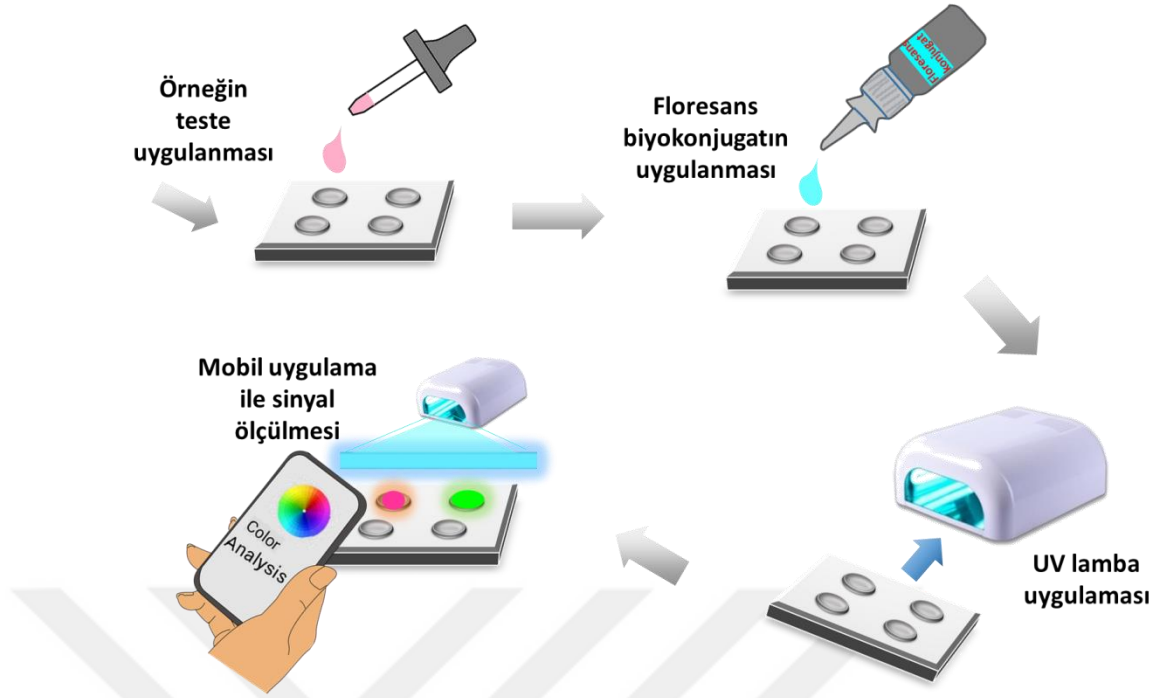
Tüm membranlar uygun boyutlarda kesildi ve testi oluşturmak üzere sırtlık (PVC backing card) üzerine yapıştırıldı. Son olarak membran kesici (Strip cutter) ile kesildi.

2.6.2. Mobil LFA kit ile analiz

Farklı konsantrasyonlarda kokain standartları, sentetik tükürük çözeltileri içerisinde hazırlandı ve 100 µL örnek hacminde, örnek uygulama pedlerine uygulandı. Analitik pencerede oluşan çizgilerin fotoğrafları çekildi ve cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile test çizgilerinin renk şiddetleri ölçüldü.

2.7. Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti

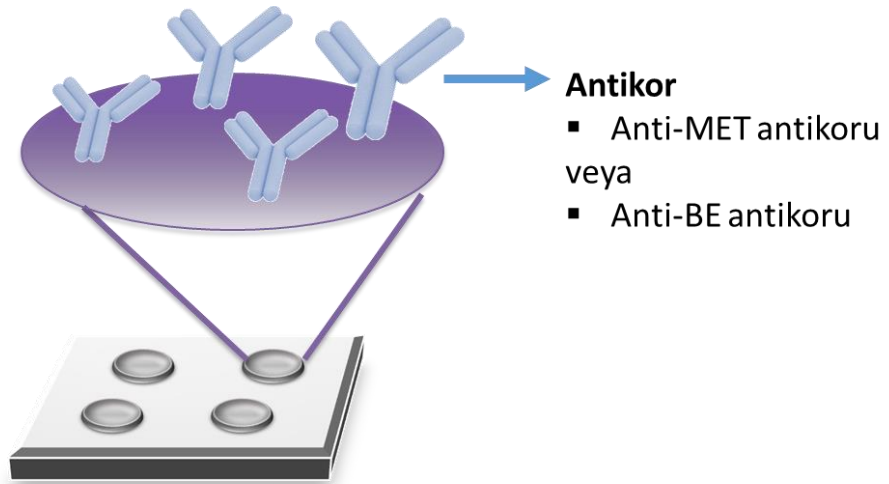
Tez projesinin bu bölümünde, test sinyallerinin akıllı telefon uygulamasıyla ölçüldüğü mikroplaka temelli yasadışı madde test kiti tasarımı üzerine çalışıldı. Cep telefonuna entegre bir test kiti teknolojisi olması nedeniyle, geliştirilen test sistemine “**Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti**” adı verildi (Şekil 2.11). Yasadışı maddeler arasında stimulanlar sınıfında olan ve yaygın kullanımı söz konusu iki güçlü uyarıcı madde “**metamfetamin ve kokain**” model maddeler olarak seçildi ve bu iki maddeye yönelik test kiti tasarlandı. Test sisteminde sadece model maddeler çeşitlendirilmedi aynı zamanda her bir madde için ayrı bir renkte sinyal ajanı kullanıldı. Dolayısıyla geliştirilen test sistemi iki renkli madde testi olarak da adlandırılabilir. MET için yeşil ve kokain için kırmızı floresans sinyaller test yanıtı olarak alındı. Oluşan floresans sinyaller cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile % renk şiddeti olarak dedekte edildi.



Şekil 2.11 Geliştirilen Mobil Floresans Mikroplaka Test Kitine ilişkin şematik gösterim.

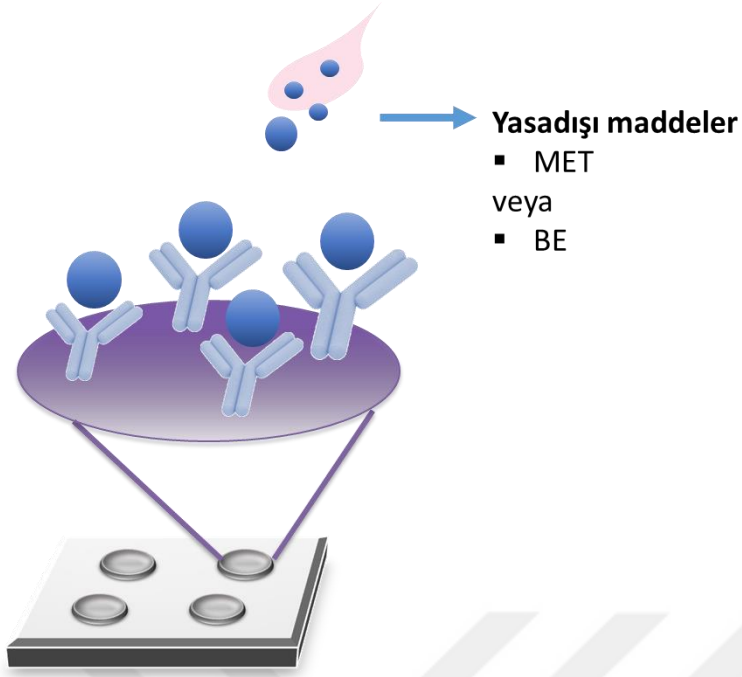
Geliştirilen test kiti; mikro kuyucuklarda hazırlanan ve sandviç testi formatında çalışan bir test sistemidir. Testin tasarım adımları basitçe şu şekildedir;

- 96-kuyucuklu mikroplakaların yüzeylerinin analizlenmesi hedeflenen yasadışı maddeye seçimli antikor ile modifiye edilmesi



Şekil 2.12 Mikroplaka yüzeylerinin hedef maddeye seçimli antikor ile modifiye edilmesi.

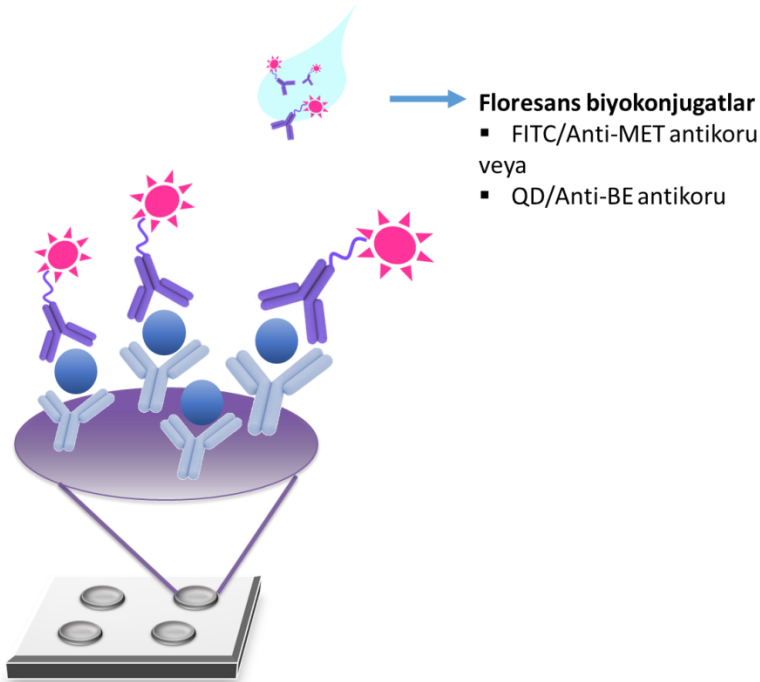
- Yasadışı maddelerin (MET ya da BE (kokain metaboliti)) plakalara uygulanması.



Şekil 2.13 Model yasadışı maddelerin test kitine uygulanması.

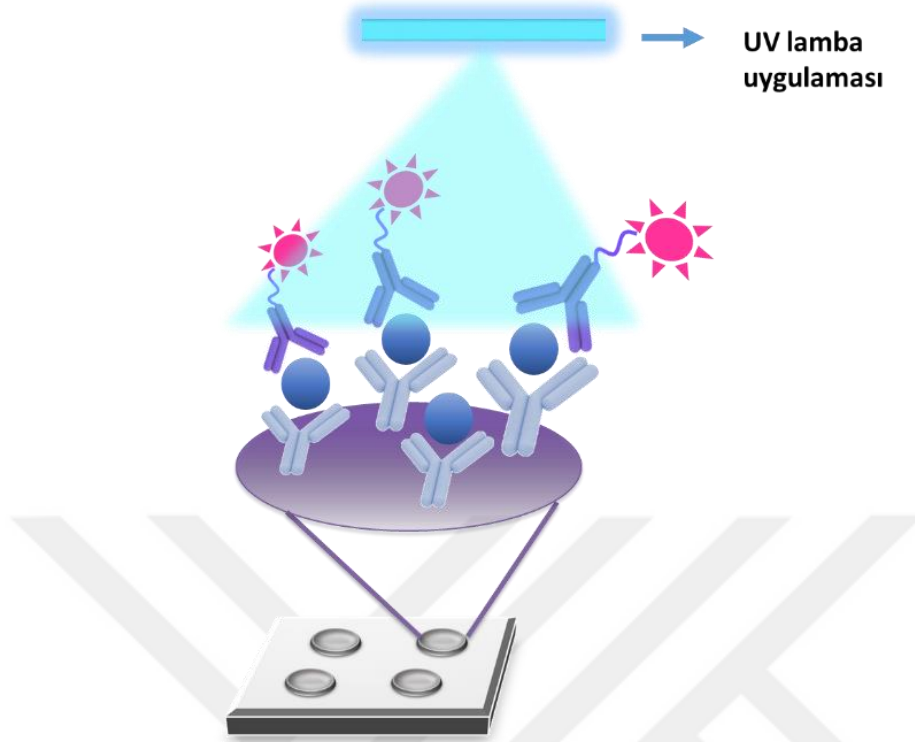
- Floresans biyokonjugatların eklenmesi

Analite spesifik antikolar floresans bir materyal ile işaretlendi (Floresans biyokonjugat). Bu aşamada MET ve BE için farklı floresans ajanlar kullanıldı. MET analizinde; organik bir florofor olan FITC (Fluorescein isothiocyanate), BE analizinde ise; inorganik nanoparçacık olan QD kullanıldı.



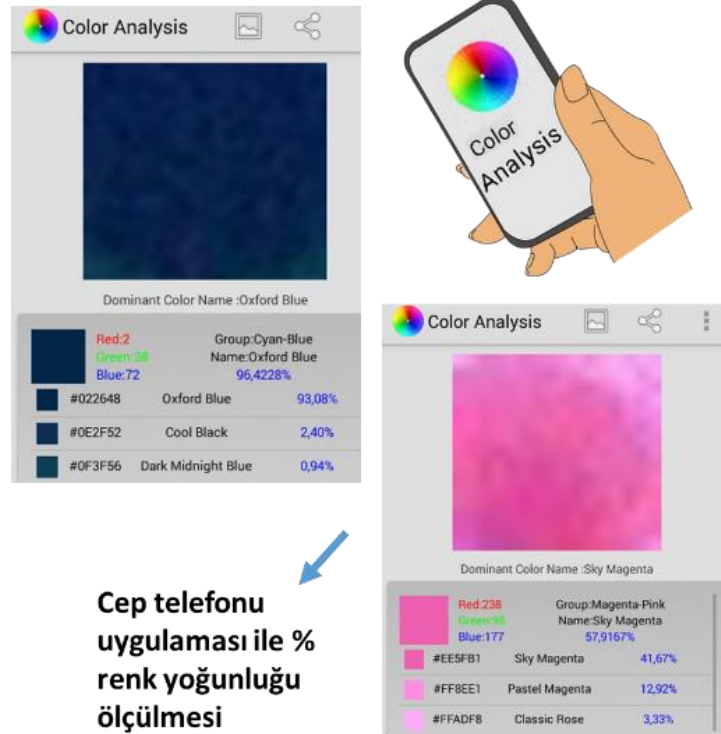
Şekil 2.14 Dedeksiyon konjugatlarının test kitine uygulanması.

- Test plakasının UV lamba altında görüntülenmesi ve cep telefonu ile fotoğraflarının çekilmesi.



Şekil 2.15 Test kitinin UV lamba altında fotoğraflarının çekilmesi.

- Mobil uygulama olan Color Analysis ile test sonuçlarının alınması



Şekil 2.16 Test kitinde oluşan renklerin cep telefonu uygulaması ile ölçülmesi.

2.7.1. Biyokonjugatların Hazırlanması

Bölüm 2.7’de belirtildiği gibi model olarak seçilen iki farklı madde için analiz sistemi geliştirildi. Test sistemi iki renkli analize imkan sunacak şekilde tasarlandı. Bu amaçla farklı renklerde floresans özellik gösteren iki materyal kullanıldı. Bunlardan birincisi en yaygın olarak bilinen organik florofor olan FITC, diğeri ise güçlü floresans özellikleri ile bilinen inorganik nanoparçacıklar olan QD’lerdir. FITC, MET analizinde; QD ise BE (kokain metaboliti) analizinde kullanıldı. Test sistemi mikro-kuyucuk (μ -well) temelli ve floresans dedeksiyona dayanan bir prensiple çalışmaktadır. Bu nedenle hedef analite seçimli bir tanıyıcı molekül ile floresans sinyal oluşturacak bir materyalin birbirine bağlanması gerekmektedir (Biyokonjugasyon). Bu amaçla FITC, MET antikoru ile modifiye edilirken QD ise BE antikoru ile modifiye edildi. Konjugatların hazırlanmasında kullanılan teknikler şu şekildedir;

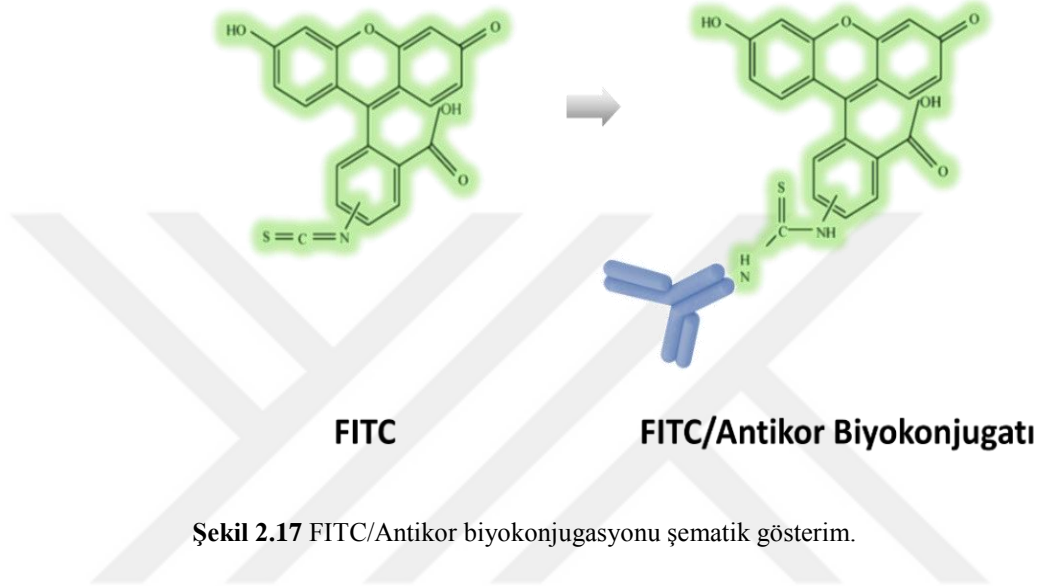
2.7.1.1. FITC/Anti-MET biyokonjugatının hazırlanması

Çalışmanın bu kısmında MET antikoru (Anti-MET antikoru), FITC floresans boyası ile işaretlendi (Şekil 2.17). FITC proteinlerin işaretlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Proteinlere primer aminler (lizin) üzerinden kovalent olarak konjuge olmaktadır. Genellikle bir antikora 3-6 FITC molekülü bağlanmaktadır. Konjugasyon reaksiyonlarına başlamadan önce ilk olarak reaksiyon sırasında kullanılacak olan tampon çözeltiler hazırlandı.

- Reaksiyon tamponu (Sodyum karbonat tamponu, 500 mM karbonat, pH 9,5)
- Depolama tamponu (TRIS tamponu, 10 mM Tris, 150 mM NaCl, %0,1 NaN_3 , pH 8,2)

Antikorlar ticari halinde %0,02 oranında sodyum azid (NaN_3) bulunan PBS tamponu içerisinde satılmaktadır ve içerisinde bulunan NaN_3 FITC ile etkileşebildiği için FITC’nin antikorla bağlanma verimini düşürebilir. Bu bilgiye dayanarak FITC-Antikor konjugasyon reaksiyonuna başlamadan önce ortamdaki NaN_3 ’i uzaklaştırmak amacıyla diyaliz işlemi yapıldı. Bu nedenle 1,0 mg/mL 1,0 ml antikor (Anti-MET) 12 kDa’lık diyaliz torbasına konuldu. Daha sonra 500 mM 200 mL sodyum karbonat tamponuna karşı manyetik karıştırıcıda karıştırılarak diyalizlendi. Böylece sodyum azid uzaklaştırıldı ve 1 saat sonra alındı. Üzerine

1,0 mg/mL (DMSO içerisinde çözünmüş) FITC, 1,0 mg/mL 1,0 mL Anti-MET antikorunun üzerine 400 µL olacak şekilde yavaş yavaş eklendi. 1000 rpm, oda sıcaklığında 1 saat mini karıştırıcıda inkübasyona bırakıldı. Reaksiyon süresinin sonunda bağlanmayan FITC'yi uzaklaştırmak için tekrar diyaliz yapıldı. Depolama tamponu olan Tris (50 mM, pH 8,2) tamponu içerisinde diyaliz edildi. Böylece konjugatın saklanacağı depolama tamponu diyaliz torbasının içerisinde girerken bağlanmayan FITC'ler uzaklaştırıldı.

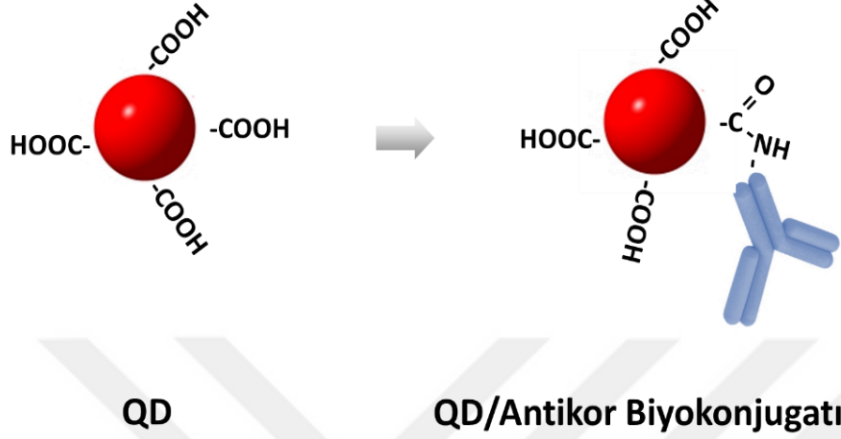


Şekil 2.17 FITC/Antikor biyokonjugasyonu şematik gösterim.

2.7.1.2. QD/Anti-BE biyokonjugatının hazırlanması

QD'lerin Anti-BE antikoruna bağlanması için kovalent konjugasyon tekniği kullanıldı. Kullanılan QD'ler suda çözünmektedir ve yüzeylerinde karboksil ($-COOH$) grupları içermektedir. Karboksil fonksiyonel QD'ler seçilmiştir çünkü bu fonksiyonel grupların varlığı sayesinde kimyasal modifikasyonlara açıktır. QD'lerin $-COOH$ grupları ile antikorun $-NH_2$ (amino) grupları arasında kovalent amid bağı oluşturulmuştur (Şekil 2.18). Bu bağı oluşturulmasında EDC/NHS kimyası kullanılmıştır. EDC ve NHS karboksil ve amino grupları içeren maddeler arasında kovalent bağ oluşturulmasında çok yaygın olarak kullanılan çapraz bağlayıcılardır. EDC/NHS reaksiyonu için ilk olarak; 500 mM 400 µL EDC, 125 mM 400 µL NHS (10 mM, pH 5,5 MES tamponu içerisinde) ve 1000 µL QD karıştırılarak oda sıcaklığında, 1000 rpm karıştırma altında 20 dk inkübe edildi. Bu aşama QD yüzeyinde bulunan karboksil gruplarının aktivasyonu için yapılmıştır. Sonrasında 1,0 mg/mL 200 µL Anti-BE antikoruna reaksiyon ortamına eklendi ve yine oda sıcaklığında 1000 rpm karıştırma

altında 3 saat inkübe edildi. İnkübasyon bittikten sonra bağlanmayan maddelerin uzaklaştırılması amacıyla mikrosantrifüj kullanılarak üç kez fosfat tamponu (pH 7,4) ile yıkama yapıldı. Yıkama sonrasında alınan QD/Anti-BE konjugatı +4°C’de ve karanlıkta depolandı.



Şekil 2.18 QD/Antikor biyokonjugasyonu şematik gösterim.

2.7.2. Biyokonjugatların karakterizasyonu

2.7.2.1. Floresans ölçümler

Bu aşamada floresans materyallerin (FITC ve QD) ve antikorlar ile biyokonjugatlarının (FITC/Anti-MET ve QD/Anti-BE) floresans taramaları florimetri cihazı ile yapıldı. FITC için eksitasyon dalga boyu (λ_{ex}) 492 nm ve emisyon dalga boyu (λ_{em}) ise 518 nm’dir. QD için ise eksitasyon dalga boyu (λ_{ex}) 380 nm ve emisyon dalga boyu (λ_{em}) ise 606 nm’dir. FITC, QD ve konjugatları belirtilen eksitasyon dalga boylarında florimetrik olarak tarandı ve emisyon pikleri elde edildi.

Florimetrik ölçümlere ek olarak FITC, QD ve konjugatlarının UV lamba altında fotoğrafları çekilmiştir. Böylece de örneklerin karakterizasyonu amacıyla kalitatif değerlendirmeler yapılması mümkün olmuştur.

2.7.2.2. Partikül boyutu ve yüzey potansiyeli analizi

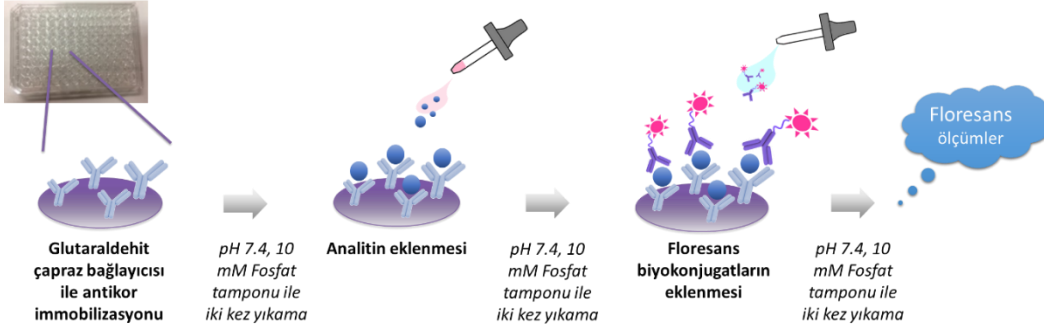
Bu karakterizasyon adımı QD ve QD/Anti-BE konjugatı için yapılmıştır. Çünkü QD’ler küresel yapılardır ve DLS ile partikül boyutu ölçümleri yapılabilmektedir. Diğer yandan FITC için yapısı nedeniyle bu söz konusu

olmamaktadır. Partikül boyutu ve yüzey yükü ölçümleri için örnekler zeta kuvvetlerine konuldu ve DLS cihazı ile ölçümler yapıldı.

2.7.3. Mobil floresans mikropkaka test kiti: Tasarım

Geliştirilen test sisteminin mikropkakatemelli olduğu belirtilmişti. Bu nedenle test sisteminin tasarımı için 96 kuyucuklu mikropkakaların yüzeyleri uygun yüzey kimyası kullanılarak tasarlandı. Yüzey tasarımı yapılırken analizi hedeflenen maddeye spesifik olan antikor yüzeye glutaraldehit kullanılarak bağlandı. Glutaraldehit amino grupları arasında bağ oluşturan bir çapraz bağlayıcıdır. Kullanılan 96 kuyucuklu plakalar poli-L-lizin kaplı bir şekilde ticari olarak temin edilmiştir. Bu sayede plaka kuyucuklarının yüzeyinde bulunan amino grupları ile antikorların amino grupları arasında glutaraldehit ile bağ oluşturulmuştur. Deneysel aşamaları şu şekildedir:

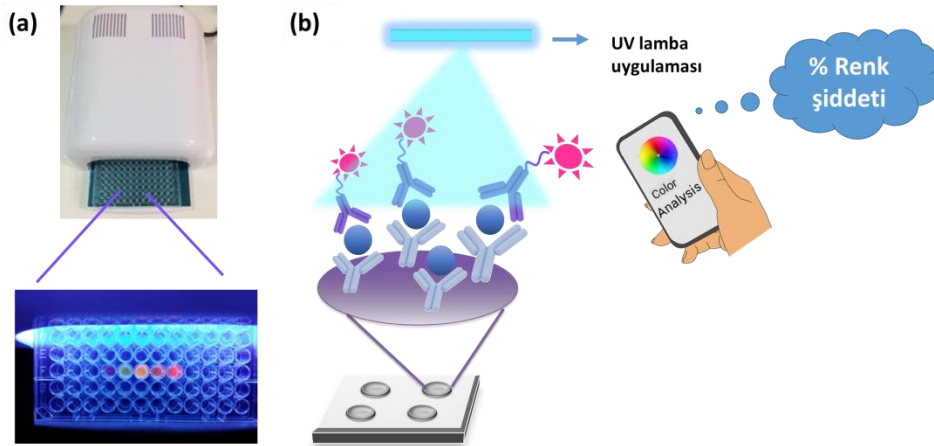
İlk olarak çapraz bağlayıcı olan %2,5'luk glutaraldehit çözeltisi fosfat tamponu (10 mM, pH 7,4) içerisinde hazırlandı. Daha sonra plakadaki her bir kuyucuk başına 20 µL glutaraldehit çözeltisi ve 20 µL 100 µg/µL antikor (Anti-MET antikoruna ya da Anti-BE antikoruna) eklendikten sonra 30 dk bekletildi. Bağlanmayan antikorları uzaklaştırmak için 2 kez fosfat tamponuyla (10 mM, pH 7,4) yıkandı. Yıkama işlemi sonrasında analizi hedeflenen maddenin artan konsantrasyonlarda standartları (MET için; 25; 50; 75; 100; 200; 500 µg/µL ve BE için; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0; 10; 25; 50 µM) eklendi ve tekrar 30 dk beklendi. İnkübasyon sonrasında 2 kere fosfat tamponuyla (10 mM, pH 7,4) yıkandı. Son aşamada ise floresans konjugatlar (FITC/Anti-MET ya da QD/Anti-BE) eklendi. 30 dk inkübasyon sonrasında tekrar fosfat tamponuyla (10 mM, pH 7,4) 2 kez yıkandı. Hazırlanan test platformu floresans ölçümlerin yapılacağı dedeksiyon aşamasına hazır hale getirildi (Şekil 2.19).



Şekil 2.19 Mobil floresans mikropilaka test kitinin tasarımının şematik gösterimi.

2.7.4. Mobil floresans mikropilaka test kiti: Ölçüm prensibi

96 kuyucuklu plakalar üzerinde yüzey tasarımı, örneğin uygulanması ve floresans tanıyıcı moleküllerin eklenmesi adımlarının tümü tamamlandıktan sonraki aşama artık oluşan floresans sinyallerin dedeksiyonudur ve kantitatif verilere dönüştürülmesidir. Floresans ışınları ölçmek için test platformunun UV lamba altında karanlıkta cep telefonu kullanılarak fotoğrafları çekildi. Sonrasında akıllı telefon uygulaması olan Color Analysis ile renk şiddetleri ölçüldü ve kalibrasyon grafikleri oluşturuldu. Söz konusu telefon uygulaması seçilen fotoğraf karesindeki renklerin yoğunluklarına göre dağılımlarını (% renk yoğunluğu) vermektedir (Şekil 2.20). Bu telefon uygulamasının bu amaçla kullanımı ilk kez bu tez projesinde gerçekleştirilmiştir.



Şekil 2.20 a) Test plakasının UV lamba altında görüntülenmesi, b) Mobil-DopSENS sisteminin UV lamba ve cep telefonu kullanılarak ölçüm prensibinin şematik gösterimi.

2.7.5. Kromatografik doğrulama

Çalışmanın bu aşamasında geliştirilen test kiti ile örnek uygulama yapıldı ve teste uygulanan örnekler aynı zamanda kromatografi sistemlerine de uygulanarak testin doğrulaması gerçekleştirildi. Örnek uygulama amacıyla laboratuvarda hazırlanan sentetik idrar ve sentetik tükürük içerisine standart katma yöntemiyle MET ya da BE eklendi. Hazırlanan örnekler hem test kiti hem de kromatografi (LC-MS/MS) ile analizlendi. Böylece geliştirilen test sisteminin farklı biyolojik matrislerin varlığından etkilenip etkilenmediği hem de doğru çalışıp çalışmadığının değerlendirilmesi mümkün oldu.



3. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3.1. ALSA Floresans Mikropilaka Test Kitine İlişkin Sonuçlar

3.1.1. Apta-lipozomların karakterizasyonuna ilişkin bulgular

3.1.1.1. Boyut analizi

Proje kapsamında sentezlenen lipozom veziküllerinin partikül boyutu ve zeta potansiyelleri, partikül boyutu ölçüm cihazı (Zeta Sizer, Malvern NanoZS) kullanılarak belirlenmiştir.

Ölçümler sonucunda elde edilen partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3. 1 Hazırlanan lipozom veziküllerinin partikül boyutu ve zeta potansiyel değerleri

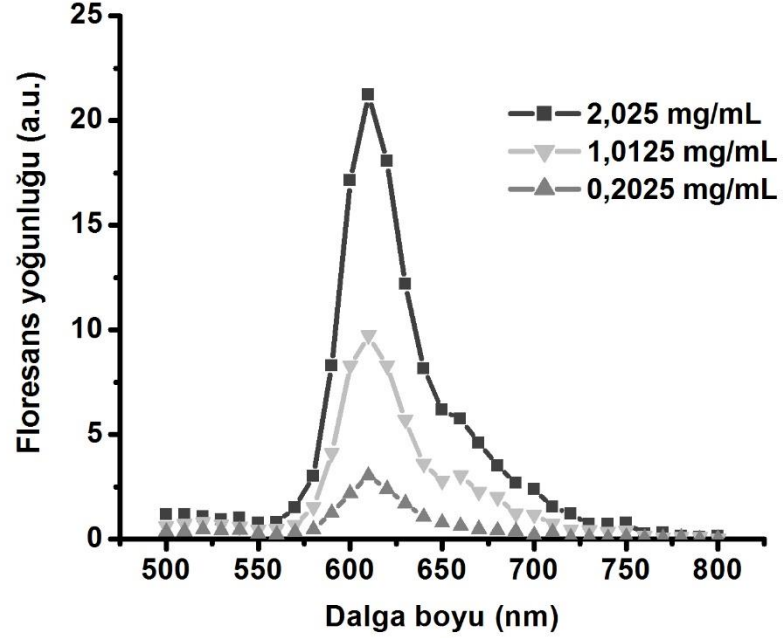
Örnek	Boyut (nm)	Zeta potansiyel (mV)
Texas Red - Lipozom	69,20 ± 10,31	-35,8 ± 5,99
Texas Red – Apta-lipozom	106,1 ± 17,09	-39,9 ± 6,84

Başarılı nano-veziküller hazırlamak için partikül boyut dağılımı homojen olmalıdır. Aynı zamanda analiz sistemlerinde analit ile etkileşimin kolay olması açısından küçük boyutlarda olması önemlidir. Sonuçlarda da görüldüğü gibi nano boyutlu lipozomlar elde edilmiştir. Aynı zamanda sentezlenen lipozomların hem partikül boyutu hem de zeta potansiyel dağılımları homojendir.

3.1.1.2. Floresans ölçümler

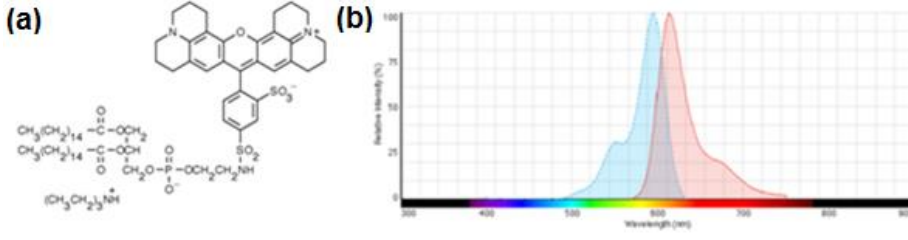
Sentezlenen Apta-lipozomlar içeriğinde bulunan Texas Red işaretli lipid sayesinde floresans özellik sergilemektedir. Projede tasarımı yapılan ALSA floresans sinyal oluşumu üzerinden ölçüm yapmaktadır ve sentezlenen Apta-lipozomlar yüzeyinde bulunan kokaine spesifik aptamerler sayesinde kokaine bağlanırken yapıda bulunan floresans boya sayesinde de sinyal oluşturmaktadır. Bu karakterizasyon adımında ise, sentezlenen floresans özellikli lipozomların hangi konsantrasyonlarında kullanıldığında floresans yoğunluğunun dedekte edilebilir olduğunun belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu nedenle farklı seyreltmelerde hazırlanan lipozom örneklerinin (2,025 mg/mL, 1,0125 mg/mL ve 0,2025 mg/mL

total lipid konsantrasyonu) mikropilaka okuyucu ile Texas Red floresans boyası için Ex/Em: ~595/615 nm koşullarında floresans yoğunluğu taraması yapılmıştır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1 Farklı total lipid konsantrasyonlarında hazırlanan Texas Red işaretli lipozom örneklerinin floresans spektrumları (Ex/Em : ~595/615 nm).

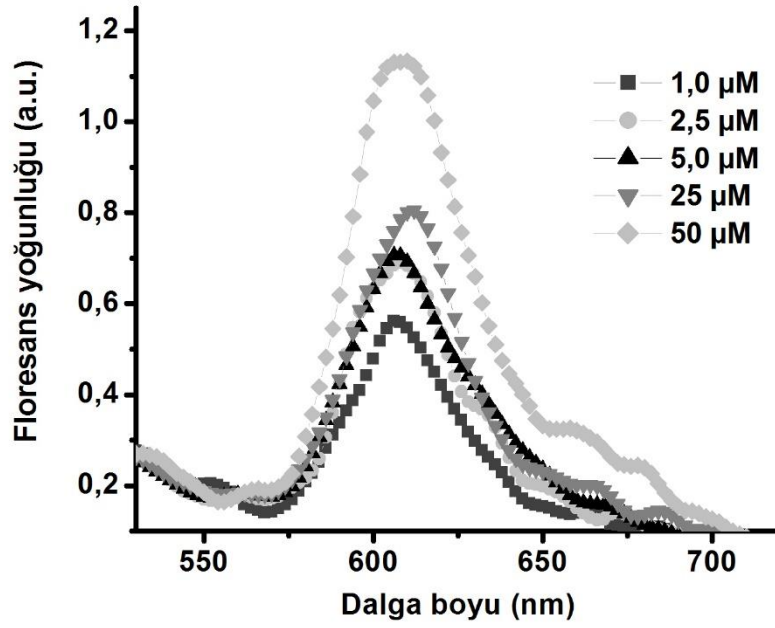
Şekil 3.1'de de görüldüğü gibi 3 farklı konsantrasyonda floresans spektrumları verilen Texas Red floresans boyası ile işaretli lipid içeren lipozom örneklerinin mikropilaka okuyucu ile ölçülebilir sinyaller verdiği gözlenmektedir. Sentezlediğimiz lipozomlara floresans özellik kazandıran Texas Red DHPE lipidi ticari olarak temin edilmiştir ve firmanın verdiği molekül yapısı ve floresans Ex/Em spektrumu Şekil 3.2'de verilmiştir. Şekil 3.2 (b)'de de görüldüğü gibi Texas Red ~615 nm'de maksimum emisyon vermektedir. Sentezlenen lipozom örnekleri de aynı noktada emisyon vermektedir (Şekil 3.1). Bu da Texas Red lipidinin lipozom yapısına başarılı bir şekilde katıldığını ve lipozomlara floresans özellik kazandırdığını göstermektedir.



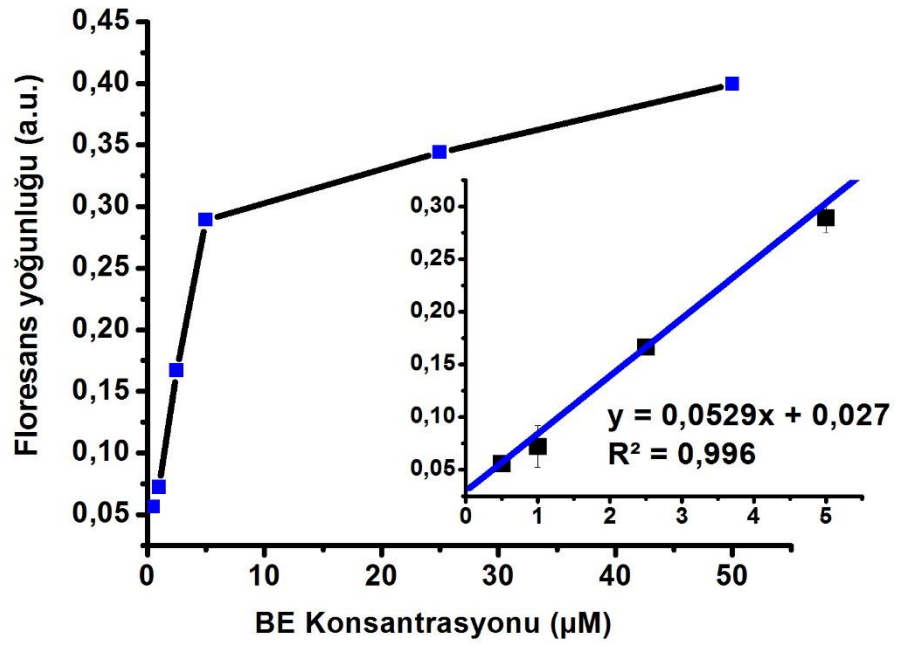
Şekil 3.2 a) Texas Red DHPE lipidinin moleküler yapısı, b) Tex Red'in floresans Ex/Em spektrumu.

3.1.2. ALSA – Kantitatif analiz

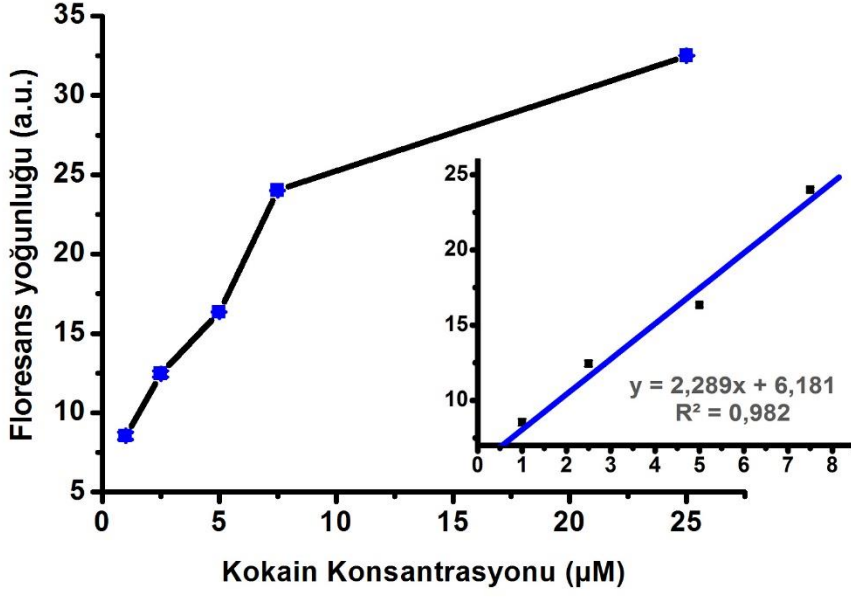
Kokaine (ve BE) seçimli bir şekilde yüzeyleri modifiye edilen 96-kuyucuklu plakaların her bir kuyucuğuna farklı konsantrasyonlarda (0,5 μM ; 1,0 μM ; 2,5 μM ; 5,0 μM ; 25 μM ; 50 μM) BE eklendi. Üzerine de BE tanıyıcı floresans Apta-lipozomlar eklendi. Daha sonra floresans ölçümleri (Ex: 595) alındı. Şekil 3.3'te BE artan konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen floresans ölçümleri verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi geliştirilen test sistemi BE'nin artan konsantrasyonlarına paralel bir şekilde artan floresans yoğunluğu ile cevap vermiştir. Bu da sistemin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir. Belirlenen çalışma koşullarında, farklı BE konsantrasyonlarında elde edilen floresans cevapları kullanılarak kalibrasyon grafiği çizildi (Şekil 3.4). Şekil 3.4 geliştirilen analiz sistemi kullanılarak BE konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen floresans cevaplarını göstermektedir ve içteki grafik kalibrasyon grafiğidir. 0,5-5,0 μM BE konsantrasyonu aralığında doğrusallık gözlenmiştir. Kokain tüketildikten sonra metabolize edilerek büyük bir bölümü BE formunda vücuttan atılır (Smith, 2010). Fakat tükürükte kokain formunda dedekte edilebilmektedir. Bu nedenle bir test kitinin, BE ye ek olarak kokain analizine de imkan tanıyabiliyor olması pratik uygulamaları açısından değerlidir. Geliştirilen ALSA test kiti kokain analizi açısından da araştırıldı. Şekil 3.5 ALSA test sistemine kokain uygulandığında alınan doz-yanıt grafiğini vermektedir.



Şekil 3. 3 ALSA kullanılarak farklı konsantrasyonlarda BE analizlendiğinde elde edilen floresans sinyalleri.



Şekil 3.4 ALSA kullanılarak elde edilen BE doz-cevap grafiği. (İçteki grafik: BE kalibrasyon grafiği.)



Şekil 3.5 ALSA kullanılarak elde edilen kokain doz-cevap grafiği. (İçteki grafik: kokain kalibrasyon grafiği.)

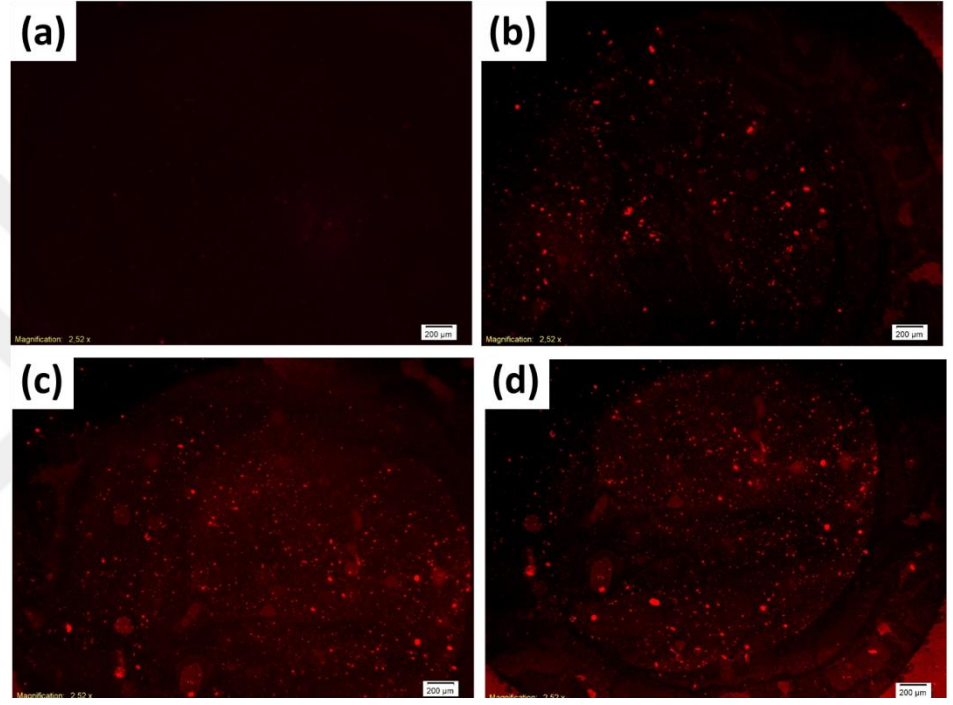
3.1.3. ALSA – Kalitatif analiz

Projede geliştirilen kokain analiz sisteminin önemli avantajlarından biri de kantitatif analize imkan sunmasının yanı sıra kalitatif analize de olanak sağlamasıdır. Analiz sistemi floresans temelli olduğundan mikropilaka okuyucu ile sayısal veriler elde edilirken, floresans mikroskop gibi görüntüleme temelli sistemlerle de kullanılabilir. Analizlenen madde miktarına paralel olarak oluşan floresans, mikroskop altında görüntülenebilir. Şekil 3.6'da görüldüğü gibi; BE içermeyen kuyucukta (Şekil 3.6 (a)) floresans ışımaya gözlenmezken, BE içeren (Şekil 3.6 (b)) kuyucukta Apta-lipozomların BE'ye bağlanması nedeniyle floresans ışımaları gözlenmektedir. Şekil 3.6 (a)'da floresans oluşmamasının nedeni ise, BE ortamında bulunmadığından Apta-lipozomların bağlanamaması ve dolayısıyla yıkama adımında uzaklaştırılmasından kaynaklanmaktadır. Şekil 3.6 (c) ve Şekil 3.6 (d) görüntüleri ise sırasıyla sentetik tükürük ve sentetik idrar (2,5 µM BE içeren) örneklerine aittir. Bu örnekler için de başarılı bir şekilde floresans görüntülerin elde edilebilmesi, biyolojik sıvıların varlığının sistemin çalışmasına olumsuz bir etki oluşturmadığını desteklemektedir.

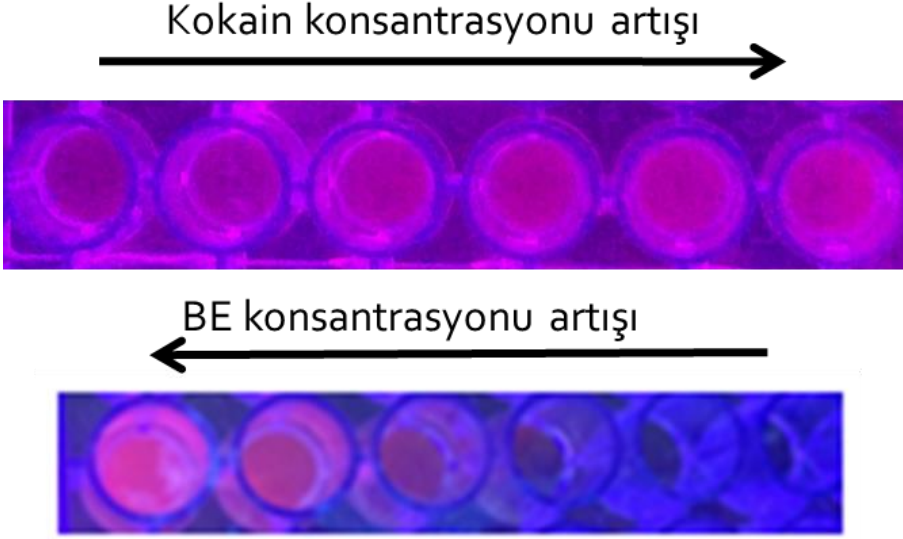
Diğer yandan artan konsantrasyonlarda kokain ve BE örnekleri ALSA test sistemine uygulandığında UV lamba altında fotoğrafları çekildi (Şekil 3.7).

Böylece sistemin, ekstra ekipman ve cihaz gereksinimini ortadan kaldıran basit bir UV lamba kullanılarak da kokainin kalitatif olarak belirlenmesi amacıyla kullanılabilceği gösterildi.

Bu da test sisteminin pratik uygulamaları için kullanım kolaylığı sunmaktadır. Ekstra cihaz ve ekipman gerektirmeden sadece bir UV lamba yardımıyla floresans ışımı oluşup oluşmamasına göre madde var ya da yok sonucuna ulaşılabilir.



Şekil 3.6 ALSA'ya a) örnek uygulanmadığında, b) 2,5 µM BE, c) sentetik tükürük (2,5 µM BE içeren) ve d) sentetik idrar (2,5 µM BE içeren) uygulandığında elde edilen floresans mikroskop görüntüleri.



Şekil 3.7 ALSA ile artan konsantrasyonlarda BE ve kokain örneklerine alınan UV lamba altında görüntüleri.

3.1.4. ALSA – Örnek uygulama ve kromatografik doğrulama

Son olarak standart katma yoluyla hazırlanan ($2,5 \mu\text{M}$ BE) sentetik tükürük ve sentetik idrar örnekleri analizlendi. Tez projesinde geliştirilen test sisteminin doğrulaması; hem bilinen miktarda BE eklenen örneklerden % geri kazanım hesaplanmasıyla hem de HPLC analizi ile yapıldı.

HPLC analizi için; $50\text{-}5000 \text{ ng/mL}$ konsantrasyon aralığında BE standartları hazırlandı. Lineer aralık için kalibrasyon grafiği oluşturuldu ve $y=0,0239x+0,202$ ($R^2=0,999$) denklemi elde edildi.

İçinde bilinen miktarda ($2,5 \mu\text{M}$) BE standardı bulunan sentetik idrar ve sentetik tükürük örnekleri için projede tasarımı yapılan kokain biyodetektörü ve HPLC ile elde edilen cevaplar Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2 ALSA ile örnek uygulama elde edilen yanıtlar ve kromatografi sonuçları.

Biyolojik maktriks	Standart katma (μM)	ALSA ile elde edilen cevap	HPLC cevabı ($2,5 \mu\text{M}= 725 \text{ ng/mL}$)
Sentetik tükürük	$2,5 \mu\text{M}$	$2,69 \mu\text{M}$	741 ng/mL
Sentetik idrar	$2,5 \mu\text{M}$	$2,70 \mu\text{M}$	$725,27 \text{ ng/mL}$
		% Geri kazanım	
		Sentetik tükürük:	
		% 107,6	
		Sentetik idrar: % 108	

Çizelge 3.2’de de görüldüğü gibi test sistemi gerçek örnekleri simüle eden sentetik biyolojik sıvılara uygulandığında oldukça iyi % geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Bu da analizlediğimiz örneğin biyolojik matrislerde de başarılı bir şekilde dedekte edilebildiğini göstermektedir. Geliştirilen test sistemi ürüne dönüştürüldüğünde de insanlardan alınan tükürük ve idrar gibi vücut sıvılarında analiz yapılacağından bu matrislerin testte girişim yapmaması ve alınan cevabı etkilememesi önemli bir parametredir.

3.2. AFSD Floresans Mikropilaka Test Kitine İlişkin Sonuçlar

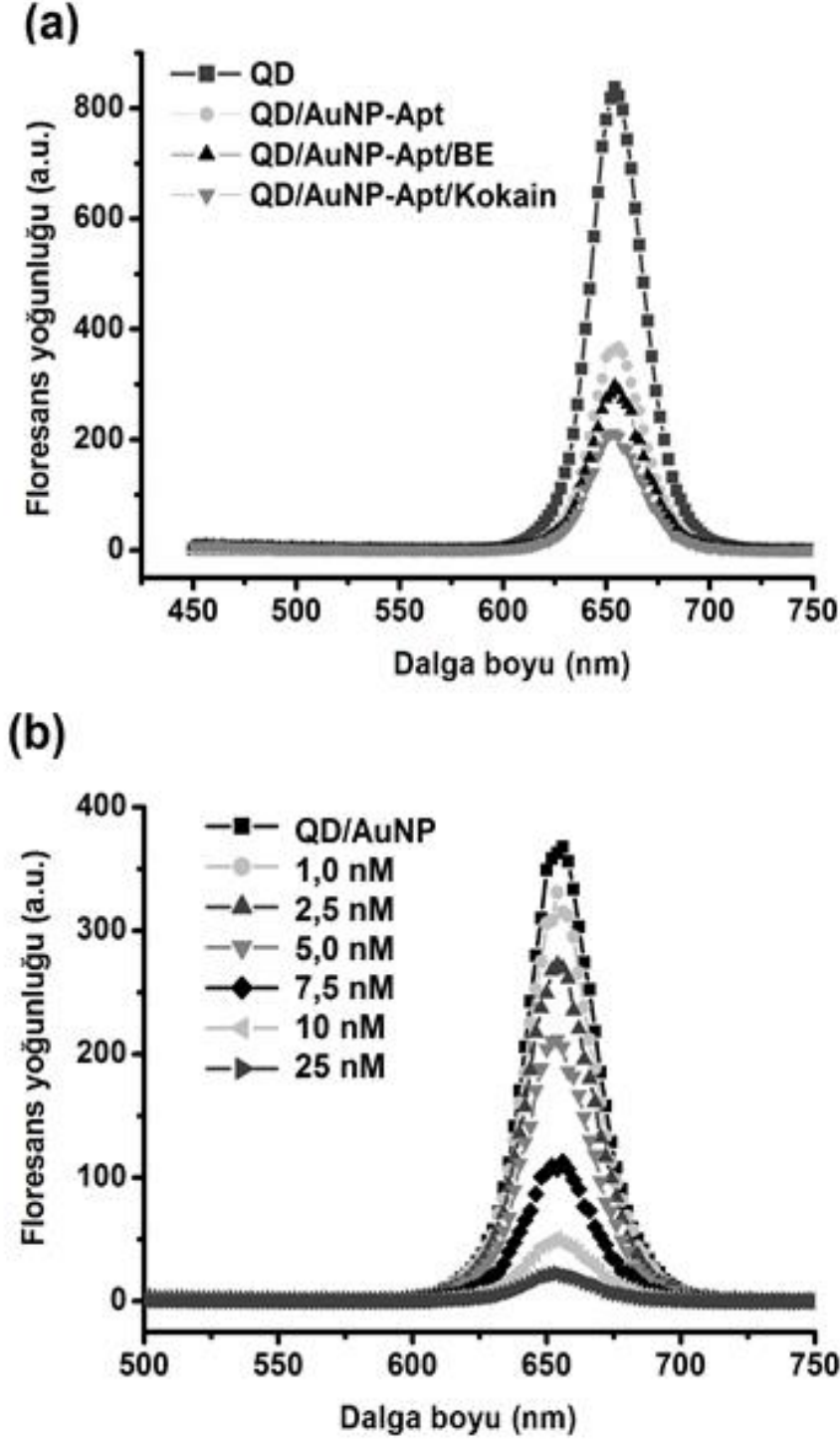
3.2.1. Karakterizasyon çalışmaları

Çizelge 3.3’te DLS cihazı ile ölçülen partikül boyutu sonuçları yer almaktadır. Sonuçlardan da görüldüğü gibi aptamer bağlandıktan sonra partikül boyutunda yaklaşık 13 nm artış olmuştur. Bu da aptamer bağlandığını desteklemektedir. Diğer yandan tek başına AuNP’lerin boyutu ise 46,46 nm olarak ölçülmüştür. Denemelerde ticari AuNP’ler kullanılmıştır ve boyutları 40 nm’dir. Elde edilen ölçüm sonuçları da bunu desteklemektedir.

Çizelge 3.3 AuNP ve sentezlenen AuNP konjugatına ilişkin partikül boyutu analizi

	Boyut (nm)	Std Sapma	PDI
AuNP	46,46	±14,17	0,356
Apt-AuNP	59,25	±13,76	0,496

Şekil 3.8 (a)’da yüzey karakterizasyonunu gösteren floresans ölçümler yer almaktadır. Adım adım floresans şiddetinde gözlenen azalma; QD’lerden sonra AuNP-Apt konjugatının yüzeye bağlandığını, BE ve kokain eklendikten sonra ise test sisteminin yanıt verdiğini göstermektedir. Şekil 3.8 (b)’de ise AFSD’ye artan konsantrasyonlarda kokain eklendiğinde doza bağlı olarak floresans şiddetinde de azalma olduğu gözlenmektedir. Bu da test sisteminin başarılı bir şekilde çalıştığını göstermektedir.

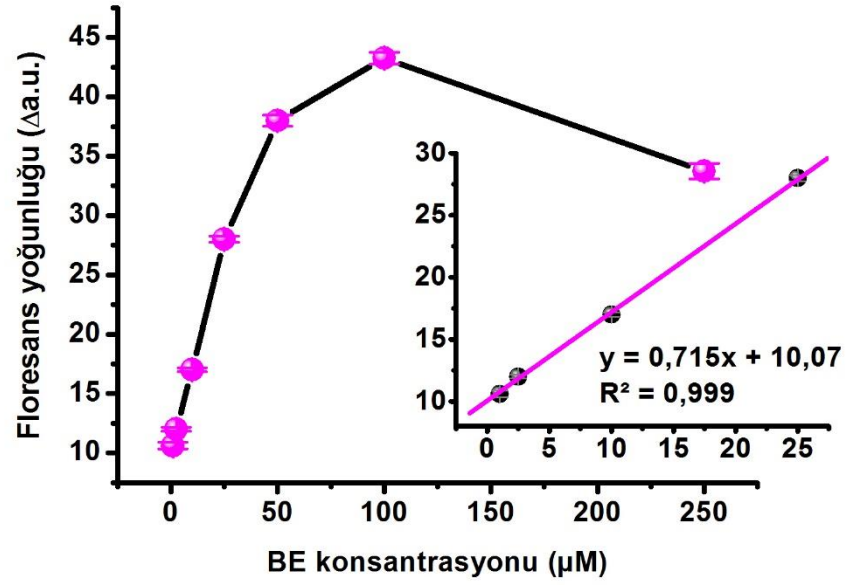


Şekil 3.8 a) Mikroplaka yüzeyinin modifikasyonunu gösteren floresans spektrum. Kokain (5,0 nM) ve BE (10 μ M). b) AFSD ile artan konsantrasyonlarda kokaine alınan yanıt.

Geliştirilen AFSD sisteminin analitik kalibrasyon grafiklerini elde etmek amacıyla hem kokain hem de BE için konsantrasyon bağımlı floresans yanıt grafikleri oluşturuldu. Testten elde edilen floresans yanıtlar; analit eklenmeden önce ve analit eklendikten sonraki floresans sinyaller arasındaki fark alınarak

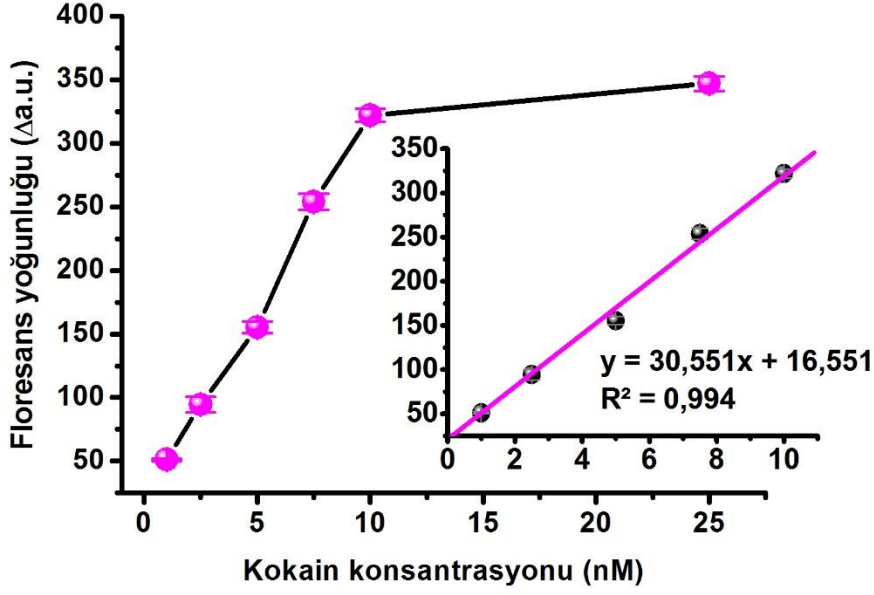
hesaplandı. Konsantrasyon arttıkça floresans sinyaller arasındaki farkın artması beklenen bir sonuçtur. Çünkü daha önce AFSD test sisteminin çalışma prensibinde açıklandığı gibi analit eklendikçe yüzeydeki floresans şiddette bir azalma oluşmaktadır. Dolayısıyla örnek miktarının artması yüzey floresans sinyalinin daha fazla azalmasına neden olacaktır.

Şekil 3.9’da AFSD sisteminin BE için doz-cevap grafiği verilmiştir. BE için lineer aralık 0,1-25 μM ve kalibrasyon denklemi $y=0,715x+10,07$ ($R^2=0,999$) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.9 AFSD sisteminin artan konsantrasyonlarda BE uygulandığında verdiği floresans cevap.

Şekil 3.10’da AFSD sisteminin kokain için doz-cevap grafiği verilmiştir. Kokain için lineer aralık 1,0-10 nM ve kalibrasyon denklemi $y=30,551x+16,551$ ($R^2=0,994$) olarak bulunmuştur.



Şekil 3.10 AFSD sisteminin artan konsantrasyonlarda kokain uygulandığında verdiği floresans cevap.

Çizelge 3.4'te lineer aralık, eğim, LOD ve tekrarlanabilirlik gibi bazı analitik performans sonuçları verilmiştir.

Çizelge 3. 4 AFSD sistemine ilişkin bazı analitik performans parametreleri.

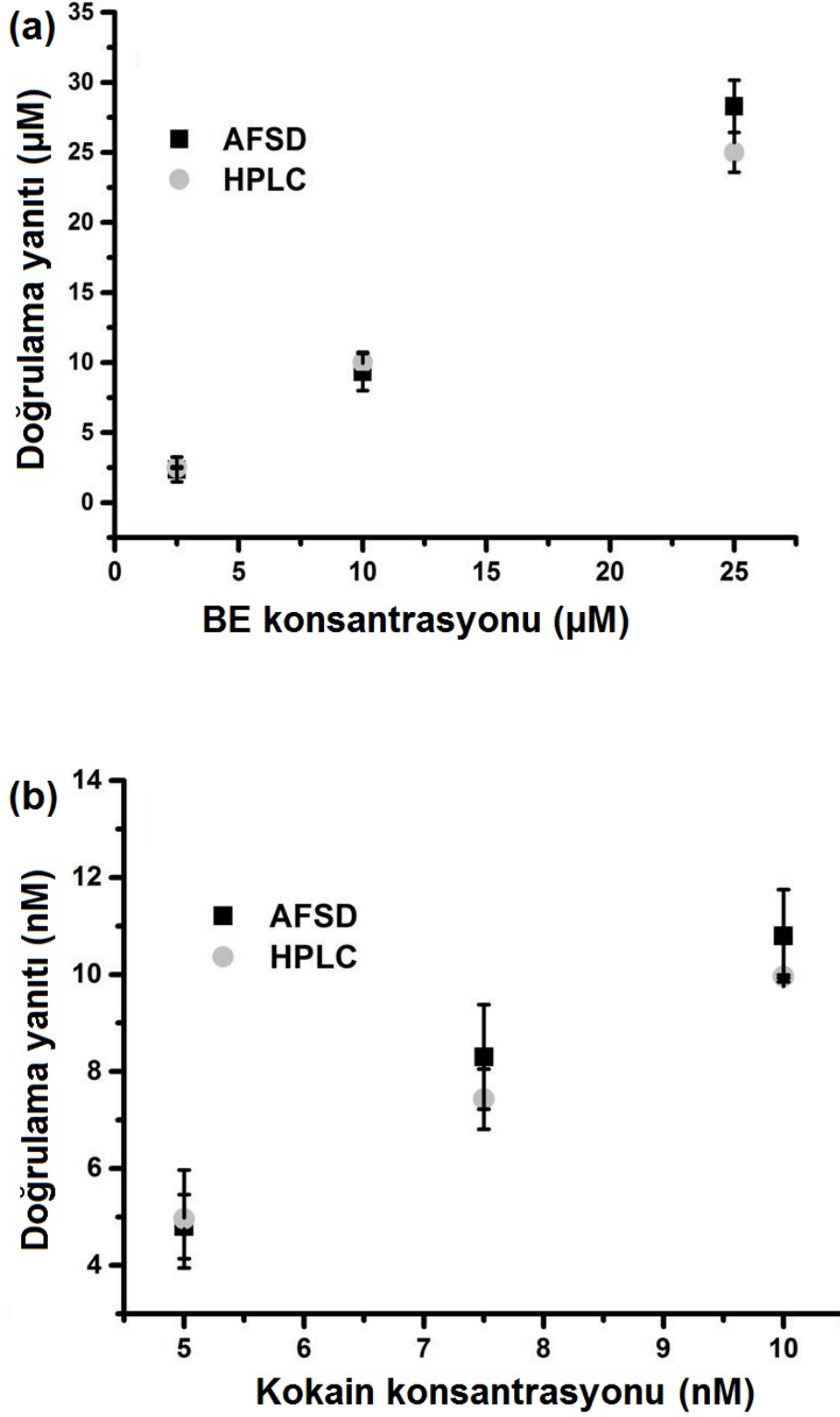
	BE	Kokain
Lineer aralık	1,0 - 25 µM	1,0 – 10 nM
Eğim	0,72 µM/Δa.u.	30,55 nM/Δa.u.
Kesme noktası	10,07	16,55
Kesme noktası-std sapma	0,231	8,17
Eğim-std sapma	0,017	1,33
Belirleme katsayısı	0,998	0,994
Dedeksiyon limiti	1,66 µM	0,138 nM
Tekrarlanabilirlik (±Std sapma)	0,167	0,112
Varyasyon katsayısı	% 6,9	% 2,49

Sentetik idrar örneklerine standart katma yöntemiyle BE ve kokain eklenerek hem AFSD hem de kromatografi ile analizlenmiştir. Elde edilen sonuçlar birbiri ile uyumludur (Çizelge 3.5).

Çizelge 3.5 AFSD ile örnek uygulama ve kromatografik doğrulama.

Biyolojik matriks	Standart katma	AFSD yanıtı	HPLC yanıtı
Sentetik idrar (BE)	2,5 µM	2,94 µM	725,3±3,2 ng/mL (2,5 µM BE: 725 ng/mL)
		% Geri kazanım % 94,93	
Sentetik idrar (Kokain)	5,0 nM	4,8 nM	1,57±0,0086 ng/mL (5,0 nM kokain: 1,69 ng/mL)
		% Geri kazanım % 96	

Şekil 3.11 farklı konsantrasyonlarda BE ve kokain eklenen sentetik idrar örneklerine AFSD ve HPLC ile alınan yanıtların paralel, yani uyumlu olduğunu göstermektedir.

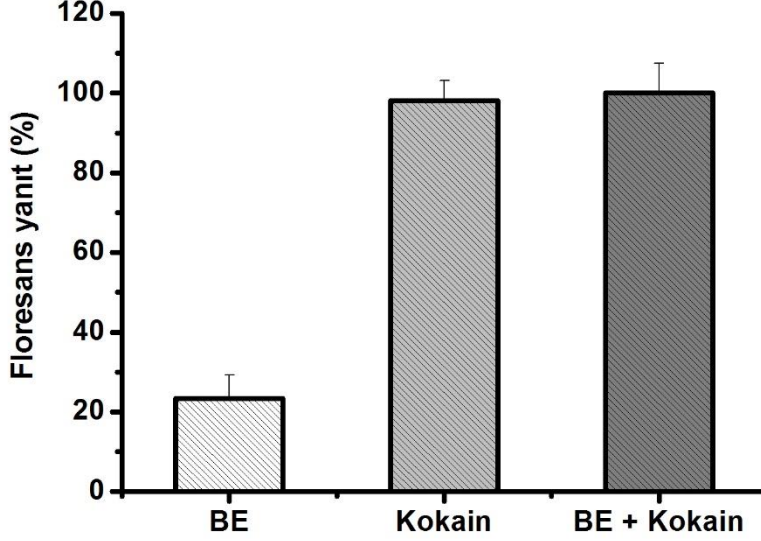


Şekil 3.11 Farklı konsantrasyonlarda standart katma ile hazırlanmış sentetik idrar örneklerinin AFSD ile analizlenmesi ve HPLC ile doğrulanması.
BE: 2,5, 10, 25 μM ve Kokain: 5,0, 7,5, 10 nM

Bugüne kadar yapılan çalışmalar, kokain aptamerinin kokaine kıyasla BE'ye daha düşük bağlanma affinitesi gösterdiğini belirtmiştir (Guler et al, 2017). AFSD ile elde edilen yanıtlara göre de BE uygulandığında kokaine kıyasla daha düşük sinyal yanıtları elde edilmiştir. Aynı zamanda kokain için elde edilen lineer aralık, eğim, LOD gibi analitik performans sonuçları BE'ye göre daha iyidir. BE için elde edilen düşük floresans sinyallere rağmen BE'nin artan konsantrasyonlarına karşı artan floresans yanıtlar arasında bir korelasyon olduğu da oldukça açıktır. AFSD test sisteminin BE ile çalışıyor olması geliştirilen test kitinin pratik uygulamaları açısından değerlidir. Çünkü kokainin intravenöz, intranazal, oral, sigara şeklinde içme ve deri altından alma gibi farklı yollardan kullanıldıktan sonraki farmakokinetik özellikleri detaylı bir şekilde araştırılmıştır (Brunetto et al., 2005) ve kokainin metabolitlerine dönüşümünün çok hızlı olduğu belirtilmiştir. BE kokainin majör metabolitidir ve idrarda bulunan kokain miktarı BE'nin %10'undan daha azdır. Bu nedenle kokain dedeksiyon teknolojileri biyolojik sıvılarda BE analizine odaklanmıştır (Smith et al., 2010). Kokain ve BE'nin yarılanma ömürleri sırasıyla 1-1,5 saat ve 6-8 saattir (Vidal et al., 2016). Kokain 12-24 saat sonra idrardan uzaklaşırken BE 48 saat kalabilir (Preston et al., 2002). Fakat kronik kokain kullanıcılarında bu süre hem kokain hem de BE için hem tükürük hem de idrarda uzamaktadır (Da Costa et al., 2009). Dolayısıyla hem kokainin hem de metaboliti BE'nin vücut sıvılarında dedekte edilmesi adli toksikoloji ve klinik toksikoloji açısından değerlidir. Buna dayanarak AFSD test platformunun hem BE'yi hem de kokaini dedekte edebiliyor olması bu test sisteminin avantajlı yönlerindedir.

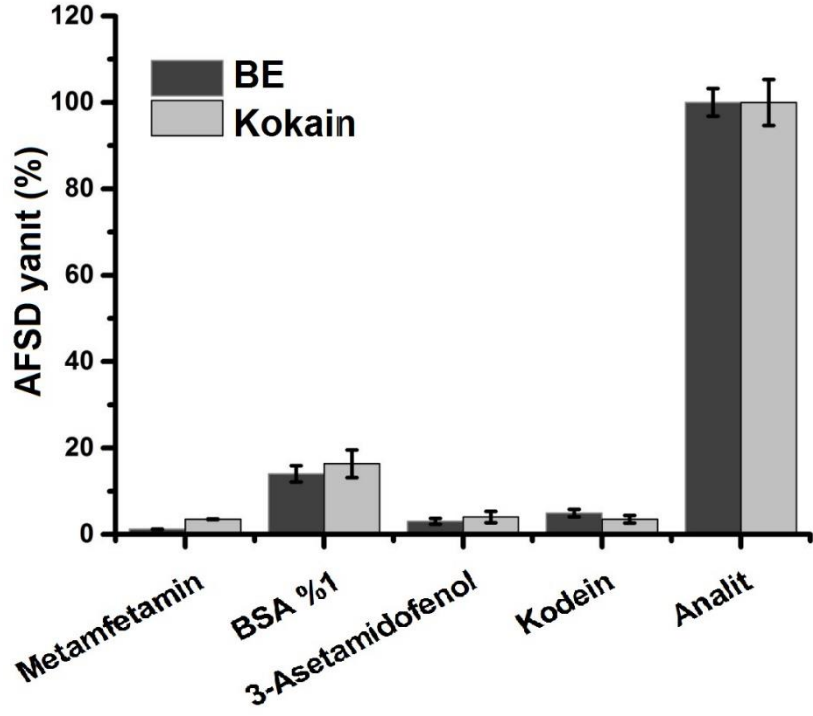
Çalışmanın bir başka adımında ise; test sistemine kokain ve BE aynı anda uygulandığında alınabilecek test yanıtını araştırmak amacıyla iki madde birlikte teste uygulandı. Bu amaçla 2,5 μ M BE ve 5,0 nM kokain AFSD test sisteminde aynı kuyucuğa eklendi ve ayrı ayrı eklendiklerinde alınan yanıtlar ile kıyaslandı. Şekil 3.12'de görüldüğü gibi her iki madde birlikte uygulandığında alınan test yanıtı, sadece kokain için alınan yanıt ile aynı değerdedir. Bu sonuç şu şekilde açıklanabilir; AFSD test sistemine kokain ve BE aynı anda uygulandıklarında test yüzeyi kokaine olan yüksek affinitesi nedeniyle kokaine daha hızlı ve daha yüksek verimle bağlanma eğilimindedir. Diğer yandan BE'nin yarılanma ömrü

kokainden daha uzun olduğu için biyolojik sıvılarda BE analizi de AFSD ile mümkün olabilecektir.



Şekil 3.12 AFSD sistemine Kokain ve BE eş zamanlı uygulandıında elde edilen yanıt.

Şekil 3.13 test sistemine bazı girişimciler uygulandıında alınan yanıtları göstermektedir. Şekil 3.13'te görüldüğü gibi BE ve kokaine kıyasla diğer maddeler test sisteminde girişime neden olmamıştır. Aptamerin kokain ve metaboliti BE'ye olan seçimliliği sayesinde geliştirilen test sisteminde çapraz reaktivite problemi gözlenmemiştir.



Şekil 3.13 Girişim yapma potansiyeli olan maddelerin AFSD test sistemine uygulandığında alınan test yanıtları.

3.3. Mobil LFA Kitine İlişkin Sonuçlar

3.3.1. Test membranlarının hazırlanmasına ilişkin optimizasyonlar

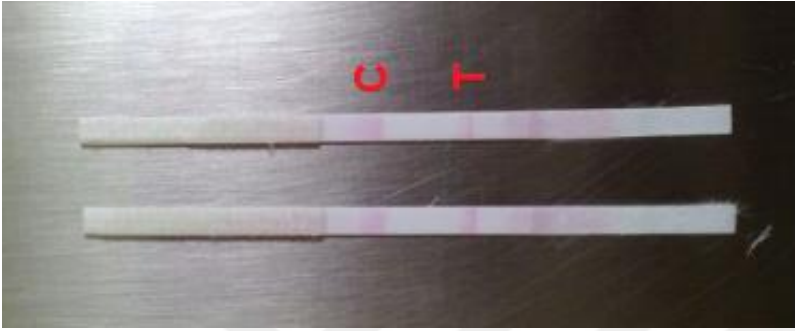
İlk olarak konjugat ped bloklama solüsyonunun belirlenmesi için 3 farklı bloklama çözeltisi hazırlandı ve testin çalışması kontrol edildi. Burada amaç konjugat ped bloklamasının konjugatların pedten salımına etkisini araştırmaktır. Farklı konjugat ped ön işlemleri ile hazırlanan bazı testlere ilişkin görüntüler aşağıda verilmiştir. Testlerin hazırlanmasında kullanılan konjugat hazırlama ve sample ped hazırlama işlemleri metot kısmında verildiği gibidir.



Şekil 3.14 Bloklama solüsyonu 1 ile hazırlanan kit.



Şekil 3.15 Bloklama solüsyonu 2 ile hazırlanan kit.



Şekil 3.16 Bloklama solüsyonu 3 ile hazırlanan kit.

Kit geliştirilmesinde kullanılan membranlar ve pedler için çeşitli bloklama işlemleri gerçekleştirilmiştir.

Konjugat ped için 3 farklı bloklama çözeltisi hazırlanarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Farklı BSA miktarlarına sahip bu 3 çözeltiden % 4 BSA içeren bloklama solüsyonu (Şekil 3.16) ile hazırlanan kitlerde, AuNP-Antikor konjugatlarının daha rahat konjugat pedden ayrıldığı gözlemlenmiştir. Diğerlerinde ise (Şekil 3.14 ve Şekil 3.15) AuNP konjugatlarının pedten ayrılmadığı ve hareket etmediği gözlenmiştir.

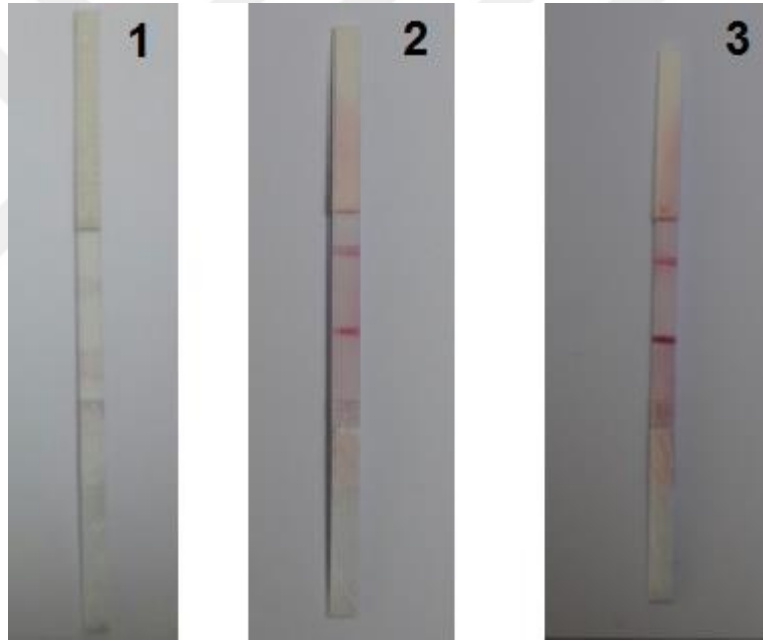
Nitroselüloz membran için ise iki farklı bloklama solüsyonu hazırlanarak LFA düzenekleri hazırlanmıştır. İkinci bloklama solüsyonu (1X TBS prosedürü) ile AuNP konjugatları analitik dedeksiyon bölgesinde daha rahat yürümüş ve bunun yanında test ve kontrol çizgilerinin daha rahat görülebilmesi sağlanmıştır.

Metot kısmında da verildiği gibi 1. 2. ve 3'e ek olarak 4. Bloklama çözeltisi de, konjugat pedin hazırlanmasında kullanıldı. Burada hedef, AuNP konjugatlarının konjugat pedten kolayca salınabilmesini ve görülebilir sinyaller oluşturabilecek şekilde stabilitesini korumasını sağlamaktır. Bunun için konjugat ped 3 farklı şekilde hazırlandı.

1. AuNP konjugatı (75 μ L), 175 μ L 4. bloklama solüsyonu ile seyreltildi.
2. AuNP konjugatı (150 μ L), 350 μ L 4. bloklama solüsyonu ile seyreltildi.
3. AuNP konjugatı sentezdeki yıkama adımından sonra 250 μ L 4. bloklama solüsyonu ile resüspanse edildi.

Yukarıdaki koşullarda hazırlanan AuNP konjugatları, aynı boyutlarda kesilen konjugat pedlere emdirildi ve 2 saat, 37°C’de, %20 nem altında kurutuldu.

1 ve 2 de konjugatlar aynı oranda seyreltildi fakat aynı boyuttaki konjugat pede emdirilen hacim 2’de 1’in iki katıydı. 3 noluda ise konjugat seyreltilmeden doğrudan solüsyonla resüspanse edildi. Bu 3 farklı konjugat pedin hazırlanmasındaki amaç hangisinde oluşan sinyallerin daha belirgin olacağını belirlemektir.



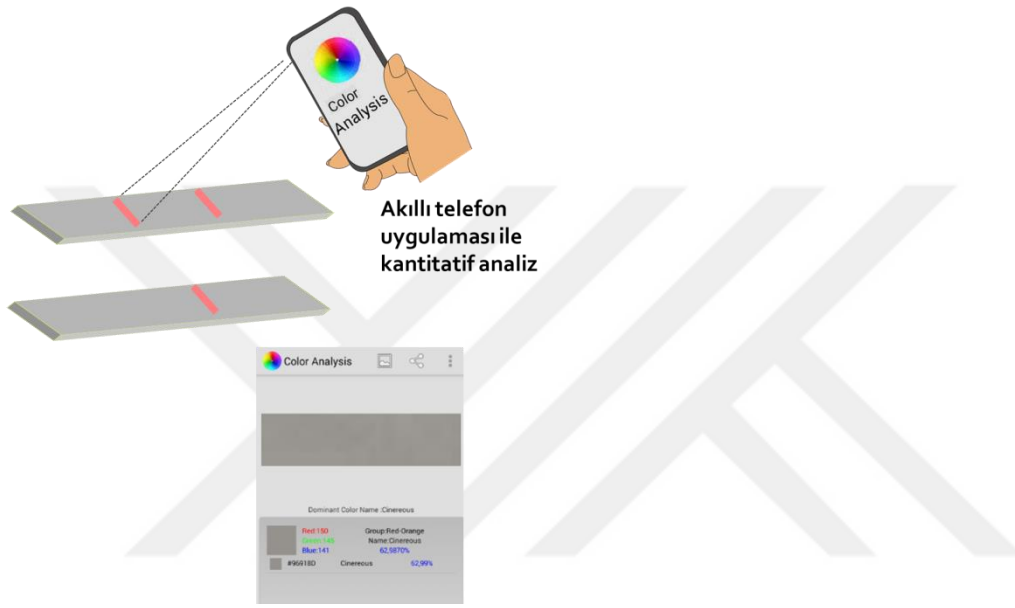
Şekil 3.17 Farklı seyreltmelerde hazırlanan AuNP konjugatları ile oluşturulan test ve kontrol çizgileri.

Şekil 3.17’de de görüldüğü gibi 2 ve 3 nolu konjugat ped koşulları için daha belirgin test ve kontrol çizgileri gözlemlendi.

3.3.2. Cep telefonuna entegre LFA testi ile kokain analizi

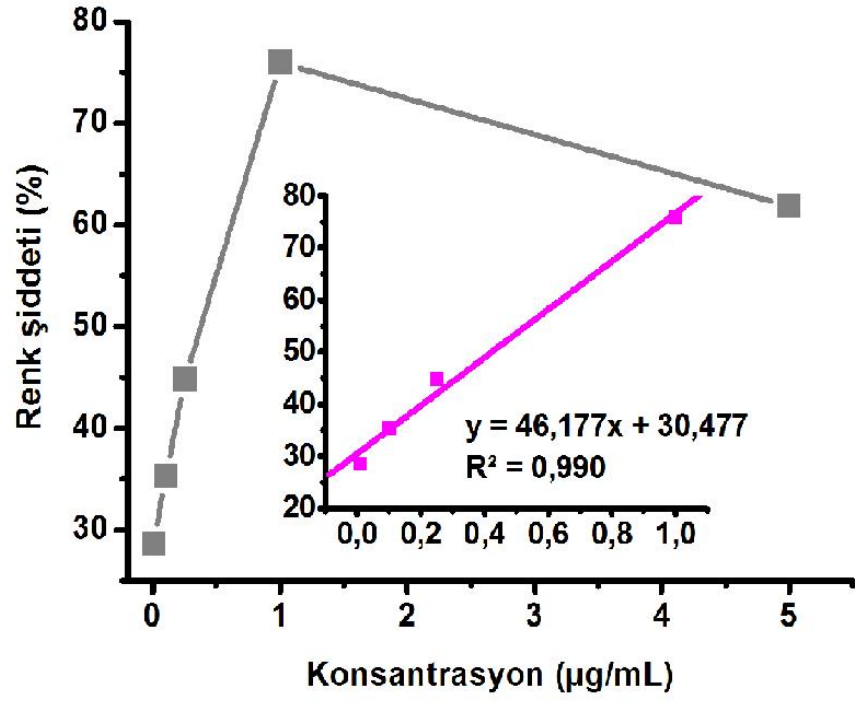
Metot kısmında da açıklandığı gibi hazırlanan test membranlarına farklı konsantrasyonlarda kokain standart çözeltileri eklendi. Kokain varlığında, test çizgisinde bulunan β -CD birimleri kokaini yakalar ve sonrasında AuNP/Anti-

Kokain konjugatları da test çizgisinde bulunan kokaine bağlanır. Böylece test çizgisinde renk oluşur. Diğer yandan kokain miktarına bağlı olarak bağlanan AuNP konjugatları miktarı da arttığı için renk şiddeti de artmaktadır. Renk şiddeti ve kokain konsantrasyonu arasındaki bu korelasyondan faydalanılarak kalibrasyon grafiği elde edildi. Renk şiddeti değerleri, cep telefonu uygulaması Color Analysis ile ölçüldü (Şekil 3.18). Kalibrasyon grafiğinde de görüldüğü gibi, kokain için lineer aralık 0,01 $\mu\text{g/mL}$ – 1,0 $\mu\text{g/mL}$ olarak bulunmuştur (Şekil 3.19).

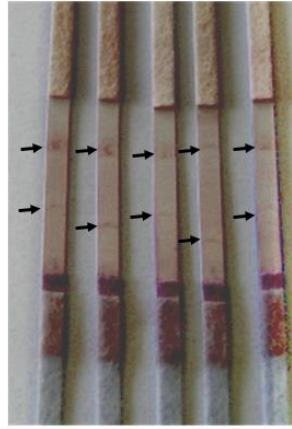


Şekil 3.18 Cep telefonu ile sinyallerin ölçülmesi-şematik gösterim.

Tez projesinde geliştirilen, cep telefonu ile sinyalleri ölçülen β -CD/LFA kokain test kitine girişim yapma potansiyeli olan bazı maddeler uygulandı. Şekil 3.20’de de görüldüğü gibi, BE (BE), nikotin, kotinin, kodein, tetrahidrokannabinol (THC) ve metamfetamin (MET) uygulandığında testte yanlış pozitif yanıtı neden olmadıkları gösterilmiştir.

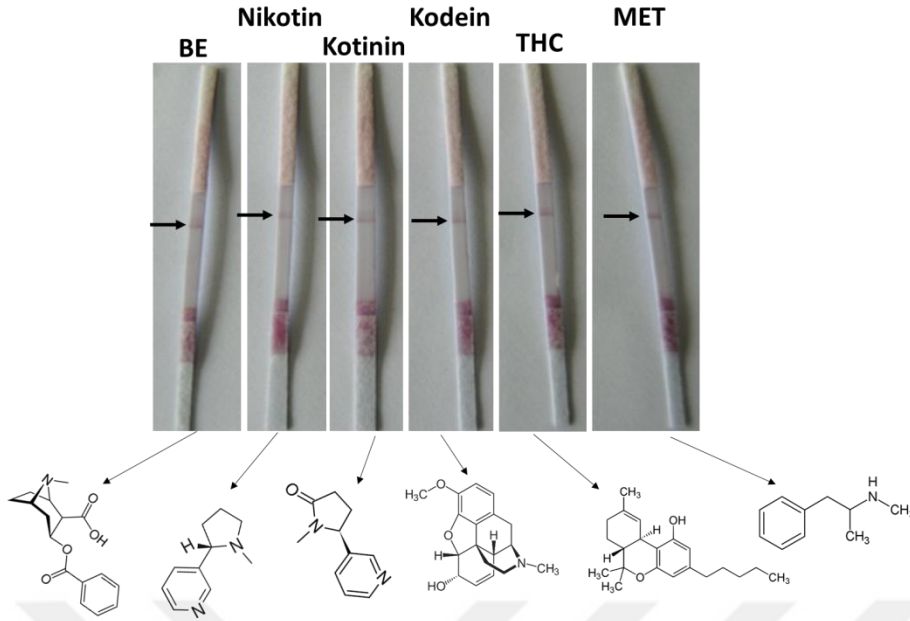


a. b. c. d. e.



a	b	c	d	e
5,0 µg/mL	1,0 µg/mL	0,25 µg/mL	0,10 µg/mL	0,01 µg/mL

Şekil 3.19 Geliştirilen β -CD/LFA ile kokain için alınan yanıtlar ve cep telefonu ile ölçülen renk şiddeti değerleri ile oluşturulan kalibrasyon grafiği.



Şekil 3.20 β -CD/LFA testine girişim yapma potansiyeli olan maddeler uygulandığında alınan yanıtlar. BE: Benzoilekonin; THC: Tetrahidrokannabinol; MET: Metamfetamin.

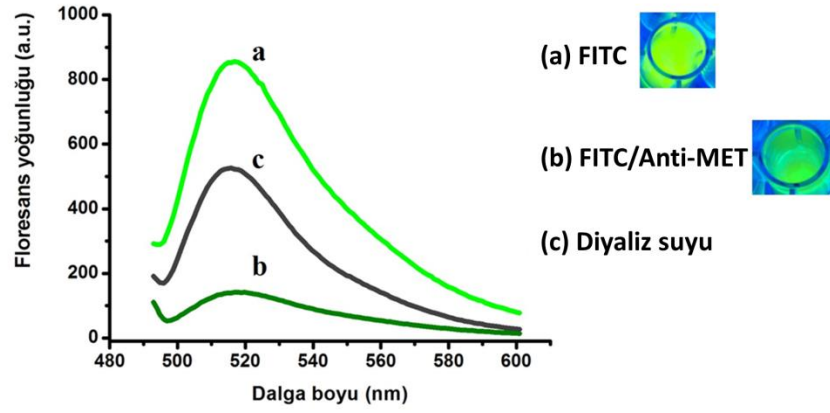
3.4. Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti

3.4.1. Biyokonjugatların karakterizasyonuna ilişkin bulgular

3.4.1.1. Floresans ölçümler

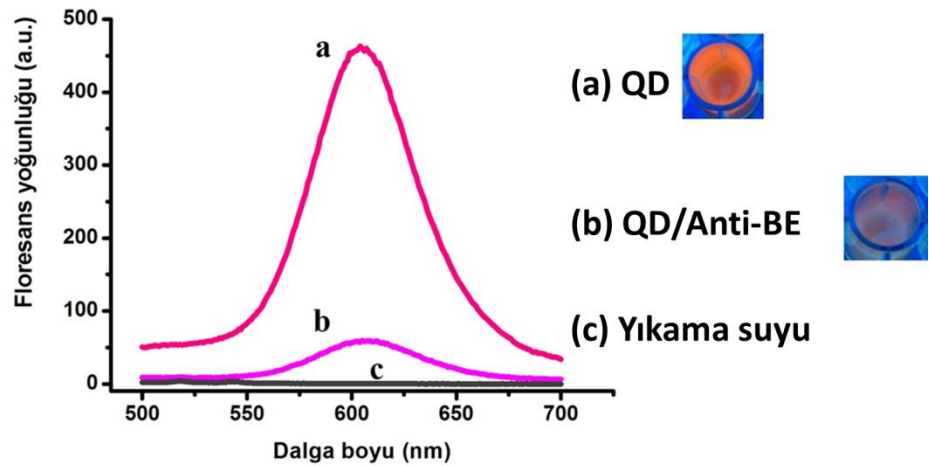
Hazırlanan biyokonjugatların karakterizasyonu için florimetri ile dalga boyu taramaları yapıldı. Bunun için hem serbest FITC ve QD hem de antikorlar ile biyokonjuge halleri (FITC/Anti-MET ve QD/Anti-BE) florimetri ile uygun dalga boylarında ölçüldü. Aynı zamanda bağlanmayan maddelerin uzaklaştırıldığı diyaliz suyu/yıkama suyu da ölçüldü. Şekil 3.21’de görüldüğü gibi FITC’nin floresans şiddeti antikor ile modifiye edildikten sonra azalmaktadır. Reaksiyon sonrasında floresans maddenin floresans şiddetinde azalma olması iki şekilde açıklanabilir: Birincisi floresans maddeler başka maddelerle bağlanma reaksiyonuna sokulduklarında floresans özelliklerinde azalma ya da tamamen sönümlenmeleri söz konusu olabilmektedir. İkincisi ise; floresans moleküllerin hepsi reaksiyona girmemiş olabilir ve bağlanmayanlar reaksiyon sonrası saflaştırma aşaması sırasında uzaklaştırılmış olabilir. Şekil 3.21’de görüldüğü gibi diyaliz suyunda da floresans pik elde edilmiş olması antikor ile bağlanmayan FITC moleküllerinin de olduğunu ve diyaliz işlemi sonrasında uzaklaştırıldığını

göstermektedir. Tüm bu veriler anti-MET antikorunun FITC ile işaretlendiğini doğrulamaktadır.



Şekil 3.21 FITC, FITC/Antikor biyokonjugatı ve diyaliz suyuna ilişkin floresans spektrumları ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: ~492 nm/518 nm)

QD, QD/Antikor biyokonjugatı ve yıkama suyuna ilişkin floresans pikler ise Şekil 3.22'de verilmiştir. Grafikten de görüldüğü gibi Anti-BE ile bağlanma sonrasında QD'lerin floresans yoğunluğunda azalma oldu. Yıkama suyunda ise dedekte edilebilir bir sinyal elde edilmedi. Buna göre QD'lerin yüzeyinin antikorlarla kaplanması sonrasında floresans özelliğinde azalma olduğu söylenebilir. Azalma olması da QD'lerin yüzeyinin antikor ile modifiye edildiğini destekler niteliktedir.



Şekil 3.22 QD, QD/Antikor biyokonjugatı ve yıkama suyuna ilişkin floresans spektrumları ($\lambda_{ex}/\lambda_{em}$: ~380 nm/606 nm)

Aynı zamanda her iki floresans materyal ve biyokonjugatları için UV lamba altında çekilen fotoğrafları da konjugasyon sonrası floresans şiddetlerinde gözle görülür bir azalma olduğunu göstermektedir. Bu da florimetri ölçümleri ile uyumlu bir sonuç olması açısından önemlidir.

3.4.1.2. Partikül boyutu ve yüzey yükü ölçümleri

Bu aşamada QD ve QD/Antikor biyokonjugatının partikül boyutları ve yüzey yükleri DLS cihazı ile ölçüldü. Buna göre QD ve biyokonjugatı için elde edilen veriler Çizelge 3.6'da verilmiştir. Çizelge 3.6'da da görüldüğü gibi biyokonjugasyon sonrasında partikül boyutu arttı. Partikül boyutunun artması antikorların QD yüzeyine bağlandığını doğrulamaktadır. Diğer yandan QD'lerin yüzey yükü konjugasyon öncesinde -38,40 iken konjugasyon sonrasında -11,52 olarak ölçüldü. QD'ler yüzeyinde -COOH grupları bulundurduğu için başlangıçta negatif yüklü olması beklenen bir durumdur. Konjugasyon sonrasında ise yüzey yükünün pozitif yönde kayması; negatif yüzey yüküne neden olan -COOH gruplarına antikorların bağlanması ile açıklanabilir.

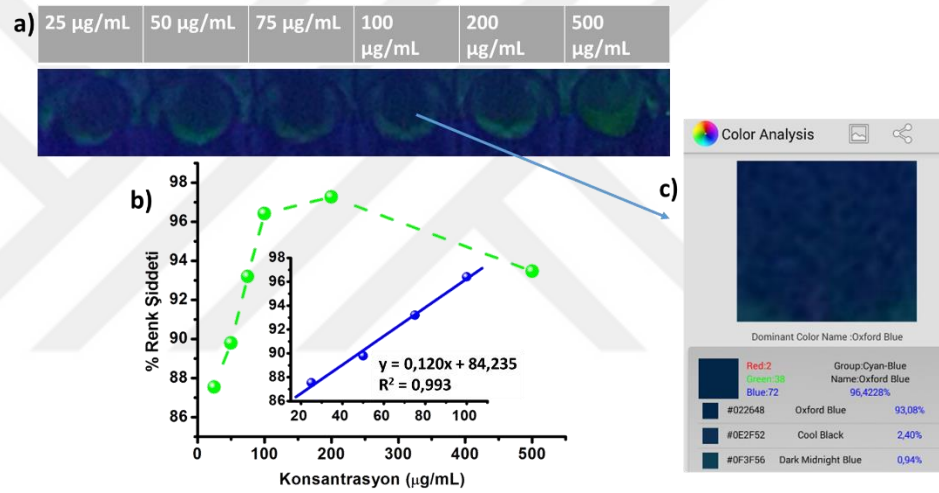
Çizelge 3.6 QD ve Antikor biyokonjugatı için partikül boyutu ve yüzey yükü sonuçları

	Partikül Boyutu (nm)	Yüzey Yükü (mV)
QD	10,95 ± 0,85	-38,40 ± 1,56
QD/Anti BE antikor	45,56 ± 1,25	-11,52 ± 0,98

3.4.2. Mobil floresans mikropilaka test kiti- Met analizi

Metot (Bölüm 2.7.3 ve 2.7.4) kısmında detaylı bir biçimde anlatıldığı gibi 96 kuyucuklu plakada tasarlanan test platformuna analizi hedeflenen maddenin (MET ya da BE) artan konsantrasyonlarda standartları eklendi. Daha sonra analite spesifik olan antikor ile modifiye edilmiş floresans materyal eklendi. Testin her aşamasında yıkamalar yapıldı ve bağlanmayan maddeler uzaklaştırıldı. Son aşamada ise UV lamba altında görüntülenen test sisteminde oluşan floresans renk şiddetleri cep telefonu uygulaması ile dedekte edildi. Şekil 3.23 (a)'ya bakıldığında MET'in artan konsantrasyonları (25, 50, 75, 100, 200 ve 500 µg/mL) için kuyucuktaki floresans yoğunluğunda artış olduğu gözle görülmektedir. Bu beklenen bir sonuçtur, çünkü kuyucukta ne kadar madde var ise o kadar floresans

konjugat (FITC/Anti-MET) ona bağlanır ve dolayısıyla konsantrasyon arttıkça floresans şiddeti de artar. Şekil 3.23 (c) ise telefon uygulamasının arayüzünü göstermektedir ve 100 µg/mL örnek içeren kuyucuk için alınan % renk yoğunluğu sonucunu vermektedir. Bu şekilde her kuyucuğun uygulamada analiz edilmesi ile her bir konsantrasyon için renk yoğunlukları belirlendi. Ölçülen bu yanıtlar konsantrasyona bağımlı olarak grafiğe aktarıldı ve elde edilen doz-yanıt grafiği Şekil 3.23 (b)'de verildi. Şekil 3.23 (b)'de içteki grafik ise kalibrasyon grafiğidir ve 25-100 µg/mL lineer aralığı için hesaplanan kalibrasyon denklemi $y = 0,120x + 84,235$ ($R^2 = 0,993$)'dir. Elde edilen kalibrasyon denklemi, örnek uygulama aşamasında standart katma ile hazırlanmış sentetik tükürük ve sentetik idrar örneklerinin konsantrasyonlarının hesaplanmasında kullanıldı.

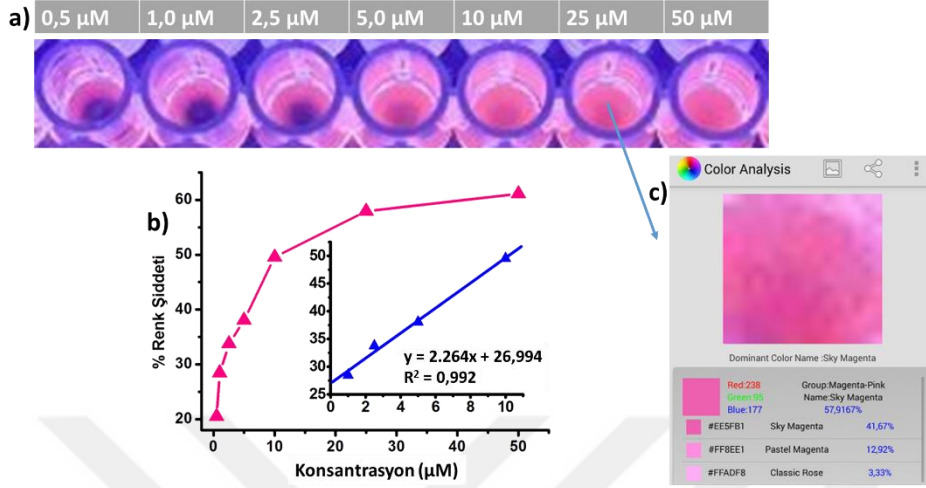


Şekil 3. 23 a) Geliştirilen test sistemi ile artan MET konsantrasyonlarına alınan floresans yanıt, b) Mobil floresans mikropilaka test kiti ile MET için doz-yanıt grafiği (İçteki grafik: MET kalibrasyon grafiği), c) Cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile renk analizi.

3.4.3. Mobil floresans mikropilaka test kiti- BE analizi

Şekil 3.24 (a) artan konsantrasyonlarda BE standartları eklenen test plakasının UV lamba altında görüntüsünü vermektedir. MET analizinde olduğu gibi konsantrasyon arttıkça renk yoğunluğunun arttığı belirgin bir şekilde gözlenmektedir. İki maddenin analizi arasındaki fark; MET analizinde FITC floresans işaretleyicisinin kullanılması, BE de ise QD floresans nanoparçacığının kullanılmasıdır. Dolayısıyla MET analizinde elde edilen floresans sinyaller yeşil iken BE analizinde oluşan floresans yanıtlar kırmızı/pembe renklidir. Cep telefonu ile analizlenen renk yoğunlukları kullanılarak (Şekil 3.24 (c)), doz-yanıt grafiği

oluşturuldu (Şekil 3.24 (b)). Elde edilen verilere göre BE için linear aralık 1,0-10 mM olarak belirlendi ve kalibrasyon denklemi $y=2,264x+26,994$ ($R^2=0,992$) olarak heaplandı.



Şekil 3. 24 a) Geliştirilen test sistemi ile artan BE konsantrasyonlarına alınan floresans yanıt, b) Mobil floresans mikroparka test kiti ile BE için doz-yanıt grafiği (İçteki grafik: BE kalibrasyon grafiği), c) Cep telefonu uygulaması olan Color Analysis ile renk analizi.

3.4.4. Mobil floresans mikroparka test kiti- Kromatografik doğrulama

Çalışmanın son aşamasında ise geliştirilen test kitinin ürün adayı olma potansiyeli araştırıldı. Geliştirilen test sistemi ürün olarak düşünüldüğünde tükürük veya idrarda hızlı ve yerinde madde analizi için planlandı. Özellikle tükürükte analize imkan tanınması pratiklik ve yerinde uygulama açısından büyük önem arz etmektedir. Bu nedenle gerçek örneklerle çalışılmasa da laboratuvarda sentetik olarak hazırlanan tükürük ve idrar örnekleri ile araştırma yapıldı. Bu sentetik biyolojik sıvılara standart katma ile MET ya da BE eklendi ve test kiti ile analizleri yapıldı. Elde edilen bulgular LC-MS/MS analizleri ile doğrulandı. Böylece geliştirilen mobil floresans mikroparka temelli test sisteminin sentetik biyolojik sıvılarda çalışma performansı araştırıldı. Çizelge 3.7’de görüldüğü gibi tez projesinde geliştirilen test sistemi hem MET hem de BE’nin sentetik tükürük ve idrarda başarılı bir şekilde analizine imkan sağladı. % Geri kazanım sonuçları hem geliştirilen test kiti hem de kromatografik sonuçlar için hesaplandı (Çizelge 3.7)

Çizelge 3.7 Sentetik biyolojik sıvılarda örnek uygulama ve kromatografik doğrulama

	Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti yanıtı (µg/mL)	Mobil Floresans Mikroplaka Test Kiti % Geri kazanım	Kromatografi yanıtı (µg/mL)	Kromatografi % Geri kazanım
MET (Standart katma: 50 µg/mL)				
Sentetik tükürük	53,41	106,82	54,65	103,53
Sentetik idrar	52,66	105,32	54,10	108,2
BE (Standart katma: 10 µM)				
Sentetik tükürük	10,46	104,6	9,03	90,3
Sentetik idrar	9,87	98,7	9,93	99,3

4. GENEL DEĞERLENDİRME

POC dedeksiyon teknolojileri; yerinde, hızlı ve pratik bir biçimde klinik bir konu hakkında diagnostik sonuca ulaşmayı sağlamaları açısından geleceğin teknolojisi olarak gösterilmektedir. Hastaya (kişiye) yakın bölgede ya da hastanın (kişinin) bulunduğu yerde hızlı bir şekilde test yapılabilmesi hastaya verilen bakımda ya da kişiyle ilgili bir durumun değerlendirilmesinde kritik olabilmektedir. Söz konusu POC ürünleri sadece sağlık alanı için değil iş güvenliği, ulaşım, emniyet gibi alanlar için de geniş bir kullanıcı ağına sahiptir. POC diagnostik kitler yasadışı maddelerin hızlı ve yerinde dedeksiyonu açısından da büyük öneme sahiptir.

Bağımlılık yapıcı özelliği olan, kullanımı yasal olmayan ya da keyif alma amacıyla kullanılan ve üretilen maddeler günümüzde maalesef önemli bir yer kazanmıştır. Kötüye kullanımı geçmiş tarihlere dayanan ya da yeni tasarlanmış bu maddelerin çeşitliliğinin ve kullanımının artması, bu maddelerle ilgili problemlerin farklı alanlarda karşımıza çıkmasına neden olmuştur. Madde kullanımının oluşturduğu sorunlar, sağlık, adli durumlar, bazı işyerlerinde ve trafikte olmak üzere farklı alanlarda madde kullanımının tespitini zorunlu hale getirmiştir. Günümüzde bu amaca hizmet eden diagnostik kitler mevcut olmakla birlikte her geçen gün çeşitliliği artan madde profiline paralel olarak hızla adapte edilebilecek tanı kitlerinin tasarımı oldukça önemli bir gerekliliktir. Ayrıca ülkemiz için bu durum değerlendirildiğinde, ilgili ürünlerin yerli üretiminin olmaması bu ürünlerin yerleştirilmesini de değerli kılmaktadır.

Tüm bu bilgiler ışığında, madde kullanımının tespitinin ve takibinin ne kadar büyük öneme sahip olduğu açıktır. Bu tez projesi kapsamında, bu gereksinime karşılık verebilecek yeni metodolojik yaklaşımlarla tasarlanmış test sistemlerinin geliştirilmesi amaçlanmıştır. Yeni metotlar uygulanarak mevcut ürünlerin eksiklik ya da dezavantajlarının giderilmesi amaçlanmıştır. Bu kapsamda farklı yüzey kimyası ve biyokonjugasyon teknikleri kullanılarak yenilikçi test kitleri tasarlandı. Farklı dedeksiyon prensibine ve tasarıma sahip dört test kiti prototipi proje çıktılarını oluşturmaktadır. Geliştirilen test kitlerinde uygulanan ölçüm prensibi ve teknikleri, materyal kimyası ve analitik uygulamaları detaylı bir şekilde açıklandı.

Proje çıktısı test kitleri, tasarımı yapıldıktan sonra, biyolojik sıvı örneklerine (sentetik tükürük, sentetik idrar gibi) başarılı bir şekilde uygulandı ve kromatografik tekniklerle doğrulaması yapıldı. Tez projesinin çıktıları ve avantajları aşağıda sınıflandırılmıştır;

- **Yerinde ve pratik bir biçimde madde analizi:**

Tez projesinin çıktısını oluşturan yerinde uygulanabilir, cep telefonuna entegre çalışabilen madde testleri başarılı bir şekilde hazırlandı ve sentetik biyolojik matrikslerde örnek analizine imkan sağladığı kromatografik tekniklerle doğrulandı. Proje çıktısı test kitlerinin ticarileştirilmesi durumunda kişiden alınan tükürük veya idrar örneğinde hızlı bir biçimde madde kullanımının tespit edilmesi mümkün olabilecektir. Pratiklik açısından tükürük daha çok tercih edilebilir. Geliştirilen test kitleri yerinde uygulama için tasarlanmış olup ön tanı amaçlıdır, tabiki her on-site (yerinde uygulanan) testte geçerli olduğu gibi bu testler de kromatografik doğrulamaya gitmektedir.

- **Test sinyallerinin cep telefonu ile ölçülmesi:**

Geliştirilen test kitlerinden iki tanesinin test yanıtları cep telefonu uygulaması ile ölçülmüştür. Diğer test kitleri de cep telefonu ile analize kolaylıkla adapte edilebilir niteliktedir. Cep telefonlarının test kitlerine entegrasyonu, test sonuçlarının yerinde değerlendirilebilmesine olanak tanır. Dolayısıyla pahalı cihaz, ekipman ya da laboratuvara gereksinim ortadan kalkmaktadır. Günümüzde cep telefonlarını herkesin kullandığı düşünülürse ne kadar basit bir teknoloji olduğu açıktır. Bu yaklaşımdan dolayı geliştirilen Mobil madde testleri; **“mobil laboratuvar”** diyebileceğimiz bir teknolojidir.

- **Kantitatif sonuçlar alınması:**

Yerinde uygulanabilir testler genellikle kalitatif sonuçlar verir. Tez projesinde geliştirilen sistemler ise floresans okuyucu ya da cep telefonu ile kantitatif sonuçlar sağlamaktadır. Model seçilen maddeler için lineer grafikler oluşturulabildi ve örnek uygulama aşamaları başarıyla gerçekleştirildi. Ayrıca belirtilmesi gereken bir konu da Color Analysis uygulamasının bu amaçla kullanımı ilk kez bu tez projesi kapsamında gerçekleştirildi. Normalde

fotoğrafçılık alanında kullanılan bir programdır. Bu amaçla kullanılması projenin özgün bir yanıdır.

▪ **Farklı maddelerin analizine kolaylıkla adapte edilebilir olması:**

Model olarak seçilen kokain (ve metaboliti BE) ve MET maddeleri için tasarlanan test kitleri, tanıyıcı molekülün değiştirilmesi ile kolaylıkla başka maddelerin analizine adapte edilebilir.

▪ **Çok renkli (multi-color) testlerin tasarımı:**

Projede model maddeler için farklı dedeksiyon konjugatları kullanıldı ve dolayısıyla sinyaller farklı renklerde elde edildi. Bu renklerin sayısı artırılabilir ve tek platformda farklı maddelerin eş zamanlı analizi mümkün olabilir.

▪ **Farklı türden floresans materyaller ile başarılı bir şekilde çalışması:**

Geliştirilen test sistemleri; floresans boya ile işaretli lipozomlar, inorganik nanomateryal olan QD'ler, AuNP'ler ve organik bir florofor olan FITC'ler ile başarılı bir biçimde çalıştı. Böylece farklı sınıftan materyallerin bu amaçla kullanılabilirliğine ilişkin bilimsel veri elde edildi. Böylece dedeksiyon konjugatlarının sentezlenmesinde kullanılacak materyallerin türleri ve renklerinin çeşitlendirilebileceği sonucuna ulaşıldı.

▪ **Sentetik biyolojik sıvılarda analize uygun olması:**

Yerinde uygulanabilir bir test düşünüldüğünde özellikle tükürük örneği toplanması tercih sebebi olmaktadır. İdrar örneği de madde analizinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Her iki biyolojik matriks de sentetik olarak hazırlandı ve geliştirilen test kitlerine uygulandı. Test kitlerinin çalışma performansının matrikslerin varlığından etkilenmediği yani oluşan yanıt üzerinde herhangi bir girişime neden olmadığı gösterildi.

▪ **Yerli ürün aday olması:**

Madde kullanımının tespitine yönelik test kitlerinin yerli üretimi söz konusu değildir. Sadece madde test kitleri değil çok sayıda tıbbi tanı kiti yurt dışından temin edilmektedir. Bu anlamda da hem bir ilk olma hem de yerli ürün aday olma potansiyeline sahip proje çıktıları elde edilmiştir.

KAYNAKLAR DİZİNİ

- Andreotti, P.E., Ludwig, G.V., Peruski, A.H., Tuite, J.J., Morse, S.S. and Peruski, L.F.**, 2003, "Immunoassay of Infectious Agents", *Biotechniques*, 35(4): 850-859 pp.
- Baeumner, A.J., Jones, C., Wong, C.Y. and Price, A.**, 2004a, A generic sandwich-type biosensor with nanomolar detection limits, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(6):1587-1593 pp.
- Baeumner, A.J., Pretz, J. and Fang, S.**, 2004b, A universal nucleic acid sequence biosensor with nanomolar detection limits, *Analytical Chemistry*, 76(4):888-894 pp.
- Bang, G.S., Cho, S. and Kim, B.G.**, 2005, A novel electrochemical detection method for aptamer biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 21(6):863-870 pp.
- Bauer, G., Pittner, F. and Schalkhammer, T.**, 1999, Metal nano-cluster biosensors, *Mikrochimica Acta*, 131:107-114 pp.
- Bosker, W.M. and Huestis, M.A.**, 2009, Reviews Oral Fluid Testing for Drugs of Abuse, 1931(11): 1910-1931 pp.
- Brunetto, M.R., Delgado Cayama, Y., Gutiérrez Garcia, L., Gallignani, M. and Obando, M.A.**, 2005, Determination of cocaine and benzoylecgonine by direct injection of human urine into a column-switching liquid chromatography system with diode-array detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 37:115-120.
- Bulukin, E., Meucci, V., Minunni, M., Pretti, C., Intorre, L., Soldani, G. and Mascini, M.**, 2007, An optical immunosensor for rapid vitellogenin detection in plasma from carp (*Cyprinus carpio*), *Talanta*, 72(2):785-790 pp.
- Chan, W.C. and Nie, S.**, 1998, Quantum Dot Bioconjugates for Ultrasensitive Nonisotopic Detection, *Science*, 281(5385):2016-2018 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M. and Nie, S.,** 2002, Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging, *Current Opinion in Biotechnology*, 13(1):40-46 pp.
- Chandler, J., Gurmin, T. and Robinson, N.,** 2000, The place of Gold in Rapid Tests, *IVD Technology*, 6:37-49 pp.
- Conroy, P.J., Hearty, S., Leonard, P. and O’Kennedy, R.J.,** 2009, Antibody production, design and use for biosensor-based applications, *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 20(1):10-26 pp.
- Cooper, V.S. and Cooper, G.,** 2008, Drugs-of-Abuse Testing in Saliva or Oral Fluid. *Forensic science and medicine: Drug Testing in Alternate Biological Specimen*, 83-99 pp.
- Costa-Fernández, J.M., Pereiro, R. and Sanz-Medel, A.,** 2006, The use of luminescent quantum dots for optical sensing, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 25(3):207-218 pp.
- Daly, S., Dillon, P., Manning, B., Dunne, L., Killard, A. and O’Kennedy, R.,** 2002, Production and Characterization of Murine Single Chain Fv Antibodies to Aflatoxin B 1 Derived From a Pre-immunized Antibody Phage Display Library System, *Food and Agricultural Immunology*, 14(4):255-274 pp.
- Demirkol, D.O. and Timur., S.,** 2016, A sandwich-type assay based on quantum dot/aptamer bioconjugates for analysis of E. Coli O157:H7 in microtiter plate format, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 65: 85-90 pp.
- Da Costa, J.L., Tonin, F.G., Zanolli, L.A., Da Matta Chasin, A.A. and Tavares, M.F.M.,** 2009, Simple method for determination of cocaine and main metabolites in urine by CE coupled to MS, *Electrophoresis*, 30:2238-2244.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Edwards, K.A. and Baeumner, A.J.**, 2006, Optimization of DNA-tagged dye-encapsulating liposomes for lateral-flow assays based on sandwich hybridization, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 386(5):1335-1343 pp.
- Eltzov, E., Guttel, S., Low Yuen Kei, A., Sinawang, P.D., Ionescu, R.E. and Marks, R.S.**, 2015, Lateral Flow Immunoassays - from Paper Strip to Smartphone Technology, *Electroanalysis*, 27(9): 2116-2130 pp.
- Fowler, C.C., Navani, N.K., Brown, E.D. and Li, Y.**, 2008, “Aptamers and Their Potential as Recognition Elements for the Detection of Bacteria, Principles of Bacterial Detection: Biosensors”, Recognition Receptors and Microsystems, Editors: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A. Springer.
- Frens, G.**, 1973, Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions, *Nature Physical Science*, 241(105):20-22 pp.
- Gallardo, E. and Queiroz J.A.**, 2008, The role of alternative specimens in toxicological analysis, *Biomed. Chromatogr.* 22: 795–821 pp.
- Gao, W., Saqib, M., Qi, L., Zhang, W. and Xu, G.**, 2017, Recent advances in electrochemiluminescence devices for point-of-care testing. Current Opinion in *Electrochemistry*, 1-7 pp.
- Geoghegan, W.D.**, 1988, The effect of three variables on adsorption of rabbit IgG to colloidal gold, *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 36(4):401-407 pp.
- Geoghegan, W.D. and Ackerman, G.A.**, 1977, Adsorption of Horseradish Ovomucoid and Anti- Immunoglobulin To Colloidal for the Indirect Detection of Concanavalin a , Wheat Germ Anti- G on Cell Surfaces At the Electron Microscopic Level : a New Method , Theory and Application, *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 25:1187-1200 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Gopinath, S.C.B., Lakshmipriya, T., Chen, Y., Phang, W.M. and Hashim, U.,** 2016, Aptamer-based « point-of-care testing », *Biotechnology Advances*, 34(3): 198-208 pp.
- Gubala, V., Harris, L.F., Ricco, A.J., Tan, M.X. and Williams, D.E.,** 2012, Point of care diagnostics: Status and future, *Analytical Chemistry*, 84(2): 487-515 pp.
- Guler, E., Bozokalfa, G., Demir, B., Gumus, Z.P., Guler, B., Aldemir, E., Timur, S. and Coskunol, H.,** 2017a, An aptamer folding-based sensory platform decorated with nanoparticles for simple cocaine testing, *Drug Testing and Analysis*, 9: 578–587 pp.
- Guler, E., Yilmaz Sengel, T., Gumus, Z.P., Arslan, M., Coskunol, H., Timur, S. and Yagci, Y.,** 2017b, A Novel Approach for Mobile Phone Sensing of Cocaine in Lateral Flow Assay Combined with a Biomimetic Material, *Analytical Chemistry*, DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03017
- Halámek, J., Makower, A., Knösche, K., Skládal, P. and Scheller, F.W.,** 2005, Piezoelectric affinity sensors for cocaine and cholinesterase inhibitors, *Talanta*, 65:337-342 pp.
- Han, M., Gao, X., Su, J.Z. and Nie, S.,** 2001, Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules, *Nature biotechnology*, 19(7):631-635 pp.
- Ho, J.A.A., and Wauchope, R.D.,** 2002, A strip liposome immunoassay for aflatoxin B1, *Analytical Chemistry*, 74(7):1493-1496 pp.
- Ho, J.A.A., Zeng, S.C., Tseng, W.H., Lin, Y.J. and Chen, C.H.,** 2008, Liposome-based immunostrip for the rapid detection of Salmonella, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 391(2):479-485 pp.
- Hoogenboom, H.R.,** 2005, Selecting and screening recombinant antibody libraries, *Nature Biotechnology*, 23(9):1105-1116 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Jaiswal, J.K. and Simon, S.M.**, 2004, Potentials and pitfalls of fluorescent quantum dots for biological imaging, *Trends in Cell Biology*, 14(9):497-504 pp.
- Jianrong, C., Yuqing, M., Nongyue, H., Xiaohua, W. and Sijiao, L.**, 2004, Nanotechnology and biosensors, *Biotechnology Advances*, 22(7):505-518 pp.
- Kendall, L.V.**, 2007, Production of polyclonal antibodies. In: Howard GC, Kaser MR, editors. Making and using antibodies: a laboratory manual, CRC Press, Florida 31p.
- Khreich, N., Lamourette, P., Boutal, H., Devilliers, K., Créminon, C. and Volland, H.**, 2008, Detection of Staphylococcus enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as label for immunochromatographic testing, *Analytical Biochemistry*, 377(2):182-188 pp.
- Lambert, J.L. and Fisher, A.M.**, 2006, Diagnostic assays including multiplexed lateral flow immunoassays with quantum dots, Patent WO/2006/071247.
- Luppa, P.B., Müller, C., Schlichtiger, A. and Schlebusch, H.**, 2011, Point-of-care testing (POCT): Current techniques and future perspectives, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 30(6): 887-898 pp.
- Leem, H., Shukla, S., Song, X., Heu, S. and Kim, M.**, 2014, An Efficient Liposome-Based Immunochromatographic Strip Assay for the Sensitive Detection of SalmonellaTyphimurium in Pure Culture, *Journal of Food Safety*, 34(3):239-248 pp.
- Leenaars, M. and Hendriksen, C.F.M.**, 2005, Critical Steps in the Production of Polyclonal and Monoclonal Antibodies: Evaluation and Recommendations, *ILAR Journal*, 46(3):269-279 pp.
- Leuvering, J.H.W., Thal, P.J.H.M., Van der Waart, M. and Schuurs, A.H.W.M.**, 1981, A sol particle agglutination assay for human chorionic gonadotrophin, *Journal of Immunological Methods*, 45(2):183-194 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Linares, E.M., Kubota, L.T., Michaelis, J. and Thalhammer, S.,** 2012, Enhancement of the detection limit for lateral flow immunoassays: Evaluation and comparison of bioconjugates, *Journal of Immunological Methods*, 375(1-2):264-270 pp.
- Liu, C., Jia, Q., Yang, C., Qiao, R., Jing, L., Wang, L., Xu, C. and Gao, M.,** 2011, Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as color reagents, *Analytical Chemistry*, 83(17):6778-6784 pp.
- Mosiello, L., Laconi, C., Del Gallo, M., Ercole, C. and Lepidi, A.,** 2003, Development of a monoclonal antibody based potentiometric biosensor for terbuthylazine detection, *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 95(1-3):315-320 pp.
- Mudanyali, O., Dimitrov, S., Sikora, U., Padmanabhan, S., Navruz, I. and Ozcan, A.,** 2012, Integrated rapid-diagnostic-test reader platform on a cellphone, *Lab on a chip*, 12(15): 2678-86.
- Munoz-Berbel, X., Godino, N., Laczka, O., Baldrich, E., Muñoz, F.X., Del Campo F.J.,** 2008, "Impedance-Based Biosensors for Pathogen Detection, Principles of Bacterial Detection: Biosensors", Recognition Receptors and Microsystems. Editors: Zourob, M., Elwary, S., Turner, A., Springer,
- Murphy, C.J. and Coffey, J.L.,** 2002, Quantum dots: A primer. *Applied Spectroscopy*, 56(1).
- Page Faulk, W. and Malcolm Taylor, G.,** 1971, Communication to the editors. An immunocolloid method for the electron microscope, *Immunochemistry*, 8(11):1081-1083 pp.
- Palmer, H.,** 1999, Using antibodies: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 413p.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Park, J.M., Jung, H.W., Chang, Y.W., Kim, H.S., Kang, M.J. and Pyun, J.C.,** 2015, Chemiluminescence lateral flow immunoassay based on Pt nanoparticle with peroxidase activity, *Analytica Chimica Acta*, 853(1):360-367 pp.
- Posthuma-Trumpie, G.A., Wichers, J.H., Koets, M., Berendsen, L.B.J.M. and Van Amerongen, A.,** 2012, Amorphous carbon nanoparticles: A versatile label for rapid diagnostic (immuno)assays, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 402(2):593-600 pp.
- Qiu, W., Xu, H., Takalkar, S., Gurung, A. S., Liu, B., Zheng, Y., Guo, Z., Baloda, M., Baryeh, K. and Liu, G.,** 2015, Carbon nanotube-based lateral flow biosensor for sensitive and rapid detection of DNA sequence, *Biosensors and Bioelectronics*, 64:367-372 pp.
- Quesada-González, D. and Merkoçi, A.,** 2017, Mobile phone-based biosensing: An emerging « diagnostic and communication » technology, *Biosensors and Bioelectronics*, 92: 549-562 pp.
- Quesada-González, D. and Merkoçi, A.,** 2015, Nanoparticle-based lateral flow biosensors, *Biosensors and Bioelectronics*, 73:47-63 pp.
- Preston, K.L., Epstein, D.H., Cone, E.J., Wtsadik, A.T., Huestis, M.A. and Moolchan, E.T.,** 2002, Urinary elimination of cocaine metabolites in chronic cocaine users during cessation, *Journal of Analytical Toxicology*, 26:393-400.
- Roda, A., Micheli, E., Zangheri, M., Di Fusco, M., Calabria, D., and Simoni, P.,** 2016, Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 79: 317-325 pp.
- Rosenthal, S.J.,** 2001, Barcoding biomolecules with fluorescent nanocrystals, *Nature Biotechnology*, 19:621-622 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Rouen, D., Dolan, K. and Kimber, J.,** 2001, A Review of Drug Detection Testing and an Examination of Urine, Hair, Saliva and Sweat, *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 193(6): 61p.
- Sajid, M., Kawde, A. N. and Daud, M.,** 2015, Designs, formats and applications of lateral flow assay: A literature review, *Journal of Saudi Chemical Society*, 19(6):689-705 pp.
- Sheehan, K.C.,** 2007, Production of monoclonal antibodies. In: Howard GC, Kaser MR, editors. Making and using antibodies: a laboratory manual, CRC Press, Florida, 21p.
- Shiohara, A., Hoshino, A., Hanaki, K.-I., Suzuki, K. and Yamamoto, K.,** 2004, On the cyto-toxicity caused by quantum dots, *Microbiology and Immunology*, 48(9):669-675 pp.
- Shukla, S., Leem, H. and Kim, M.,** 2011, Development of a liposome-based immunochromatographic strip assay for the detection of Salmonella, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401(8):2581-2590 pp.
- Smith, M.L., Shimomura, E., Buddha, D.P., Cone, E.J., Darwin, W.D. and Huestis, M.A.,** 2010, Urinary excretion of ecgonine and five other cocaine metabolites following controlled oral, intravenous, intranasal, and smoked administration of cocaine, *Journal of Analytical Toxicology*, 34: 57-63 pp.
- Song, S., Wang, L., Li, J., Fan, C. and Zhao, J.,** 2008, Aptamer-based biosensors, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 27(2):108-117 pp.
- Spiehler, V., Baldwin, D., and Hand, C.,** 2000, Cut-off concentrations for drugs of abuse in saliva for DUI, DWI or other driving-related crimes. *Z Zagadnien Nauk Sadowych*, 42: 160-168 pp.
- St-louis, P.,** 2000, Status of Point-of-Care Testing : Promise, Realities, and Possibilities, 33(6), 427-440 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Syedmoradi, L., Daneshpour, M., Alvandipour, M., Gomez, F.A., Hajghassem, H. and Omidfar, K.,** 2017, Point of care testing: The impact of nanotechnology, *Biosensors and Bioelectronics*, 87: 373-387 pp.
- Szeitner, Z., András, J., Gyurcsányi, R. E. and Mészáros, T.,** 2014, Is less more? Lessons from aptamer selection strategies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 101:58-65 pp.
- Toh, S.Y.I, Citartan, M., Gopinath, S.C.B. and Tang, T.H.,** 2015, Aptamers as a replacement for antibodies in enzyme-linked immunosorbent assay, *Biosensors and Bioelectronics*, 64:392-403 pp.
- Vashist, S.K., Luppa, P.B., Yeo, L.Y., Ozcan, A. and Luong, J.H.T.,** 2015, Emerging Technologies for Testing., *Trends in Biotechnology*, 33(11): 692-705 pp.
- Verheijen, R., Stouten, P., Cazemier, G., and Haasnoot, W.,** 1998, “Development of a One-Step Strip Test For The Detection of Sulfadimidine Residues”, *Analyst*, 123 (12): 2437–2441 pp.
- Vidal, J.C., Bertolin, J. R., Bonel, L., Asturias, L., Arcos-Martinez, M.J. and Castillo, J.R.,** 2016, Rapid determination of recent cocaine use with magnetic particles-based enzyme immunoassays in serum, saliva, and urine fluids, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 125:54-61.
- Wang, Z., Zhi, D., Zhao, Y., Zhang, H., Wang, X., Ru, Y. and Li, H.,** 2014, Lateral flow test strip based on colloidal selenium immunoassay for rapid detection of melamine in milk, milk powder, and animal feed, *International Journal of Nanomedicine*, 9(1):1699-1707 pp.
- Wen, H. W., Borejsza-Wysocki, W., Decory, T. R. and Durst, R. A.,** 2005, Development of a competitive liposome-based lateral flow assay for the rapid detection of the allergenic peanut protein Ara h1, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382(5):1217-1226 pp.

KAYNAKLAR DİZİNİ (devam)

- Wong, R.C. and Tse, H.Y.**, 2005, *Drugs of Abuse, Body Fluid Testing*, Humana Press, New Jersey, 305p.
- Wong, R. and Tse, H.**, 2008, *Lateral Flow Immunoassay*, Humana Press, New York, 223p.
- Xie, Q.Y., Wu, Y.H., Xiong, Q.R., Xu, H.Y., Xiong, Y.H., Liu, K., Jin, Y. and Lai, W.H.**, 2014, Advantages of fluorescent microspheres compared with colloidal gold as a label in immunochromatographic lateral flow assays, *Biosensors and Bioelectronics*, 54:262-265 pp.
- Xu, S., Yuan, H., Xu, A., Wang, J. and Wu, L.**, 2011, Rapid synthesis of stable and functional conjugates of DNA/gold nanoparticles mediated by Tween 80, *Langmuir*, 27:13629-13634 pp.
- Yen, C.W., de Puig, H., Tam, J.O., Gómez-Márquez, J., Bosch, I., Hamad-Schifferli, K. and Gehrke, L.**, 2015, Multicolored silver nanoparticles for multiplexed disease diagnostics: distinguishing dengue, yellow fever, and Ebola viruses, *Lab Chip*, 15(7):1638-1641 pp.
- Zhang, G.P., Wang, X.N., Yang, J.F., Yang, Y.Y., Xing, G.X., Li, Q.M., Zhao, D., Chai, S.J. and Guo, J.Q.**, 2006, "Development of an Immunochromatographic Lateral Flow Test Strip for Detection of B-Adrenergic Agonist Clenbuterol Residues", *Journal of Immunological Methods*, 312(1-2): 27-33 pp.
- Zhang, D. and Liu, Q.**, 2016, Biosensors and bioelectronics on smartphone for portable biochemical detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 75: 273-284 pp.
- Zhuo, Y., Yuan, P.X., Yuan, R., Chai, Y.Q. and Hong, C.L.**, 2008, Nanostructured conductive material containing ferrocenyl for reagentless amperometric immunosensors, *Biomaterials*, 29(10):1501-1508 pp.

ÖZGEÇMİŞ

Emine GÜLER

e-mail: emine.gler@gmail.com, emine.glr@windowslive.com

Tel: 0554 820 44 08

Adres: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, 35100,
Bornova/İZMİR

İş bilgileri

Ege LS Tıbbi Ürünler Danışmanlık Reklamcılık San. Tic. Ltd. Şti
Arge personeli
2016-Devam ediyor

Eğitim Bilgileri

- **Doktora bilgileri**
2014-Devam ediyor
Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalı,
İZMİR
- **Doktora bilgileri-2**
2015-Devam ediyor
Ege Üniversitesi, Madde Bağımlılığı, Toksikoloji ve İlaç Bilimleri
Enstitüsü, Madde Bağımlılığı Anabilim dalı, İZMİR
- **Yüksek lisans bilgileri**
2012-2014
Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalı,
İZMİR
- **Lisans bilgileri**
2008-2012
Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü, İZMİR
2010-2012
Pedagojik Formasyon Sertifika Programı, Ege Üniversitesi, Eğitim
Fakültesi, İZMİR

- **Lise bilgileri**
2004-2008
Geyve Anadolu Lisesi, SAKARYA
 - **İlköğretim bilgileri**
1996-2004
Cumhuriyet İlköğretim Okulu, SAKARYA
-

Staj Deneyimi

- Bayer-Türk Kimya San. Ltd. Şti. Kalite-Kontrol Lab. Gebze Fabrikası
13.06.2011-13.07.2011
- Sakarya Üniversitesi Araştırma Hastanesi- Biyokimya Lab.-Mikrobiyoloji Lab.
07.2010-08.2010

Projeler

- Araştırma projesi (Araştırmacı-Özel kuruluş), **TÜBİTAK Avrupalırlığı ERA-NET Cofund Projesi**, 117Y195, '*Agrisensus: Tarımsal Faaliyetler Sonucu Su Kaynaklarına Karışan Pestisit Kalıntılarının Yerinde Takibine Yönelik İmmunoflow' Benzeri Testlerin Geliştirilmesi, Uygulaması ve Yönetim Modeli Araştırılması*', 15.07.2017-15.07.2020.
- Fizibilite projesi (Müşteri kuruluş proje sorumlusu), **TÜBİTAK Üniversite-Sanayi İşbirliği Destek Programı**, 5165014, '*Anksiyetenin Azaltılmasında Kullanılacak Nano Veziküler Sistemlerde Hazırlanmış Bitkisel Uçucu Yağları İçeren Transdermal Bantların Geliştirilmesi*' 01.07.2017-30.09.2017.
- Araştırma projesi (Tez öğrencisi-Bursiyer), **T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı SAN-TEZ projesi**, 0620.STZ.2014, '*In vitro Diagnostikte Yeni Yaklaşımlarla Yerli Ürünler: Altın Nanopartikül Konjugatları ve Biyoanaliz Kitleri*', 01.03.2016-30.11.2016.

- Araştırma projesi (Tez öğrencisi-Bursiyer), **T.C. Bilim, Sanayi ve Teknoloji Bakanlığı SAN-TEZ projesi**, 0395.STZ.2013-2, '*Veziküler Sistemlerde Hazırlanmış Doğal Ürünler*', 01.03.2014-29.02.2016.
- Araştırma projesi (Tez öğrencisi), **Ege Üniversitesi Araştırma Projeleri (BAP)**, Doktora tez projesi, 16/FEN/004, '*Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizinde In Vitro Diagnostik Testler İçin Farklı Nanobiyokonjugatlar ve Test Bileşenlerinin Hazırlanması ve Uygulamaları*', 04.2016-Devam ediyor.
- **Tübitak-Bideb Üniversite Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması**, 1. ve 2. aşamalardan sonra proje final sergisi, ' *μ -HEALTH ASSISTANT: Biyokimya Testlerinde Mikro Laboratuvarlar*' 2015.
- **Tübitak-Bideb Üniversite Girişimcilik ve Yenilikçilik Yarışması**, 1. ve 2. aşamalardan sonra proje final sergisi, '*Zenginleştirilmiş Bitkisel Preparatlar: Gıda Takviyesi ve Kozmetik Ürünler*' 23-25.06.2014.
- Araştırma projesi (Araştırmacı, Tez öğrencisi), **Aliye Üster Vakfı Bilimsel Proje Desteği**, '*Hücre Proliferasyonunu Arttırmaya Yönelik Altın Nanopartiküller ile Zenginleştirilmiş Bitkisel Lipozomal Preparatlar*', 09.2013-09.2015.
- Araştırma projesi (Tez öğrencisi), **Ege Üniversitesi Araştırma Projeleri (BAP)**, Yüksek lisans tez projesi, 2013/FEN/023, '*Hücre Çoğalması Üzerine Etkili Olabilecek Seçilmiş Bitki Ekstraktlarının Eldesi ve in vitro Testleri: Hyaluronik asit/Altın nanopartiküller ile zenginleştirilmiş Bitkisel Preparatlara İlişkin Çalışmalar*', 03.2013-04.2015.
- Araştırma projesi (Yürütücü), **Tübitak 2209 Üniversite Öğrencileri Yurt İçi/Yurt Dışı Araştırma Projeleri Destekleme Programı**, '*İletken Polimer Temelli Mikrobiyal Biyosensör Hazırlanması ve Uygulamaları*', 2011-2012.

Yayınlar

- 1) **Emine Guler**, Tulay Yilmaz Sengel, Z. Pinar Gumus, Mustafa Arslan, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, A Novel Approach for Mobile Phone Sensing of Cocaine in Lateral Flow Assay Combined with a Biomimetic Material, *Analytical Chemistry*, 2017, accepted, DOI: 10.1021/acs.analchem.7b03017
- 2) Tulay Yilmaz Sengel, **Emine Guler**, Mustafa Arslan, Z. Pinar Gumus, Serdar Sanli, Ebru Aldemir, Huseyin Akbulut, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, 'Biomimetic-Electrochemical-Sensory-Platform' for Biomolecule Free Cocaine Testing, *Material Science and Engineering C*, 2017, Submitted.
- 3) **Emine Guler**, Guliz Bozokalfa, Bilal Demir, Zinar Pinar Gumus, Bahar Guler, Ebru Aldemir, Suna Timur and Hakan Coskunol, An aptamer folding-based sensory platform decorated with nanoparticles for simple cocaine testing, *Drug Test. Analysis*, 2017, 9(4), 578-587.
- 4) Tulay Yilmaz Sengel, **Emine Guler**, Z. Pinar Gumus, Ebru Aldemir, Hakan Coskunol, Huseyin Akbulut, Demet Goen Colak, Ioan Cianga, Shuhei Yamada, Suna Timur, Takeshi Endo, Yusuf Yagci, An Immunochemical Platform for the Biosensing of 'Cocaine Use', *Sensors and Actuators B*, 2017, 246, 310-318.
- 5) Mustafa Arslan, Tulay Yilmaz, **Emine Guler**, Z. Pinar Gumus, Ebru Aldemir, Huseyin Akbulut, Hakan Coskunol, Suna Timur and Yusuf Yagci, Double Fluorescent Assay via β -Cyclodextrin Containing Conjugated Polymer as Biomimetic Material for Cocaine Sensing, *Polym. Chem.*, 2017, 8(21), 3333-3340.
- 6) Caner Geyik, **Emine Guler**, Zinar Pinar Gumus, Firat Baris Barlas, Huseyin Akbulut, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, and Yusuf Yagci, Bioconjugation and Applications of Amino Functional

Fluorescence Polymers, *Macromolecular Bioscience*, 2017, 17, 1600232.

- 7) Aybike Gunes, **Emine Guler**, Rabia Nur Un, Bilal Demir, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Hakan Coskunol, Suna Timur, Niosomes of Nerium oleander extracts: In vitro assessment of bioactive nanovesicular structures, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 2017, 37, 158–165.
- 8) Fatma Ozturk Kirbay, Caner Geyik, **Emine Guler**, Ozan Yesiltepe, Zinar Pinar Gumus, Dilek Odaci Demirkol, Hakan Coskunol, Suna Timur, Testing of bioactive-nanovesicles on hepatotoxicity of atypical antipsychotics via digital holography, *Colloids and Surfaces B*, 2017, 152, 289-295.
- 9) Tulay Yilmaz, **Emine Guler**, Z. Pinar Gumus, Huseyin Akbulut, Ebru Aldemir, Hakan Coskunol, Demet Goen Colak, Ioan Cianga, Shuhei Yamada, Suna Timur, Takeshi Endo and Yusuf Yagci, Synthesis and application of a novel polyL-phenylalanine electroactive macromonomer as matrix for the biosensing of ‘Abused Drug’ model, *Polym. Chem.*, 2016, 7, 7304-7315.
- 10) Fatma Cetin Telli, Bilal Demir, Firat Baris Barlas, **Emine Guler**, Suna Timur and Yesim Salman, Novel glyconanoconjugates: synthesis, characterization and bioapplications, *RSC Adv.*, 2016, 6, 105806-105813.
- 11) Z. Pinar Gumus, Veysel Umut Celenk, **Emine Guler**, Bilal Demir, Hakan Coskunol, Suna Timur, Determination of Cocaine and Benzoylcegonine In Biological Matrices by HPLC and LC-MS/MS, *Journal of the Turkish Chemical Society, Section A: Chemistry*, DOI: 10.18596/jotcsa.82665

- 12) Bilal Demir, Tulay Yilmaz, **Emine Guler**, Z. Pinar Gumus, Huseyin Akbulut, Ebru Aldemir, Hakan Coskunol, Demet Goen Colak, Ioan Cianga, Shuhei Yamada, Suna Timur, Takeshi Endo, Yusuf Yagci, Polypeptide with electroactive endgroups as sensing platform for the abused drug 'Methamphetamine' by bioelectrochemical method, *Talanta*, 2016, 161, 789-796.
- 13) Guliz Bozokalfa, Huseyin Akbulut, Bilal Demir, **Emine Guler**, Z. Pinar Gumus, Dilek Odaci Demirkol, Ebru Aldemir, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, Hakan Coskunol, Suna Timur, Yusuf Yagci, A polypeptide functional surface for the aptamer immobilization: Electrochemical cocaine bio-sensing, *Anal. Chem.* 2016, 88, 4161–4167.
- 14) **Emine Guler**, Huseyin Akbulut, Caner Geyik, Tulay Yilmaz, Z. Pinar Gumus, F. Baris Barlas, Recep Erdem Ahan, Dilek Odaci Demirkol, Shuhei Yamada, Takeshi Endo, Suna Timur, and Yusuf Yagci, Complex Structured Fluorescent Polythiophene Graft Copolymer as a Versatile Tool for Imaging, Targeted Delivery of Paclitaxel, and Radiotherapy, *Biomacromolecules*, 2016, 17, 2399–2408.
- 15) Gorkem Yilmaz, **Emine Guler**, F. Baris Barlas, Suna Timur, Yusuf Yagci, Polymeric Thioxanones as Potential Anticancer and Radiotherapy Agents, *Macromolecular Rapid Communications*, 2016, 37, 1046–1051.
- 16) F. Baris Barlas, Bilal Demir, **Emine Guler**, A. Murat Senisik, H. Armagan Arican, Perihan Unak and Suna Timur, Multimodal Theranostic Assemblings: Double Encapsulation of Protoporphyrine-IX/Gd³⁺ in Niosomes, *RSC Advances*, 2016, 6, 30217-30225.
- 17) **Emine Guler**, Huseyin Akbulut, Guliz Bozokalfa, Bilal Demir, Gizem Oyman Eyrilmez, Murat Yavuz, Dilek Odaci Demirkol, Hakan Coskunol, Takeshi Endo, Shuhei Yamada, Suna Timur, and Yusuf

Yagci, Bio-Applications of Polythiophene-g-Polyphenylalanine Covered Surfaces, *Macromol. Chem. Physic*, 2015, 216, 1868–1878.

18) Huseyin Akbulut, Guliz Bozokalfa, Duygu N. Asker, Bilal Demir, **Emine Guler**, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur and Yusuf Yagci, Polythiophene-g-poly(ethylene glycol) with Lateral Amino Groups as a Novel Matrix for Biosensor Construction Polythiophene-g-poly(ethylene glycol) with Lateral Amino Groups as a Novel Matrix for Biosensor Construction, *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2015, 7, 20612–20622.

19) Z. Pinar Gumus, **Emine Guler**, Bilal Demir, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Dilara Colpankan, A. Murat Senisik, Serap Teksoz, Perihan Unak, Hakan Coskunol, Suna Timur, Herbal Infusions of Black Seed and Wheat Germ Oil: Their Chemical Profiles, *in vitro* Bio-investigations and Effective Formulations as Phyto-Nanoemulsions, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2015, 133, 73–80.

20) Rabia Nur Un, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Didem Ag Seleci, Muharrem Seleci, Z. Pinar Gumus, **Emine Guler**, Bilal Demir, Mustafa Can, Hakan Coskunol, and Suna Timur, Phyto-Niosomes: In vitro Assessment of the Novel Nanovesicles Containing Marigold Extract, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 2015, 64, 927–937.

21) Hatice Yildirim, **Emine Guler**, Murat Yavuz, Nurdan Ozturk, Pelin Kose, Elif Subasi, Elif Sahin, Suna Timur, Ruthenium (Ru) Complexes of Thiosemicarbazone: Synthesis, Biosensor Applications, and Evaluation as Antimicrobial Agents, *Material Science and Engineering C*, 2014, 44, 1-8.

22) Bilal Demir, Firat Baris Barlas, **Emine Guler**, Pinar Zinar Gumus, Mustafa Can, Murat Yavuz, Hakan Coskunol and Suna Timur, Gold

nanoparticle loaded phytosomal systems: synthesis, characterization, and in vitro investigations, *RCS Advances*, 2014, 4, 34687.

23) Emine Guler, F. Baris Barlas, Murat Yavuz, Bilal Demir, Z. Pinar Gumus, Yucel Baspinar, Hakan Coskunol, Suna Timur, Bio-active nanoemulsions enriched with gold nanoparticle, marigold extracts and lipoic acid: *in vitro* investigations, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2014, 121, 299-306.

24) Emine Guler, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, Hakan Can Soyleyici, Metin Ak, A novel functional conducting polymer as an immobilization platform, *Material Science and Engineering C*, 2014, 40, 148-156.

25) Huseyin Akbulut, Murat Yavuz, **Emine Guler**, Dilek Odaci Demirkol, Takeshi Endo, Shuei Yamada, Suna Timur, Yusuf Yagci, Electrochemical Deposition of Polypeptides: Bio-based Covering Materials for Surface Design, *Polymer Chemistry*, 2014, 5, 3929.

26) Hacer Azak, **Emine Guler**, Ummugulsum Can, Dilek Odaci Demirkol, Huseyin Bekir Yildiz, Oktay Talaz, Suna Timur, Synthesis of Amine Functionalized Naphthalene Containing Conducting Polymer as a Matrix for Biomolecule Immobilization, *RSC Advances*, 2013, 3, 19582–19590.

Bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitabında basılan bildiriler

- **Emine Guler**, Begum Kinay, E. Derin Aydin, Bilal Demir, F. Baris Barlas, Z. Pinar Gumus, Hakan Coskunol, Suna Timur, Liposomal Fluorescent Probes for Monitoring of Drug Abuse, BBMEC: 11th Workshop Biosensor and Bioanalytical Microtechniques in Environmental, Food and Clinical Analysis, Germany, 26-30.09.2015.

- Bilal Demir, Fırat Barış Barlas, **Emine Güler**, Zinar Pınar Gümüş, Mustafa Can, Murat Yavuz, Hakan Coşkunol, Suna Timur, " Gold nanoparticle Loaded Calendula Phytosomes: Synthesis, Characterization and In vitro Investigations", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- **Emine Güler**, Huseyin Akbulut, Guliz Bozokalfa, Bilal Demir, Gizem Oyman Eyrilmez, Murat Yavuz, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Takeshi Endo, Shuhei Yamada, Suna Timur, Yusuf Yagci, " Design of Electro and Bioactive Surfaces for Biomolecule and Cell Attachment", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- Huseyin Akbulut , Guliz Bozokalfa, Duygu N. Asker, Bilal Demir, **Emine Güler**, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur and Yusuf Yagci, "Amine-functionalized hybrid conducting copolymer as a biofunctional matrix for biosensing applications", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- F. Barış Barlas, Bilal Demir, **Emine Güler**, Perihan Unak, A. Murat Şenışık, H.Armağan Arıcan, Suna Timur, "Multimodal Theranostic Assemblings: Double Encapsulation of Protoporphyrine-IX/Gd³⁺ in Niosomes", Turkey Symposium Series: Catalysis and Sensing for Health, 7 September 2015, Izmir/TURKEY.
- **Emine Güler**, E. Derin Aydın, Begüm Kınay, Bilal Demir, F. Barış Barlas, Z. Pınar Gümüş, Hakan Coşkunol, Suna Timur, Madde Bağımlılığının Teşhis ve Takibinde Lipozomal Floresans Problemlerin Kullanımı, 9. Ulusal Alkol ve Madde Bağımlılığı Kongresi, Edirne, Türkiye, 10-12.12.2015.
- **Emine Güler**, Bilal Demir, Fırat Barış Barlas, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, Biyo-Fonksiyonel Yüzeylerin Tasarımı:

Hücre Spesifik Platformlar ve Nano Problar, Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinlerarası Yeni Yaklaşımlar, 17-18.09.2015.

- Bilal Demir, **Emine Güler**, Fırat Barış Barlas, Hakan Coşkunol, Suna Timur, "Veziküler Sistemlerde Hazırlanmış Bitkisel Ürünler: Hücre Görüntüleme ve Farklı Tedavilerde Kullanılabilecek Doğal Preparatlar", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- **Emine Güler**, Bilal Demir, Fırat Barış Barlas, Dilek Odacı Demirkol, Hakan Coşkunol, Suna Timur, "Biyo-fonksiyonel Yüzeylerin Tasarımı: Hücre Spesifik Platformlar ve Nano Problar", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- Fırat Barış Barlas, Bilal Demir, **Emine Güler**, Perihan Ünak, Ahmet Murat Şenışık, H. Armağan Arıcan, Suna Timur, "Teranostik Gadolinyum Nanoparçacıkların Tasarımı ve *In vitro* Uygulamaları", Kanser Tanı ve Tedavisinde Disiplinler Arası Yeni Yaklaşımlar, 17-18 Eylül 2015, İzmir/TÜRKİYE.
- Bilal Demir, **Emine Guler**, Hakan Coskunol, Suna Timur, Bio-investigation of formulated natural products via microfluidic cell culture, 2nd Novel Fluidic Technologies and Applications Workshop, 9-10 April 2015, İzmir, TURKEY. (Sözlü sunum)
- Suna Timur, **Emine Guler**, Bilal Demir, Biyosensör Sistemlerinde Nanopartiküller ve Mikroakışkanlar, Cell Culture on Chip Lisansüstü Yaz Okulu, 31 Ağustos-07 Eylül 2014, Bodrum-Muğla, TÜRKİYE. (Sözlü sunum)
- **Emine Guler**, Hakan Can Soyleyici, Dilek Odacı Demirkol, Metin Ak, Suna Timur, Mikrobiyal Hücre ve Enzim İmmobilizasyonunda Yeni Bir Fonksiyonel İletken Polimerin Kullanımı, IV. Fiziksel Kimya Kongresi, 05-08 Haziran 2014, Pamukkale Üniversitesi, Denizli, TÜRKİYE.

- **Emine Guler**, Hakan Can Soyleyici, Dilek Odaci Demirkol, Metin Ak, Suna Timur, A Novel Conducting Polymer as an Immobilization Platform, for Biochemical Sensing, Surface Modification for Chemical and Biochemical Sensing, SMCBS 08-12 November 2013, Warsaw, POLAND.
- Elif Şahin Işgın, Hatice Yıldırım, **Emine Güler**, Suna Timur, Dilek Odaci Demirkol, Nurdan Öztürk, Pelin Köse, Elif Subaşı, P(Trans-Diphenylcarbonylchloro (Thiophene-2Carboxaldhyde-thiosemicarbazonato- N,S) Ruthenium (II)) as An Enzyme Sensor, I. Uluslararası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı, 23-28 Haziran 2013, Muğla, TÜRKİYE.
- **Emine Guler**, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, Hakan Can Soyleyici, Metin Ak, Conducting Polymer of N-(2,5-di(thiophen-2-yl)-1H-pyrrol-1-yl)4-aminobenzamide as Platform for Microbial Biosensor Applications, 8th Aegean Analytical Chemistry Days (AACD2012), 16-20 September 2012, Urla/Izmir, TÜRKİYE.

Kitap Bölümleri

- Bahar Guler, Bilal Demir, **Emine Guler**, Kadri Gulec, Ozan Yesiltepe, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, Targeting and Imaging of Cancer Cells Using Nanomaterials, In book: Nanobiomaterials in Medical Imaging, Edition: 1st, Chapter: 7, Publisher: Elsevier, Editors: Alexandru Grumezescu, 2016, pp209-251.
- **Emine Guler**, Bilal Demir, Bahar Guler, Dilek Odaci Demirkol, Suna Timur, Therapeutic Nanostructures; Volume II: Drug Delivery Biofunctionalized Nanomaterials for Targeting Cancer Cells. Chapter 3 of "Nanostructures for Cancer Therapy" Multivolume set Editor: Alexandru Mihai Grumezescu, 2017, Elsevier *In press*.

Diğer yayınlar

- **Emine Guler**, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Biyosensör Uygulamalarında Polimerik Malzemeler, Nanoproblar. I. Uluslararası Katılımlı Elektrokimya Çalıştayı, 23-28 Haziran 2013, Muğla, TÜRKİYE.
- Suna Timur, Bilal Demir, **Emine Guler**, Biyosensörlerden Lab-on-a-chip Sistemlerine, III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık, Balıkesir, TÜRKİYE.
- Bilal Demir, **Emine Güler**, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Amperometrik Enzim Sensörleri, III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık, Balıkesir, TÜRKİYE.
- Bilal Demir, **Emine Guler**, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Amperometrik Enzim Biyosensörlerinin Hazırlanması, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu, (*Uygulama deneyi*), III. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 3-7 Haziran 2014, Ayvalık, Balıkesir, TÜRKİYE.
- Bilal Demir, **Emine Güler**, Güliz Bozokalfa, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Biyosensörler, Mikroarray ve ‘lab-on-a-chip’ Sistemlerine Genel Bakış, IV. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 24-27 Mayıs 2016, Manisa, TÜRKİYE.
- Bilal Demir, **Emine Güler**, Güliz Bozokalfa, Tülay Yılmaz, Dilek Odacı Demirkol, Suna Timur, Amperometrik Enzim Biyosensörlerinin Hazırlanması, Optimizasyonu ve Karakterizasyonu, (*Uygulama deneyi*), IV. Ulusal Uygulamalı Elektrokimya Lisansüstü Yaz Okulu ve Çalıştayı, 24-27 Mayıs 2016, Manisa, TÜRKİYE.

Ödüller

En İyi Poster Ödülü: **Royal Society of Chemistry Turkey Symposium Series**, ‘Design of Electro and Bioactive Surfaces for Biomolecule and Cell Attachment’ 07-11.09.2015.

Bölüm 2.liği ödülü: Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü

Tez Çalışmaları

- **Lisans Tezi:** ‘İletken Polimer Temelli Mikrobiyal Biyosensör Hazırlanması ve Uygulamaları’
Mayıs 2012
Tez Danışmanı: Prof. Dr. Suna TİMUR
Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyokimya Bölümü
- **Yüksek Lisans Tezi:** ‘Hücre Çoğalması Üzerine Etkili Olabilecek Seçilmiş Bitki Ekstraktlarının Eldesi ve *In Vitro* Testleri: Hyaluronik Asit/Altın Nanopartiküller İle Zenginleştirilmiş Bitkisel Preparatlara İlişkin Çalışmalar’
Ağustos 2014
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR
İkinci Danışmanı : Yrd. Doç. Dr. Yücel BAŞPINAR
Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalı
- **Doktora Tezi:** ‘Kötüye Kullanılan Maddelerin Analizinde *In Vitro* Diagnostik Testler İçin Farklı Nanobiyokonjugatlar ve Test Bileşenlerinin Hazırlanması ve Uygulamaları’
Aralık 2015-devam ediyor
Tez Danışmanı : Prof. Dr. Suna TİMUR
İkinci Danışmanı : Prof. Dr. Hakan COŞKUNOL
Ege Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim dalı

Yabancı Dil Seviyesi

- **İngilizce** – İyi seviye

Katıldığı Etkinlikler ve Sertifikalar

- 2011: TS EN ISO/IEC 17025:2005 Deney ve Kalibrasyon Laboratuvarlarının Yeterliliği İçin Genel Şartlar Sertifika Eğitim Programı
- 2011: ISO 9001:2008 Kalite Yönetim Sistemi Eğitimi
- 2011: ISO 22000 Gıda Güvenliği Yönetim Sistemi Eğitimi
- 2011: Ege Üniversitesi Gateway Topluluğu Patent ve Patentin Korunması Semineri
- 2010: Ege Üniversitesi Gateway Topluluğu Biyoteknoloji Günü
- 2010: Ege Üniversitesi 8. Kariyer Günleri
- 2010: Ebiltet 2. Kök Hücre Sempozyumu
- 2009: Ebiltet Kök Hücre Sempozyumu

Kullandığı Programlar

- Microsoft Office – iyi derecede
- Origin 8.5 – iyi derecede
- ImageJ – orta seviye