

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***ESCHERİCHIA COLI* ATCC 25922 SUŞUNUN TÜKÜRÜK
İÇERİSİNDE QCM SENSÖR İLE DİREKT TESPİTİ**

**Hazırlayan
Ayla KOURDI**

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

Yüksek Lisans Tezi

**Temmuz 2021
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ ANABİLİM DALI**

***ESCHERİCHİA COLİ* ATCC 25922 SUŞUNUN TÜKÜRÜK
İÇERİSİNDE QCM SENSÖR İLE DİREKT TESPİTİ**

(Yüksek Lisans Tezi)

**Hazırlayan
Ayla KOURDI**

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

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

**Temmuz 2021
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

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

Ayla KOURDI

“*Escherichia coli* ATCC 25922 Suşunun Tükürük İçerisinde QCM Sensör ile Direkt Tespiti” adlı Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Hazırlayan

Ayla KOURDI

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU

BIYOMEDİKAL MÜHENDİSLİĞİ

Anabilim Dalı Başkanı

Prof. Dr. Mahmut TOKMAKÇI

ÖNSÖZ/TEŞEKKÜR

Tez konumu vererek beni araştırmaya teşvik eden, tez çalışmam süresince bilgisini, uzmanlığı, yardımları, tavsiyeleri ve desteğini esirgemeyen sayın danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Çağrı SOYLU' ya teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca; laboratuvar çalışmalarım sırasında yakın ilgi ve yardımlarını esirgemeyen değerli arkadaşlarıma çok teşekkür ederim. Ve hayatımın her aşamasında olduğu gibi yüksek lisans çalışmalarım boyunca da maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayla KOURDI

Temmuz 2021, KAYSERİ

***ESCHERICHIA COLI* ATCC 25922 SUŞUNUN TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE QCM SENSÖR İLE DİREKT TESPİTİ**

AYLA KOURDI

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ, FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

YÜKSEK LİSANS TEZİ, TEMMUZ 2021

DANIŞMAN: DR. ÖĞR. ÜYESİ MEHMET ÇAĞRI SOYLU

ÖZET

Escherichia coli (*E. coli*), gram negatif bir bakteridir. *E.coli* suşlarının bazıları zararsız olsa da bazı suşları hastalığa neden olabilmektedir. Patojenik bakterilerin erken teşhisi uygun tedavi seçimi uygulanabilmesi adına büyük öneme sahiptir. Bu nedenle, patojenik *E.coli* suşlarını, bulaştırma ortamlarından biri olan tükürük içerisinde tespit etmek için hızlı yöntemler geliştirilmesi önem arz etmektedir. Kuvars kristal mikro terazi (QCM) tabanlı biyosensör, konseptindeki basitliği, kullanım kolaylığı, düşük maliyeti nedeniyle patojenlerin immünolojik tespiti için yeni bir yöntem sunmaktadır. QCM, sensör yüzeyine bağlanan bir kütle nedeniyle oluşan rezonans frekansındaki değişim prensibi ile çalışan bir biyosensördür. Ek olarak, tükürük, kolay ve ucuz bir şekilde elde edilebildiği için en ideal tanı ortamlarından biridir. Bu çalışmada, gerçek tükürük içerisinde QCM sensör ile *E. coli* ATCC 25922 suşunun direkt tespiti gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sistemi *E.coli* bakterisi, anti *E.coli* antikor ab25823 ve QCM sensörden oluşmaktadır. QCM sensör yüzeyinin modifikasyonu, 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) ile gerçekleştirilmiştir. Bu aşamadan sonra, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride / N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS), MUA molekülündeki karboksil grubu ile *E.coli* antikoruna üzerindeki amin grubu arasında bir amid bağı oluşumuna aracılık etmek için kullanılmıştır. QCM sensör yüzeyi, spesifik olmayan bağlanmayı önlemek için Bovine Serum Albumin (BSA) bloke edici proteine maruz bırakılmış ve yüzey doyurulmuştur. Son olarak, gerçek tükürükteki *E. coli* bakterisi üç farklı konsantrasyonda (10^7 , 10^5 ve 10^3 CFU/mL) 3 tekrarlı uygulanarak tespit sisteminin ölçüm sığası belirlenmiştir. Sonuçlar, sistem için en düşük tespit konsantrasyonu olan Tespit Sınırı (LOD) 10^3 CFU /mL'de bile hassas bir şekilde kaydedilmiş ve bu yöntemle *E. coli* bakterisi tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Biyosensör; *E.coli*; QCM; Bakteri Tespiti.

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

AYLA KOURDI

Erciyes University, Graduate School of Natural and Applied Sciences

Master Thesis, July 2021

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Mehmet Çağrı SOYLU

ABSTRACT

Escherichia coli (*E. coli*) is a gram-negative bacterium. Although some strains of *E. coli* are harmless, others can cause disease. Early diagnosis of pathogenic bacteria is of great importance for appropriate and time-efficient treatment. Therefore, the development of fast methods to detect pathogenic *E. coli* strains in saliva is extremely necessary. Quartz crystal microbalance (QCM) based biosensor represents a new immunological detection method for rapid detection of pathogens due to the simplicity in its concept, ease of use and low cost. The QCM is a biosensor operating on the principle of change in resonance frequency due to a mass attached to the sensor surface. In addition, saliva, is one of the most ideal diagnostic environments, as it can be obtained easily and cheaply. In this study, direct detection of *Escherichia coli* ATCC 25922 strain was performed with a QCM sensor in saliva. The measurement system consists of *E. coli* bacteria, an anti-*E. coli* antibody ab25823 and a QCM sensor. The modification of the QCM sensor surface was performed with 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA). Following this step, N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride / N-Hydroxysuccinimide (EDC/NHS) were used to mediate the formation of an amide linkage between the carboxyl group in MUA molecule and the amine group on anti-*E. coli* antibody. However, the QCM sensor surface was exposed to Bovine Serum Albumin (BSA) blocking agent to prevent non-specific binding and the surface was saturated. Finally, the measurement capacity of the detection system was determined by applying *E. coli* bacteria in real saliva in three different concentrations (10^7 , 10^5 and 10^3 CFU/mL) and at least three repeated measurements were obtained. The results were recorded precisely at 10^3 CFU / mL, which is the lowest detection concentration for the system, and this approach was utilized to detect *E. coli* bacteria.

Keywords: Biosensor; *E. coli*; QCM; Bacteria Detection.

İÇİNDEKİLER

***ESCHERİCHIA COLI* ATCC 25922 SUŞUNUN TÜKÜRÜK İÇERİSİNDE QCM SENSÖR İLE DİREKT TESPİTİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK.....	iii
KABUL VE ONAY	iv
ÖNSÖZ	v
ÖZET.....	vi
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xii
TABLolar LİSTESİ.....	xiii
ŞEKİLLER LİSTESİ	xiv
GİRİŞ	1

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÇALIŞMASI

1.1. Tezin (Araştırmanın) amacı ve önemi.....	2
1.2. Problem Durumu	3
1.3. Tükürük	3
1.3.1. Tükürük'e giriş.....	3
1.3.2. Tükürük Sıvısı.....	4
1.3.3. Tükürük fonksiyonları	4
1.3.4. Tükürüğün teşhis materyali olarak temel Özellikleri	5
1.4. Escherichia coli (E. coli) Bakterisi.....	6
1.5. E.coli bakteri tespit yöntemleri.....	7
1.5.1. Geleneksel kültürleme yöntemleri.....	8
1.5.2. İmmünolojik yöntemler	8
1.5.2.1. ELISA.....	8

1.5.2.2. ELISA ile Ecoli Tespiti	11
1.5.3. Moleküler teknikler	12
1.5.3.1. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).....	12
1.5.3.1.1. PCR Prensibi	12
1.5.3.1.2. PCR metotları.....	14
1.5.3.1.2.1. Geleneksel PCR.....	14
1.5.3.1.2.2. Gerçek zamanlı PCR	14
1.5.3.1.2.3. Koloni PCR.....	14
1.5.3.1.2.4. Katlı PCR.....	15
1.5.3.1.2.5. İç içe PCR	15
1.5.3.1.2.6. Asimetrik PCR	15
1.5.3.1.2.7. Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR	15
1.5.3.1.2.8. RT-PCR.....	16
1.5.3.1.3. PCR ile Ecoli Tespiti	16
1.5.4. Biyosensör	17
1.5.4.1. Biyosensörlerin tarihçesi	17
1.5.4.2. Biyosensör yapısı	17
1.5.4.3. Biyosensörün Özellikleri.....	18
1.5.4.4. Biyosensörlerin Sınıflandırılması	18
1.5.4.4.1. Biyolojik elementler	19
1.5.4.4.2. Dönüştürücüler.....	20
1.5.4.4.2.1. Elektrokimyasal Biyosensörler	20
1.5.4.4.2.1.1. Amperometrik biyosensörler	21
1.5.4.4.2.1.2. Potansiyometrik biyosensörler.....	22
1.5.4.4.2.1.3. Impedimetrik Biyosensörler.....	23
1.5.4.4.2.1.4. Voltmetrik Biyosensörler	25
1.5.4.4.2.2. Fiziksel Biyosensörler	27
1.5.4.4.2.2.1. Piezoelektrik Biyosensör.....	27
1.5.4.4.2.2.2. Termal Biyosensör	28
1.5.4.4.2.3. Optik Biyosensörler	29
1.5.4.4.2.3.1. RİFS biyosensörleri.....	30
1.5.4.4.2.3.2. Floresan biyosensörleri.....	30
1.5.4.4.2.3.3. SPR biyosensörleri	31

1.5.4.4.2.3.4. Fiber optik biyosensörleri	32
1.5.4.4.2.4. Kantilever Biyosensörler	33
1.6. Farklı bakteri tespit yöntemlerinin karşılaştırılması	33
1.7. Kuvars kristal Mikrodenge (QCM).....	34
1.7.1. QCM prensibi.....	36
1.7.2. QCM'in Avantajları	38
1.7.3. QCM Uygulamaları	38

2.BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Deney Kimyasalları ve Malzemeleri.....	40
2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	40
2.1.2. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	41
2.2. Deneysel Düzenek.....	43
2.2.1. QCM tespit sistemi.....	43
2.2.2. QCM sensör çipleri temizleme işlemi.....	44
2.2.3. E.coli Tespit Deney Aşamaları.....	45
2.2.3.1. QCM Biyosensör yüzey Modifikasyonu.....	46
2.2.3.1.1. QCM sensörünün MUA ile kaplanması.....	46
2.2.3.1.1.1. MUA Solüsyonunun Hazırlanması.....	47
2.2.3.1.1.2. MUA Kaplama İşleminin Uygulanması.....	47
2.2.3.1.2. EDC/ NHS Crosslinking (Çapraz bağlanma).....	47
2.2.3.1.2.1. EDC / NHS Solüsyonunun Hazırlanması.....	48
2.2.3.1.2.2. EDC / NHS Çapraz bağlanma İşleminin Uygulanması.....	48
2.2.3.1.3. Antikor İmmobilizasyonu.....	48
2.2.3.1.3.1. Antikor Çözeltisinin Hazırlanması.....	49
2.2.3.1.3.2. Antikor İmmobilizasyonu İşleminin Uygulanması	49
2.2.3.2. BSA Bloklama	49
2.2.3.2.1. BSA Çözeltisinin Hazırlanması	50
2.2.3.2.2. BSA Bloklama Uygulanması	50
2.2.3.3. E.coli Suşunu Tespiti.....	51

2.2.3.3.1. E.coli Bakteri Çözeltisinin Hazırlanması.....	51
2.2.3.3.2. E.coli Bakteri Çözeltisinin Uygulanması	52

3.BÖLÜM

BULGULAR

3.1. Araştırma Modeli.....	54
3.2. Deney Aşamalarının Frekans Analizi	55
3.2.1. Yüzey Modifikasyonunun QCM Biyosensör ile Takibi.....	55
3.2.2. BSA Bloklama	57
3.2.3. Escherichia coli ATCC 25922 tespiti.....	58
3.3. İstatiksel Analiz (T-Testi).....	61

4.BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ VE ÖNERİLER

TARTIŞMA	62
KAYNAKÇA	66
ÖZGEÇMİŞ.....	81

KISALTMALAR

<u>Sembol</u>	<u>Anlamı</u>	<u>Birimi</u>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	-
QCM	Kuartz Kristal Mikrodenge	-
ELISA	Enzim Bağlı İmmünosorbent	-
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu	-
DIW	Saf Su	-
MUA	11-Mercaptoundecanoic Asit	-
PBS	Fosfat Tamponlu Serum	-
PBS	Fosfat Tamponlu Serum	-
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'ethylcarbodiimide hydrochloride	-
NHS	N-Hydroxysuccinimide	-
BSA	Bovine Serum Albumin	-
SAM	Kendiliğinden Düzenlenen Tabakalar	-
Hz	Hertz	s ⁻¹
Δm	Kütle Değişimi	g/cm ²
Δf	Frekans Değişimi	Hz
f	Frekans	Hz
f_0	Kristalin temel rezonans frekansı	Hz
I	Akım	A
Ab	Antikor	-
dk	Dakika	s
s	Saniye	s
V	Gerilim	V
Z	Empedans	ohm
R	Direnç	ohm
PZT	Piezoelektrik Seramik Malzeme	-
LOD	Saptama Sınırı	-
Ag	Antijen	-
CFU	Koloni Oluşturan Birim	-
ml	Mililitre	L
ul	Mikrolitre	L
mg	Miligram	N

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1.1. ELISA protokollerinin avantajları ve dezavantajları	10
Tablo 1.2. PCR kullanımının avantajları ve dezavantajları	14
Tablo 1.3. Biyosensörlere dahil edilen biyolojik elementler ve dönüştürücüler.....	18
Tablo 1.4. Voltametrik teknikler	26
Tablo 1.5. Bakteri saptama yönteminin karşılaştırması	34



ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.1. İnsan tükürüğünün bileşenleri, özellikleri ve salgılanması	5
Şekil 1.2. <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) bakteri illüstrasyonu	7
Şekil 1.3. Farklı bakteri tespit yöntemlerinin temsili	8
Şekil 1.4. Farklı ELISA protokollerinin şeması	10
Şekil 1.5. PCR reaksiyonu ana aşamaların gösterimi	13
Şekil 1.6. Biyosensörün şematik gösterimi	18
Şekil 1.7. Geleneksel biyoreseptör türlerini kullanan biyosensör konsepti.....	20
Şekil 1.8. Elektrokimyasal biyosensörlerin şematik gösterimi.....	21
Şekil 1.9. Ortak bir ekran baskılı üç elektrot sensörü.....	22
Şekil 1.10. Potansiyometrik sensörünün diyagramı	23
Şekil 1.11. İmpedimetrik biyosensörlerin yapısı ve elektrokimyasal işlevi	24
Şekil 1.12. Optik biyosensörler	29
Şekil 1.13. Floresan biyosensörün şematik gösterimi	31
Şekil 1.14. SPR biyosensörlerin şematik gösterimi.....	32
Şekil 1.15. Piezoelektrik kuvars kristalinin şeması	34
Şekil 1.16. QCM sistemi temel elemanları.....	35
Şekil 1.17. QCM sensörünün şematik	37
Şekil 2.1. QCM cihazı	40
Şekil 2.2. Peristaltik Pompa.....	41
Şekil 2.3. MUA'nın kimyasal yapısı.....	42
Şekil 2.4. EDC'nin kimyasal yapısı	42
Şekil 2.5. NHS'nin kimyasal yapısı	43
Şekil 2.6. Kaplı döngü QCM tespit sistemi	44
Şekil 2.7. Açık döngü QCM tespit sistemi	45
Şekil 2.8. Kovalent immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi.....	46
Şekil 2.9. QCM sensörünün yüzeyinin MUA ile kaplanması	46
Şekil 2.10. EDC/NHS'in MUA ile etkileşimi	48
Şekil 2.11. Antikor immobilizasyonu.....	49
Şekil 2.12. BSA bloklama	50
Şekil 2.13. QCM sensörü ile <i>E.coli</i> Bakteri gerçek tükürük içersinde tespiti	51

<i>Şekil 3.1.</i> Yüzey Modifikasyon İşleminin QCM Biyosensör ile Takibi	54
<i>Şekil 3.2.</i> BSA Bloklama İşleminin QCM Biyosensör ile Takibi	56
<i>Şekil 3.3.</i> Farklı E.coli ATCC 25922 Konsantrasyonlarının rezonans frekansındaki değişimler.....	57
<i>Şekil 3.4.</i> Deney aşamalarının QCM Biyosensör ile takibi.....	58
<i>Şekil 3.5.</i> Kalibrasyon eğrisi	59



GİRİŞ

Patojen mikroorganizmaların çoğalması, son yıllarda büyük oranda dikkatleri üzerine toplayan önemli bir sağlık sorunu olmuştur. Bhattacharya ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmaya göre, İngiltere'de *Escherichia coli* bakteriyemisinin insidansını ve 30 günlük tüm nedenlere bağlı ölüm oranını tahmin etmede son yıl olan 2016/17 ile karşılaştırıldığında 2020/21 itibarıyla *E. coli* bakteremi insidansında % 22'lik bir artış olacağı raporlanmıştır [1]. Bu sonuçlar, hızlı tespit gibi acil halk sağlığı eylemine duyulan ihtiyacı göstermektedir. Bu amaçla, biyosensör uygulamaları, hassas, hızlı ve yerinde tespitte önemli rol oynamaktadır. Tıbbi teşhis, fiziksel, kimyasal, analitik ve biyoteknolojik alanlarda kullanıcı dostu olan ve aynı zamanda yüksek seçiciliğe, yüksek hassasiyete sahip, küçük boyutlu ve güvenilir biyosensör tekniklerine olan ihtiyaç artmaktadır. Gaz ve sıvı tabanlı biyosensör uygulamaları arasında Kuvars Kristal Mikrodenge (QCM) hızlı tepkisi, kullanım kolaylığı, ölçüm hassasiyeti, düşük maliyeti ile ön plana çıkmaktadır. Ayrıca, pahalı etiketlere ihtiyacı yoktur [2]. Son 10 yılda tükürüğün teşhis sıvısı olarak kullanılmasıyla bir çok başarı öyküsü literatürde yer almaktadır. Teşhis testi için kan veya idrar yerine tükürük kullanmanın faydaları arasında numune toplama kolaylığı, ekonomik oluşu, çoklu numune alma kolaylığı ve laboratuvarları tehlikeli numunelere maruz bırakma riskinin düşük olması yer almaktadır [3]. *Escherichia coli*, laboratuvar deneylerinde en çok çalışılan prokaryotik organizmadır. *E. coli* bağırsaklarda yaşayan zararsız bir bakteri olmasına rağmen bazı suşları ciddi sorunlara neden olur. Bu nedenle tükürükte hızlı tespit edilmesi çok önemlidir. Bu çalışmada farklı konsantrasyonlarda gerçek tükürük içerisinde *E. coli* bakterisinin serolojik tespiti QCM sensörü kullanılarak araştırılmıştır. Çalışmanın birinci bölümünde QCM sensörlerin dayandığı teorik altyapı incelenmiş ve literatür çalışması özet bir şekilde verilmiştir. Kullanılan yöntem hakkında ayrıntılı bilgi ikinci bölümde verilmektedir. Üçüncü bölümde bulgular sunulmuştur. Son bölümde ise elde edilen sonuçlar değerlendirilmiştir.

1. BÖLÜM

GENEL BİLGİLER ve LİTERATÜR ÖZETİ

1.1 Problem Durumu

Bakteriyel patojenler, tıp, gıda güvenliği, halk sağlığı ve güvenliğinde tespit ve tanımlama için önemli hedeflerdir. Bakteriyel enfeksiyon, dünya çapında yaygın bir ölüm nedenidir. *Escherichia coli* (*E. Coli*), gastrointestinal sistemde çok yaygın bir bakteridir ve normal bakteriyel floranın bir parçasıdır. Ancak bazı *Escherichia coli* türleri, çeşitli hastalıklara neden olan birçok patotip içermektedir. Birçok farklı *E. Coli* suşu, çok çeşitli hücresel işlemleri etkileyen virülans faktörleri aracılığıyla bağırsak hastalığına neden olur [4]. *E. coli* O157: H7'nin tanımlanması, özel test gerektirir. Bu test, yerel laboratuvarlarda kolayca mevcut olmayabilir. Fakat, *E. coli* suşunu farklı yöntemlerle tespit etmek için bazı protokoller mevcuttur. *E. coli* O157: H7'nin saptanmasına yönelik geleneksel yöntemler, kaplama ve kültürleme, sayma yöntemleri, biyokimyasal testler ve mikroskopik incelemeleri içermektedir. Bu geleneksel yöntemler güvenilir olmasına rağmen, sonuç vermesi fazla zaman almaktadır ve zahmetlidir. *E. coli* O157: H7'nin saptanması için uygulanan bazı yeni yöntemler, enzime bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonudur (PCR). Bu yöntemler daha özgü daha ve duyarlı, olmasına rağmen her kullanılan antikorun etiketlenmesini gerektirmektedir, bu da zaman alıcı, pahalı olabilmekte ve sadece gelişmiş ülkelerin erişebildiği tam donanımlı laboratuvarlar gerektirmektedir. Dolayısıyla, bakterilerin varlığını kantitatif olarak tespit edebilen hızlı, ucuz, taşınabilir bir cihazın geliştirilmesine ihtiyaç vardır [5]. Bu çalışmada amaç, tükürük içerisinde *E. coli* suşunu piezoelektrik biyosensör (QCM) kullanarak numunede direkt olarak, kantitatif ve kalitatif şekilde belirlemektir. QCM sensörlerinin pahalı ve tehlikeli etiketleme yöntemlerine ihtiyacı olmaması ile tükürükteki bakterileri yüksek hassasiyetle algılayabilmektedir.

1.2 Tezin (Araştırmanın) amacı ve önemi

Moleküler biyobelirteçler genellikle kan veya idrar gibi biyolojik sıvılardan elde edilmektedir. Geçtiğimiz yıllarda, tükürükten teşhis daha fazla ilgi görmeye başlamıştır. Tükürük, güvenli tanıda önemli bir rol oynayabilecek çok çeşitli yaşamsal biyobelirteçler içerir. Tükürük en ideal tanı ortamlarından biridir. Ucuz ve non-invazivdir. Herhangi bir sayıda örnek kolayca elde edilebilir, kullanım ve depolama kolaylığı sağlamaktadır [6].

Bakteriler, insan vücudunda önemli simbiyotik organizmalardır, Bunların çoğu, insan sağlığı için faydalıdır. Bununla birlikte, patojenik özelliğe sahip bazı *E. coli* suşları (örneğin O157: H7) vardır. Bu nedenle, tükürükteki patojenik bakterileri tespit etmek için hızlı, basit ve hassas yöntemler acilen gerekmektedir [7]. Bu çalışmada, *E. coli* bakterisinin ATCC 25922 suşunun tespiti hedeflenmiştir. *E. coli* ATCC 25922 insan intestinal mikroflorasının doğal bir üyesi olan gram negatif bir bakteridir. *E. coli* ATCC 25922, laboratuvar deneylerinde sıklıkla model bir organizma olarak kullanılır, çünkü *E. coli* ATCC 25922, diğer organizmaların nasıl işlediğini ve belirli durumlara nasıl tepki gösterdiğini anlamak için deneysel bir araç olarak hizmet veren, patojenik olmayan bir bakteridir. Hızlı üreme süresi, kolay manipüle edilebilirliği ve dizilenmiş genom bilgisine sahip olunması nedeniyle yaygın olarak kullanılan bir model organizmadır [8]. Antibiyotik dirençli suşları olmasına rağmen, bu enfeksiyonlar sıklıkla yanlış teşhis edilebilmektedir. Bakterileri tespit etme yöntemleri, hücre kültürü, mikroskopik analiz ve biyokimyasal testler gibi laboratuvar tabanlı teknolojilere dayanmaktadır. Bu prosedürler zaman alıcıdır, maliyetlidir, uzman ekipman ve eğitilmiş kullanıcılar gerektirir [9]. Taşınabilir piezoelektrik biyosensörler, bakım noktasında hızlı tespit ve teşhisi kolaylaştırabilmektedir. Bu çalışmanın amacı, piezoelektrik biyosensörlerin, numunenin öncül işlenmesine gerek kalmadan bakterinin tespiti için kullanımdaki gelişme altındaki yöntemlerden biri olan QCM biyosensör ile tespitidir. Bu sebeple çalışmada, Kuvars Kristal Mikrobals (QCM) sensörü kullanılarak gerçek tükürük içerisinde *E. coli* bakterilerini tespit etmek için bir piezoelektrik biyo-algılama sistemi geliştirilmiştir.

1.3 Tükürük

1.3.1 Tükürük'e giriş

Tükürük, benzersiz bir sıvıdır ve tükürük bazlı tanı çalışmaları son 10 yıl boyunca katlanarak artmıştır. Bununla birlikte, bu alanda daha fazla ek araştırma yapılması için doğal bir araştırma baskısı vardır. Tükürüğün, hastalıkları teşhis etmek ve hastalığın ilerlemesini tahmin etmek ve kullanılmasını sağlamak için gelişme altında olan birçok teknoloji mevcuttur. Bu çalışma tükürük teşhisinde bazı önemli gelişmeleri açıklamaktadır ve aynı zamanda gelecekteki araştırma faaliyetlerini de teşvik edecektir [10].

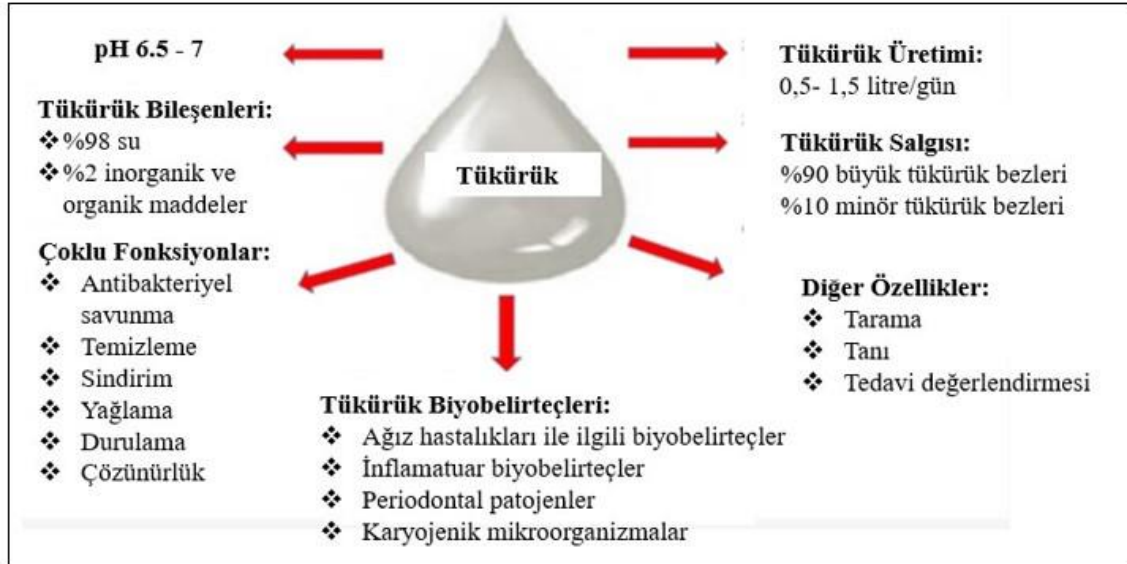
1.3.2 Tükürük Sıvısı

Tükürük, insan ve hayvan ağızda üretilen bir tür sıvıdır. Tükürük, ağız boşluğunda tat duyusuna, konuşmaya, çiğneme, yutmaya yardımcı olan ve ağız mukozasını ve dişleri koruyan en önemli bileşenlerden biridir. Bu sıvı, dilin altındaki tükürük bezleri aracılığıyla üretilir. Ağızdaki tükürük bezleri her gün yaklaşık 1-2 litre arası tükürük salgılar ve pH değeri hafif alkalidir (pH=7.4). Tükürük bezleri, tükürüğü üretme sırasında kan plazmasını temel kaynak olarak kullanmaktadır. Tükürük sıvısı yaklaşık %99 su, glikoprotein, enzim, antimikrobiyal maddelerden oluşur ve çeşitli elektrolitler (sodyum, potasyum, kalsiyum, klorür, magnezyum, bikarbonat, fosfat) ve proteinler içerir. Albümin izleri, bazı polipeptitler ve oral sağlığa fayda sağlayan oligopeptit içeriklerdir [11]. Biyofiziksel açıdan insan tükürüğü, büyük (majör) ve küçük (minör) tükürük bezleri tarafından salgılanan karmaşık bir sıvıdır ve sekresyon otonom sinir sisteminin kontrolü altındadır. Üç ana tükürük bezi parotis, dilaltı ve submandibulardır. Tükürük bezleri iki bileşenden oluşur: Birincisi, izotonik sıvının yapıldığı asiner hücrelerdir; ve diğeri, NaCl'nin çoğunu emen ve orijinal tükürükte K^+ eklediği ve son tükürüğün hipotonik hale geldiği duktal hücrelerdir. Tükürükteki hipo-tonisite, tat duyusu için çok önemlidir çünkü yiyecek bileşenleri, yiyeceğin sindirimi için tat tomurcuğuna ulaşmak için yayılmaktadır [12].

1.3.3 Tükürük fonksiyonları

Şekil 1.1'de gösterildiği gibi, tükürüğün temizleme, durulama, gıda maddelerinin çözündürülmesi, yiyecek ve bakteriyel klirens, yumuşak dokuların yağlanması, yutma, konuşma, sindirim ve çiğnemenin kolaylaştırılması gibi birçok farklı işlevi vardır ve

bunların tümü akışkan özellikleri ve belirli bileşenleri barındırır [13]. Ek olarak, tükürük bileşenleri mukozal kaplama ve antibakteriyel savunmaya katkıda bulunmaktadır [14].



Şekil 1.1. İnsan tükürüğünün bileşenleri, özellikleri ve salgılanması [14].

Tükürük, kas aktivitesi ile eş zamanlı olarak ağız mukozasından yiyecek parçacıklarını yıkar, dişlerden ve yumuşak dokulardaki birikintileri kademeli olarak ağızın arkasına doğru hareket ettirir ve sonunda yutkunma meydana gelmektedir. Tükürük, sulu bir ortamda süspanse edilmiş organik ve inorganik maddeler içerir. Ayrıca, glikoproteinler (müsin gibi) ve sindirim enzimlerini de (lipaz, amilaz gibi) içerir. Laktoferrinler, sistatin, histatin, tiyosiyanat iyonu ve immünoglobulinler gibi başka bileşikler de mevcuttur [15].

1.3.4 Tükürüğün teşhis materyali olarak temel özellikleri

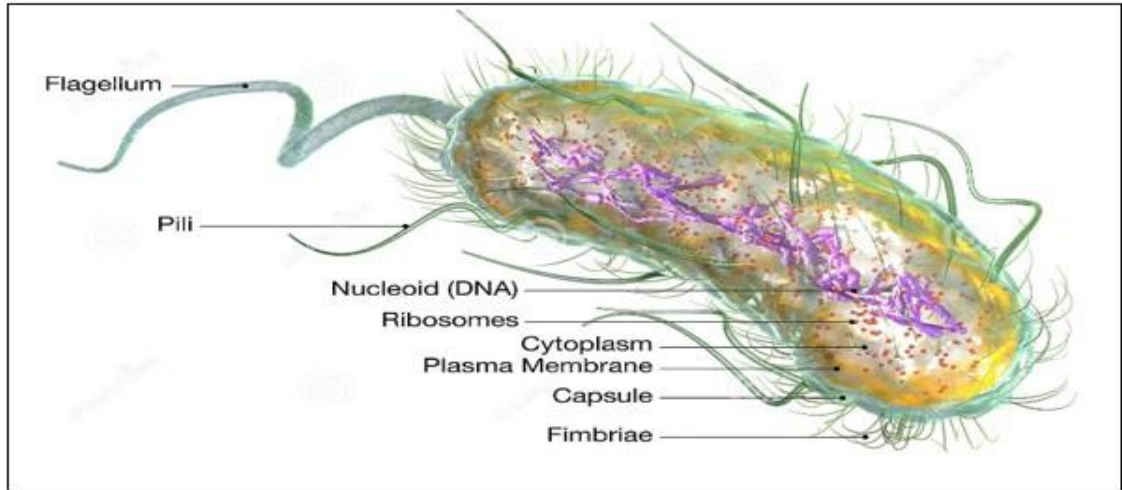
Klinik biyokimyada en yaygın analiz olan kan analizi, hastalıkları tanımlamayı ve tedavinin ilerleyişini izlemeyi amaçlamaktadır [14]. Bununla birlikte, tükürüğün ve ağızdan alınan diğer örneklerin tanısal bir materyal olarak kullanımına olan ilgi artmaktadır. Bir anlamda, toplanması kolay ve invaziv prosedür gerektirmeyen oral bir numune ile benzer veya özdeş bilgiler elde etmek mümkünse, kan alma ihtiyacı gereksiz hale gelecektir [16]. Tükürük, klinik olarak bilgilendirici, biyolojik bir sıvıdır ve prognoz, laboratuvar veya klinik tanıya yönelik yeni yaklaşımlar için yararlıdır. Tükürük bileşimi esas olarak kandan kaynaklanır, ancak tükürük bezlerinde, aktif

taşıma ve salgı mekanizmaları tükürük bileşimini değiştirebilir. Çünkü salgı bezine özgü tükürüğün organik bileşenleri protein sentezinden türetilir ve asiner hücreler içinde depolanmaktadır. Bu biyolojik mekanizmaya dayalı olarak tükürük, tarama, tanı ve prognostik amaçların yanı sıra tedavi sonucunun değerlendirilmesi için plazma / serum analizine bir alternatif olabilmektedir [14]. Tükürüğü biyolojik bir tanı vücut sıvısı olarak kullanmanın birçok yolu vardır. Tükürüğün benzersiz bir teşhis materyali olarak önemli avantajları, kolay elde edilebilirliği, invazif olmayan toplama, taşıma ve saklama yöntemidir [17]. Spesifik çözünür biyolojik belirteçler (biyobelirteçler) içerdiğinden hastalığın erken teşhisi için idealdir. Tükürük, bakım noktası cihazları, hızlı testler veya merkezi klinik laboratuvar operasyonları için daha standart formatlarda geliştirilen multipleks testler için faydalı olmasını sağlayan çoklu biyobelirteçler içermektedir. Tükürük teşhisi, hastalık teşhisinin ve klinik izlemenin bir parçası olarak ve hasta bakımında önemli klinik kararlar almak için kullanılan dinamik bir alandır. Çünkü kanda ve idrarda bulunan biyobelirteçlerin çoğu tükürük örneğinde de tespit edilebilmektedir [18]. Tükürük örnekleme noninvaziv olduğundan ve prosedürü çeşitli koşullarda gerçekleştirme fırsatı verdiğinden, yararlılık açısından kan ve idrar testlerine nazaran daha ön plana çıkmaktadır. Araştırma için materyal elde etmenin basit, invazif olmayan yöntemi ve sonuçların kolay tekrar edilebilirliği, bakım noktası (point of care) testlerinde uygulanmasını faydalı kılmaktadır [17].

1.4 *Escherichia coli* (E. coli) Bakterisi

Escherichia coli (E. coli), Enterobacteriaceae ailesinde yer alan Gram negatif, hareketli, çubuk şeklinde, fakültatif anaerobik bir bakteridir. Gram negatif bakteriler, iki hücre zarı arasına sıkıştırılmış bir peptidoglikan tabakasına sahiptir. Dış zar, porinler gibi proteinlerin yanı sıra lipopolisakkaritleri (LPS) içerir. Bakterilerin iç zarları çeşitli proteinler içerir ve bu tür bakterilerde flagella bulunur. Biyolojide için hücre içi hedefler şunları içerir: proteinler, DNA ve RNA. Çizim, Şekil 1.2'de gösterilmektedir [19]. *Escherichia coli* (E. coli), normal bağırsak florasının bir parçasıdır. Suşlarının çoğu zararsızdır, ancak bazı suşlar bakteriyofaj veya istila faktörlerini alarak patojenik hale gelebilmektedir. *Escherichia coli* suşları bağırsak enfeksiyonlarına ve bağırsak dışı enfeksiyonlara neden olarak iki kısma ayrılmaktadır. *Escherichia coli* izolatları, üç antijen temelinde serotiplenebilir: O, H ve K. Somatik antijen olarak da adlandırılan O antijeni, Dış zardaki bir lipopolisakkaridin polisakkarit fraksiyonudur ve aynı zamanda flagellar

antijen olarak da adlandırılan H antijeni, bakteri kamçısı filamentlerini oluşturan protein flagellindir. Kapsüler antijen olarak da adlandırılan K antijeni, kapsüller üzerindeki asidik polisakkaritlerdir. Çoğu *E. coli* izolatu, yalnızca O ve H antijenleri ile tanımlanmaktadır. Serolojik tiplendirme bakteri izolatları, antikorların antijenik hücre yüzey yapılarına bağlanmasına dayalı izolatları ayırt etmek için tanıtılmıştır [21].

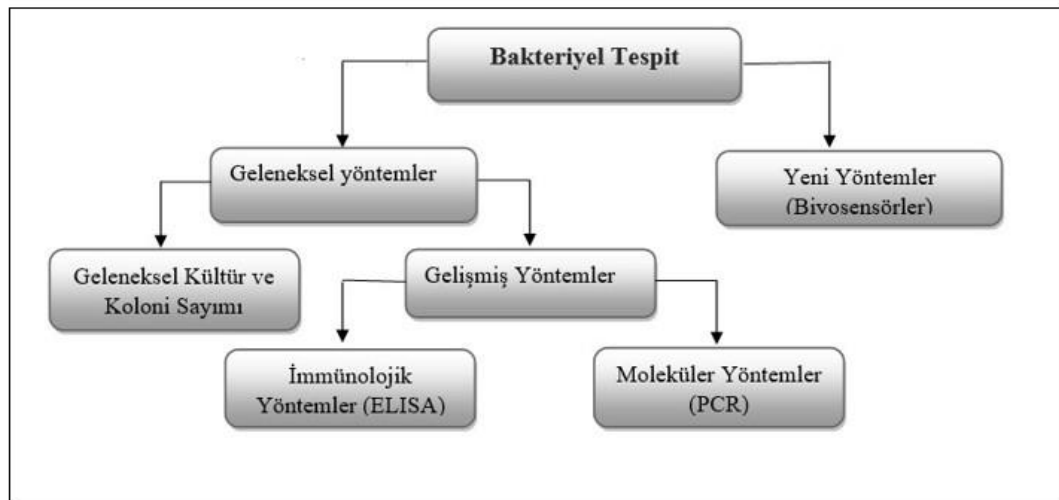


Şekil 1.2. Nükleoid DNA, Ribozomlar, Sitoplazma, Flagellum ve Fimbriae ile *Escherichia coli* bakterisi *E. coli*'yi gösteren çizim [22].

1.5 *E.coli* bakteri tespit yöntemleri

Patojenik bakterilerin erken teşhisi büyük öneme sahiptir. *Escherichia coli* (*E. coli*), en bol bulunan patojenik bakterilerden biri olduğu için model bakteri olarak seçilmiştir. Patojenik bakteri tespiti için hızlı yöntemler kullanmak önemlidir, Şekil 1.3'te gösterildiği gibi, bakterilerin nicel veya nitel tespiti için farklı analitik teknikler mevcuttur [23]. *E. coli* O157: H7'nin tespit edilmesine yönelik geleneksel yöntemler, bakteri kültürü ve koloni sayımını içerir. Bu yöntemler için algılamanın hassasiyet sınırları çok düşük olmasına rağmen, test süresi zaman alıcıdır (1 günden 1 haftaya kadar). Bu bakterilerin hızlı tespiti için bazı yeni protokoller geliştirilmiştir, bu yöntemler arasında immünolojik yöntemler (ELISA) ve polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bulunmaktadır. Bu yöntemlerin hassasiyet ve seçiciliğinin iyi olduğu ve bu yöntemler için saptama süresinin yaklaşık 2 saat ila 24 saat olduğu gösterilmiştir[24]. Bununla birlikte, bu yöntemlerin bazı dezavantajları vardır; örneğin, yüksek maliyetli ekipman, belirli cihazlarla donatılmış laboratuvarlarda kullanım zorluğu bunlardan

birkaçıdır. Ayrıca, bu yöntemlerle, uzman personelin *E.coli* bakterilerini tespit etmesi gerekmektedir. Bu nedenle, *E. coli* O157: H7 bakterilerinin hızlı tespiti için geleneksel yöntemler çok uygun değildir. Son yıllarda, kuvars kristali mikro terazi (QCM) tabanlı biyosensör, patojenlerin ve toksinlerin hızlı tespiti için yeni bir teknoloji ortaya koymuştur [24]. Konsept basitliği, kullanım kolaylığı, düşük maliyeti, yüksek hassasiyeti, hızlı tepkisi ve etiketsiz ölçüme uygunluğu nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu biyosensör teknolojisindeki gelişmeler ile kısa sürede daha kabul edilebilir sonuçlar elde edilmiş ve gerçek zamanlı olarak test edilen mikroorganizmalar için uygun olan en umut verici gelişme altında olan teknolojilerden biri olarak kabul edilmektedir [24].



Şekil 1.3. Farklı bakteri tespit yöntemlerinin temsili [23].

1.5.1 Geleneksel kültürleme yöntemleri

Geleneksel kültürleme yöntemlerinde, bir numunede bulunan bakteriler, varlıklarını doğrulamak ve onları izole etmek için farklı ortam türlerinde kültürlenmektedir. Nicel ve nitel olmak üzere iki ana kültür yaklaşımı kullanılmaktadır. Niteliksel kültürleme tekniğiyle, hedef bakteri kolonileri seçici veya farklı ortamlarda üretilir. Kantitatif kültür tekniğinde, spesifik bakteriler, mikroorganizmaların toplamını değerlendirmek için hesaplanabilen spesifik koloniler oluşturmak üzere çoğaltılır. Son olarak farklı biyokimyasal testler yapılmaktadır [23]. Geleneksel bakteri tespit ve tanımlama yöntemleri tipik olarak uzun işlem sürelerine sahiptir -birkaç gün sürebilir-, hassaslık ve

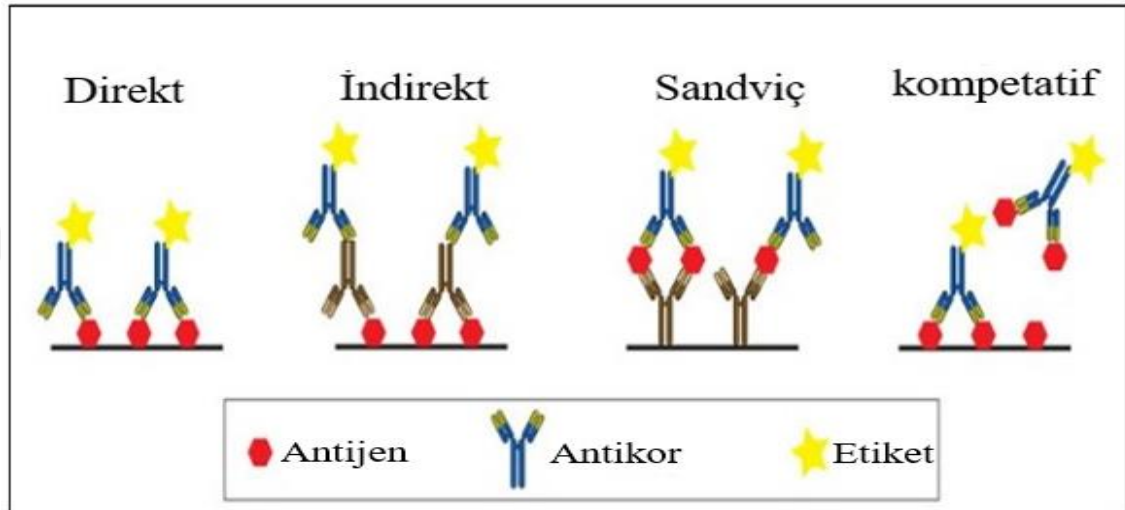
özgüllükten yoksun olabilir ve özel ekipman ve uzman kullanıcılar gerektirebilir. Ayrıca, tüm bakteri türlerinin laboratuvarda kültürlenmesi mümkün değildir [25].

1.5.2 İmmünolojik yöntemler:

1.5.2.1 Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA)

Bakteri kültürünün zorlukları nedeniyle bakterileri tespit etmek için immünolojik yöntemler kullanılmıştır. İmmünolojik analizler arasında enzime bağlı immünosorbent (ELISA) ve aglütinasyon testleri bulunur (genellikle belirli yüzey epitoplarını tespit etmek için kullanılmaktadır) [25]. Enzime Bağlı İmmünosorbent Testi (ELISA), enzime bağlı antikorlar kullanılarak bir örnekte belirli antijen (Ag) veya antikorun (Ab) saptanması için kullanılan, yüksek spesifiteye sahip, oldukça hassas bir immünolojik tekniktir. ELISA'nın temel prensibi, bir immünolojik testte antijen veya antikoru tespit etmek için antikora bağlı bir enzim kullanmaktır. ELISA, enzimlere konjuge edilmiş yüksek spesifik antikora sahip antijeni hedeflemek için kullanılmaktadır. Bu enzimle konjuge antikorların ilgili antijenlere bağlanmasına izin verilir ve daha sonra buna uygun kromojenik substratın (Ag – Ab – E kompleksi) eklenmesinden sonra, enzimatik aktivite nedeniyle renk üretilir. Enzim aktivitesi, enzim tarafından modifiye edildiğinde renk değiştiren bir substrat kullanılarak ölçülür. Substrat ilavesinden sonra oluşan ürünün ışık absorpsiyonu ölçülür ve sayısal değerlere dönüştürülür [26]. ELISA için kullanılan birkaç format vardır; bunlar doğrudan, dolaylı, sandviç ve kompetitif protokoller olarak sıralanabilir. (Şekil 1.4'ta gösterildiği gibi). Anahtar adım, ilgili antijenin hareketsizleştirilmesidir. Bu yöntemde, ya tahlil plakasına doğrudan adsorpsiyonla ya da plakaya eklenmiş bir yakalama antikoru yoluyla dolaylı olarak gerçekleştirilir. Antijen daha sonra doğrudan (etiketli birincil antikor) veya dolaylı olarak (etiketli ikincil antikor gibi) tespit edilir. En yaygın olarak kullanılan ELISA test formatı, dolaylı olarak hedef antijenin varlığını tespit eden sandviç ELISA testidir. Bu tip bir tahlil, "sandviç" tahlil olarak adlandırılır. Çünkü ölçülecek analit iki adet birincil antikor arasına bağlanır. Her biri farklı bir epitopu (antijenik bölgeyi) - yakalama antikoru ve saptama antikoru - tespit eder. Sandviç ELISA formatı, duyarlılığı ve özgüllüğü nedeniyle oldukça yaygın şekilde kullanılmaktadır. Yukarıda açıklanan doğrudan ve sandviç formatların yanı sıra, diğer ELISA protokolleri de mevcuttur. Kompetitif ELISA, antijen küçük olduğunda ve yalnızca bir epitop veya antikor bağlanma bölgesine sahip olduğunda yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu

yöntemin bir varyasyonu, antikor yerine saflaştırılmış antijenin etiketlenmesinden oluşur. Örneklerden gelen etiketlenmemiş antijen ve etiketli antijen, yakalama antikoruna bağlanmak için rekabet eder. Saflaştırılmış antijenden gelen sinyaldeki bir azalma, numunelerde antijenin varlığını göstermektedir [27].



Şekil 1.4. Farklı ELISA protokollerinin şeması (doğrudan, dolaylı, sandviç, kompetitif) [28].

Tablo 1.1 Doğrudan, dolaylı, sandviç ve Kompetitif ELISA tespit yöntemlerinin karşılaştırması [29].

Protokollar	Hedef	Avantajlar	Dezavantajlar
Direkt ELISA	Ab	- Hızlıdır çünkü yalnızca bir antikor kullanılır. - Sekonder antikorun kross reaktivitesi ortadan kaldırılmaktadır.	- Bir deneyden diğerine birincil antikor etiketi seçiminde esneklik yoktur. - Küçük sinyal amplifikasyonu.
İndirekt ELISA	Ab ve Ag	- Çok yönlüdür çünkü birçok birincil antikor tek bir türde yapılabilmektedir. - Yüksek hassasiyet. - Ekonomik daha az etiketli antikora ihtiyaç vardır.	- Sekonder antikorla kross reaktivite meydana gelebilir ve spesifik olmayan sinyale neden olabilmektedir. - Sekonder antikor için ek inkübasyon adımı gereklidir.
Sandviç ELISA	Ab	- Farklı epitoplara sahip iki antikor kullanıldığından yüksek	- Standart bir ELISA kiti veya test edilmiş antikor çifti

		özgüllük. - Aynı yakalama antikoru ile farklı tespit yöntemleri kullanılabilir.	gerekmektedir. - İki farklı antikor hazırlamak çok pahalıdır.
Kompetitif ELISA	Ab	- Numune işlemeye gerek yoktur ve ham veya saf olmayan numuneler kullanılabilir. - Yüksek esneklik.	Her antigen enzime bağlanması için farklı metod ile gerekli olabilmektedir.

1.5.2.2 ELISA ile *E. coli* Tespiti:

E. coli bakterilerinin sudaki direkt tespiti için uygulanan bazı yeni yöntemler enzime bağlı immünosorbent testidir (ELISA). Haiyan ve arkadaşlarının 2007 yılında yapmış oldukları çalışmada, enzime bağlı immünosorbent testine (ELISA) dayalı olarak atık suda *Escherichia coli* tespit edilmiştir. İlk olarak, bir belediye atık su arıtma tesisinin (AAT) çökeltme havzasından su numunesi alınmıştır. *E. coli* bakteri numunesinin hazırlanmasından sonra, *E. coli*, geniş spektrumlu antikor kullanılarak, antikor / antijene özgü reaksiyonlarla tespit edilmiştir. Bu sonuçlar, düşük maliyetli, kullanışlı ve hassas bir tespit yöntemi olduğunu göstermiştir [30]. 2018 yılında, gerçek gıda örneklerinde *E. coli* O157: H7 kontaminasyonunu tespit etmek için basit bir kağıt tabanlı kolorimetrik platform (p-ELISA) geliştirilmiştir [31].

Kağıt tabanlı algılama cihazları, hafif, tek kullanımlık, yüksek oranda biyolojik olarak parçalanabilir olmanın yanı sıra pahalı olmamasının avantajlarına sahiptir. Çalışma sonuçları, p-ELISA yönteminin geleneksel ELISA'ya göre birkaç önemli avantaja sahip olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, ELISA tabanlı yaklaşım, iyi tespit limitleri göstermiştir, ancak önemli ölçüde zaman ve yüksek maliyet gerektirmektedir [31].

1.5.3 Moleküler teknikler:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) gibi moleküler tekniklerin ortaya çıkışı, bakteri suşlarının daha hızlı tanımlanmasını sağlamıştır. Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), bakterilerin genetik materyallerine dayalı olarak tanımlanmasına izin veren son derece hassas bir tekniktir. Bu reaksiyon, küçük numune boyutu nedeniyle bir bakteri kültürü aşaması gerektirmez. PCR yönteminde, hedef bakteri dizisi ile doğru şekilde eşleşmek için kullanılacak, önceden seçilmiş genetik problemlere ihtiyaç vardır. Yanlış eşleştirme,

yanlış pozitif sonuçlara neden olabilir ve genetik olarak mutasyona uğramış suşlar, doğru prob eşleşmesinden kaçarak yanlış sonuç verebilir. Bununla birlikte, bu prosedür zaman alıcı, yüksek maliyetlidir ve birkaç gün sürebilir. Yeni nesil gerçek zamanlı PCR analizi birkaç saat içinde tamamlanabilmektedir, ancak özel ekipman ve pahalı kimyasal reaktifler gerektirmektedir [25].

1.5.3.1 Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)

Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR), DNA dizilerinin in vitro amplifikasyonu için geliştirilmiş bir yöntemdir. Bu reaksiyon, bir ısı döngüleyici (thermocycler) kullanılarak otomatik denatürasyon yapılmasını, ve sentez döngülerini içerir. PCR, 1980'lerin başında, 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülen Kary Mullis tarafından tasarlanmış ve geliştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu, küçük miktarlardaki nükleik asitlerin hassas bir şekilde tespitine ve analizine izin verir [32].

PCR'nin kullanım alanları arasında genetik tespitin yanı sıra klonlama ve sıralama da yer almaktadır [33].

1.5.3.1.1 PCR Prensibi

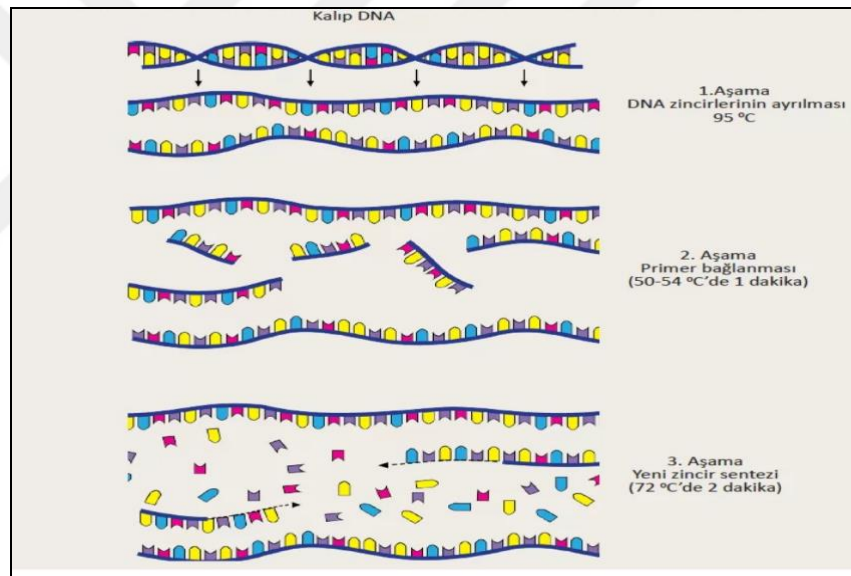
PCR, biyolojik bir numuneden spesifik bir veya birden fazla spesifik nükleotid sekansını amplifiye etme aracı olarak basitçe tanımlanabilir. PCR'yi gerçekleştirmek için gereken temel malzemeler (1) DNA polimeraz, (2) primerler, (3) deoksiniükleotid trifosfatlar (dNTP'ler) , (4) nükleik asit şablonu (DNA veya RNA) , (5) termal döngüleyici ve (6) tamponlardır (uygun tuzlar dahil) [33]. Nükleik asit ilk olarak klinik numuneden ısı, kimyasal veya enzimatik yöntemlerle ekstrakte edilmektedir. Ekstrakte edildikten sonra, hedef nükleik asit, primerler, polimeraz aktivitesini optimize etmek için bileşenler ve bir test tüpündeki enzimler içeren reaksiyon karışımına eklenmektedir. Daha sonra DNA amplifikasyonu için tekrarlanan döngülerine izin veren bir termal döngüleyiciye yerleştirilmektedir. Şekil 1.5 'te gösterildiği gibi, PCR reaksiyonu üç temel aşama içerir; denatürasyon, primer bağlanması ve uzama.

1. DNA denatürasyonu - Çift DNA zincirlerinin iki tek zincir'e ayrılması 94°C'ye ısıtılarak gerçekleştirilmektedir.

2. Primer bağlanması- reaksiyon sıcaklığı 20–40 saniye süreyle 50–58 ° C'ye düşürülür, böylece primerlerin tek sarmallı DNA şablonlarının her birine tavlama sağlanmaktadır.

3. Primer uzaması - Enzim DNA polimeraz, 72 ° C'de primerlerin uzatılmasıyla yeni tamamlayıcı zincirleri sentezler.

Taq polimeraz, yüksek sıcaklıklarda verimli bir şekilde işlev görmesi nedeniyle yaygın olarak kullanılmaktadır. Otomatik programlanabilir termal döngüleyiciler, PCR karışımını, her reaksiyon adımında kesin sıcaklıkta ve optimum bir süre boyunca ısıtmaktadır. Genelde işlem 30 defa tekrarlanır. 30 döngünün sonunda, reaksiyon karışımı istenen ürünün yaklaşık 2^{30} molekülünü içermektedir [34].



Şekil 1.5. PCR reaksiyonu ana aşamaların gösterimi (denatürasyon, primer bağlanması, uzama) [35].

Aşağıdaki tablo 1.2, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanmanın avantajlarını ve dezavantajlarını kısaca açıklamaktadır.

Tablo 1.2 PCR kullanımının avantajları ve dezavantajları [36].

Avantajlar	Dezavantajlar
Yüksek duyarlılık ve özgüllük	Yüksek cihaz maliyeti ve yüksek ekipman ihtiyacı
Teşhis ve tespit hızı	Analizlerin tecrübe ve yetenek gerektiriyor olması
Anti-mikrobiyal direnci test etme yeteneği	amplifikasyon nedeniyle yanlış pozitif sonuçlar
Cansız etkenleri saptayabilme yeteneği	kontaminasyon problemi

1.5.3.1.2 PCR METOTLARI:

PCR tekniğinin bulunmasından bu yana teknolojiye çok hızlı gelişmeler olmuş ve buna bağlı olarak da çok farklı PCR metotları geliştirilmiştir.

1.5.3.1.2.1 Geleneksel PCR:

Bu, iki ayrılmış hedef dizgiye bağlanmak için tek bir primer çiftinin kullanıldığı standart bir genetik materyal çoğaltma yöntemidir. Primerler ayrıca kopyalanacak hedef dizileri de tanımlar. PCR, hedef DNA dizilerinin milyonlarca kopyasını üretmektedir.

1.5.3.1.2.2 Gerçek zamanlı PCR (qPCR):

qPCR, PCR reaksiyonu sırasında gerçek zamanlı olarak, şablon DNA'nın amplifikasyonunu ölçmek için kullanılan bir tekniktir. Bu tip PCR, genellikle bir numunede bulunan DNA hedeflerinin sayısını tahmin etmek veya gen ekspresyonunu incelemek ve karşılaştırmak için kullanılmaktadır. Gerçek zamanlı PCR kantitatif olarak (qPCR) kullanıldığında, amplifikasyon miktarı, spesifik olmayan floresan boyalar veya sekansa spesifik DNA oligonükleotid floresan problemleri kullanılarak ölçülmektedir.

1.5.3.1.2.3 Koloni PCR

Koloni PCR, direkt bakteri kolonilerinden plazmide eklenen DNA'nın varlığını veya yokluğunu belirlemek için hızlı, yüksek verimli bir PCR yöntemidir. Plazmid içeren bakteri kolonisi, iki set primer kullanılarak doğrudan amplifiye edilebilmektedir.

İlk set, yerleştirme dizisini büyüten eke özgü primerlerdir ve diğeri, eklenen DNA dışındaki plazmid DNA'yı büyüten vektöre özgü kuşatma primerleridir. Bir bakteri kolonisi alınır ve bu koloni, diğer tüm PCR reaktiflerini içeren ana karışıma direkt eklenmektedir [37].

1.5.3.1.2.4 Katlı PCR (Multiplex PCR):

Katlı PCR, tek bir PCR deneyinde birden fazla hedefin amplifikasyonu için yaygın bir moleküler biyoloji tekniğidir. Multipleks PCR'de, farklı hedeflerin amplifikasyonu için tasarlanmış iki veya daha fazla primer seti, aynı PCR reaksiyonuna dahil edilmektedir. Bu teknik kullanılarak, bir klinik örnekteki birden fazla hedef sekans, tek bir tüpte amplifiye edilebilmektedir. Katlı PCR kullanımı, bir örnekte iki, üç veya daha fazla patojeni aynı anda tespit etmek için maliyetleri ve zamanı azaltabilse de katlı PCR'nin geliştirilmesi daha karmaşıktır ve genellikle tek primer setli PCR'den daha az hassastır [38].

1.5.3.1.2.5 İç içe PCR (Nested PCR):

İç içe PCR durumunda, DNA amplifikasyonu için ikiden fazla primer çifti kullanılmaktadır. İlk PCR, geleneksel bir PCR'dir ve primer, numunenin DNA şablonu için kullanılmaktadır. İkincil PCR'de, birinci PCR'nin ürünü, ikinci primer setinin hedefi olarak kullanılmaktadır. İkincil PCR'nin DNA dizisi farklıdır ve bu nedenle istenmeyen PCR ürünü oluşma şansı yoktur [39].

1.5.3.1.2.6 Asimetrik PCR:

Bu teknikte, eşit olmayan konsantrasyonlarda primerler kullanılmaktadır. Reaksiyon sırasında, reaksiyon karışımındaki, sadece yeterli miktarda primer, belirli DNA ipliğini fazlalık olarak üretmektedir. Bu nedenle tek iplikçikli DNA (ssDNA), PCR ürünü olarak oluşturulur. Reaksiyon yavaş olduğundan, bu teknikte çok daha fazla döngüye ihtiyaç vardır. Asimetrik PCR, DNA dizilemesi ve hibridizasyonu için kullanılır, çünkü bu gibi durumlarda sadece bir sarmal gereklidir [39].

1.5.3.1.2.7 Kademeli Sıcaklık Düşürme PCR (Touchdown PCR):

PCR reaksiyonlarının özgülüğünü artırmak için kullanılan bir yöntemdir. Touchdown (TD) PCR, primerlerin yeniden tasarlanmasına gerek kalmadan özgülüğü ve hassasiyeti artırmak için PCR reaksiyonlarında kullanılan, basit ve hızlı bir yöntemdir. TD-PCR'de, kullanılan primerlerin öngörülen erime sıcaklığının (T_m) üzerinde bir ilk tavlama sıcaklığı kullanılmaktadır. Daha sonra, primerlerin hesaplanan tavlama sıcaklığına veya birkaç derecenin altına ulaşana kadar aşamalı olarak daha düşük bir tavlama sıcaklığına

geçiş sağlanmaktadır. Son olarak, bu tavlama sıcaklığı kullanılarak amplifikasyona devam edilmektedir [40].

1.5.3.1.2.8 Ters Transkriptaz PCR (Reverse Transcriptase PCR, RT-PCR):

Ters transkripsiyon PCR’de (RT-PCR), başlangıç şablonu olarak DNA yerine mRNA kullanılmaktadır. İlk olarak, enzim ters transkriptaz, ters transkripsiyon olarak bilinen bir süreç ile cDNA adı verilen tamamlayıcı tek iplikçikli bir DNA zinciri üretmek için mRNA şablonunu kullanmaktadır. Daha sonra, tek sarmallı cDNA'yı çift sarmallı DNA'ya dönüştürmek için DNA polimeraz kullanılmaktadır. Bu teknik, geleneksel klonlama teknikleri için gereken zahmetli mRNA saflaştırma işlemine olan ihtiyacı ortadan kaldırır. RT-PCR, küçük numunelerden mRNA seviyelerini ölçmek için kullanılabilir [41].

1.5.3.1.3 PCR ile *E. coli* Tespiti:

Imtiaz vd. (2013) çalışmasında, PCR, Sudaki *E. coli* bakterilerini direkt analiz etmek için kullanılmıştır. İçme suyunda, *E. coli* O157: H7 ve *E. coli* virülans geni SLT-I’nın (Shiga benzeri toksin) çift zenginleştirme adımı kullanılarak saptanması için bir PCR protokolü geliştirilmiştir. Bu yöntem, Genomik DNA ekstraksiyon kiti kullanılarak bakteriyel DNA saflaştırma ve ardından PCR tespitinden oluşmaktadır. PCR sonuçları, *Escherichia coli* için yüksek hassasiyet (<100 CFU/L) göstermiştir. Bu yöntem, geleneksel yöntemlerle karşılaştırıldığında, düşük seviyelerde patojenlerin saptanmasında etkili olduğu görülmektedir [42]. 2017’de, gıdadaki *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7 bakterinini tespit etmek için dupleks PCR ve kemilüminesans (CL) bazlı yeni bir strateji geliştirilmiştir. Bu çalışmada, antijen epitopları O157 geni (*rfbE*) ve flagella antijeni H7 geni (*fliC*) eş zamanlı olarak çoğaltılmış ve çift yönlü PCR yoluyla biotin ile etiketlenmiştir. Biotinle edilmiş *rfbE* ve *fliC* amplikonları, art arda oligonükleotit probu ile modifiye edilmiş manyetik nano partiküllerin (MNP’ler) yüzeyine alınmıştır. (ALP-STA) ile konjüge edildikten sonra, CL sinyalleri üretilmiştir. Kararlı CL yoğunluğu, *E. coli* O157: H7’nin varlığını doğrulayan *rfbE* ve *fliC* genlerinin miktarını yansıtmaktadır. Tespit sınırı 10 pM olarak bulunmuştur. Sonuçlar, yüksek hız ve hassasiyete ek olarak, bu yaklaşımın güvenilirliğini ve tekrarlanabilirliğini göstermiştir. Bununla birlikte, polimeraz zincir reaksiyonunun (PCR) dezavantajları da

vardır. Örneğin, pahalı ekipman ihtiyacı, yalnızca gelişmiş ülkelerde erişilebilir olan tam donanımlı laboratuvarları gerektirmektedir [43].

1.5.4 Biyosensör

Biyosensör, reaksiyondaki bir analitin konsantrasyonuyla orantılı sinyaller üreterek biyolojik veya kimyasal reaksiyonları ölçen ve daha sonra detektöre iletilen bir cihazdır [44].

1.5.4.1 Biyosensörlerin tarihçesi

Biyolojik ve biyokimyasal süreçler tıp, biyoloji ve biyoteknoloji üzerinde çok önemli bir rol oynamaktadır. İlk biyosensör 1950 yılında Amerikalı biyokimyacı "L.L Clark" tarafından tasarlandı. Kandaki oksijeni ölçmek için tasarlanan bu biyosensörde, kullanılan elektrot Clark elektrodu veya oksijen elektrodu olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra, kan şekerini hesaplamak için oksijen elektrodunun üzerine glikoz oksitleyici enzim içeren bir jel yerleştirilmiştir. Buna bağlı olarak, idrar ve kan gibi vücut sıvılarındaki üre miktarını hesaplamak için bir elektrotla üreaz enzimi kullanılmıştır. Biyosensörler üç nesilde sınıflandırılabilir. Birinci tip biyosensörlerde, ürünün reaksiyonu sensöre dağılır ve elektriksel reaksiyona neden olur. İkinci tür biyosensör, daha iyi bir yanıt üretmek için özellikle sensör ve yanıt arasındaki aracılar ile ölçümü içerir. Üçüncü nesil biyosensörlerde, tepkinin kendisi tepkiye neden olmaktadır ve bu nesil biyosensörler, hiçbir aracıya ihtiyaç duymadan, doğrudan tespiti mümkün kılmaktadır [45].

1.5.4.2 Biyosensör yapısı

Biyosensörler esas olarak iki sistem kullanır, bu yapı biyo-tanıma elemanları ve transdüksiyon sisteminden oluşur. Biyoreseptör, hedef analiti tanıyan biyolojik bir bileşendir (doku, mikroorganizmalar, organeller, hücre reseptörleri, enzimler, antikolar, nükleik asitler vb.). Diğer kısım ise, kimyasal, biyolojik ya da biyokimyasal sinyali ölçülebilir bir sinyale dönüştüren fizikokimyasal detektör bileşeni olan dönüştürücüdür. Şekil 1.6'da, tipik bir biyosensör yapısının şematik bir görünümünü yer almaktadır. Biyo-tanıma elemanları ile numune arasındaki etkileşim (giriş sinyali), transdüksiyon sistemi (dönüştürücü-transducer) tarafından bir çıkış sinyaline dönüştürülür. Bu

bölümde, biyosensörlerin özellikleri ve fonksiyonları ile ilgili detaylı bilgiler sunulmaktadır [46].



Şekil 1.6. Biyosensörün şematik gösterimi [47].

1.5.4.3 Biyosensörün Özellikleri

Biyosensörlerin tipik özellikleri aşağıdaki şekilde sıralanabilir.

Seçicilik: Sensörün sadece belirli bir analiti algıladığı, eklenen diğer karışımlarla reaksiyona girmediğini göstermektedir.

Kesinlik: Değişmeyen koşullar altında tekrarlanan ölçümlerin aynı sonuçları gösterme derecesidir.

Sinyal kararlılığı: Sabit koşullar altında ölçülen konsantrasyonlarda hataya neden olan sinyal sapmaları biyosensörün kararlılığını göstermektedir.

Hassasiyet (tespit limiti): Tespit edilebilen minimum analit miktarıdır (veya konsantrasyonu).

Çalışma aralığı: Sensörün çalışabileceği analit konsantrasyon aralığını göstermektedir.

Rejenerasyon süresi: Sensörün numune ile etkileşimden sonra yeniden çalışma durumuna döndürülebilmesi için gereken süre [48].

1.5.4.4 Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, biyolojik maddeye ve sensör cihazına ve dayanarak sınıflandırılır.

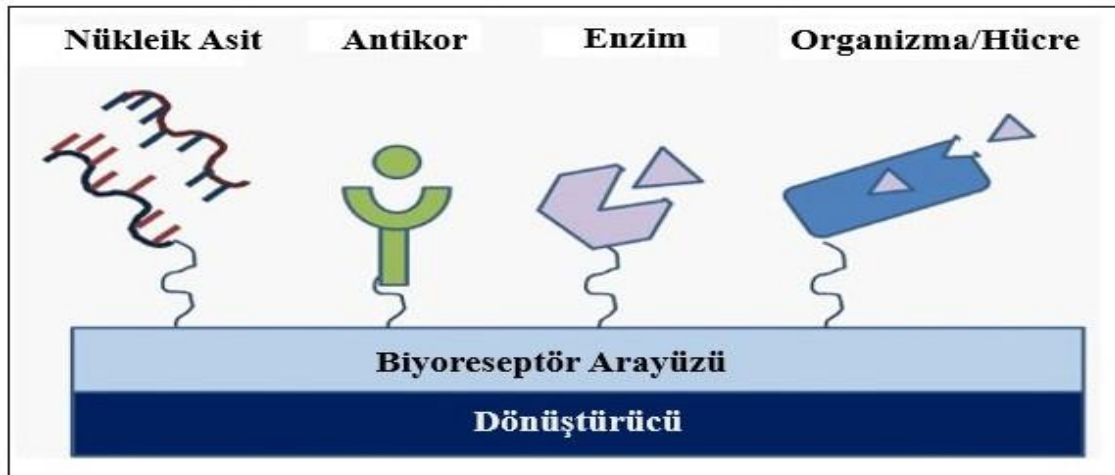
Tablo 1.3 Biyosensörlere dahil edilen önemli biyolojik elementler ve dönüştürücüler [49].

Biyolojik Elementler	Transdüserler
Enzimler	<i>Elektrokimyasal</i>
Reseptörler	- poteniometrik
Antikorlar	- amperometrik
Tüm hücreler	- kondüktometrik
Dokular	<i>Optik</i>
DNA çift ve tek iplikli	- ışıldama
	- absorbans (UV/ Görünür)
	- Yüzey Plazmon rezonansı
	- sonsuzluk dalgası
	<i>Piezoelektrik</i>
	<i>Manyetik</i>

1.5.4.4.1 Biyolojik elementler

1. Enzim Bazlı Biyosensörler: Bu biyosensörlerde hareketsizleştirilmiş enzimler kullanılmaktadır. Enzimler, reaksiyonların tespitinin temelini oluşturmak için hedef analiti birleştireceği şekilde seçilir.
2. İmmünoanaliz Bazlı Biyosensörler: Bu biyosensörde spesifik antijen antikor bağlanması izlenmektedir (örn., Dolaylı olarak bir flüoresan optik etiket yoluyla veya doğrudan bir kırılma indisi veya yansıtma değişikliği gözlemlenerek).
3. Nükleik asit Bazlı Biyosensörler: Tamamlayıcı dizilerle çift sarmallı DNA oluşturmak için tek sarmallı DNA'nın (ssDNA) hibridizasyonunu kullanılmaktadır.
4. Organel Biyosensörler: Bu biyosensörlerde, saptama ilkesi olarak bir analitin sağlam bir tam hücre / organel üzerindeki etkilerini kullanılmaktadır.
5. Biyomimetik Biyosensörler: Bu biyosensörlerde, biyolojik seçiciliği taklit etmek için biyolojik olmayan malzemeler kullanılmaktadır.

Şekil 1.7'de, geleneksel biyoreseptör türlerini kullanan kavramsal biyosensör konseptini göstermektedir [50].

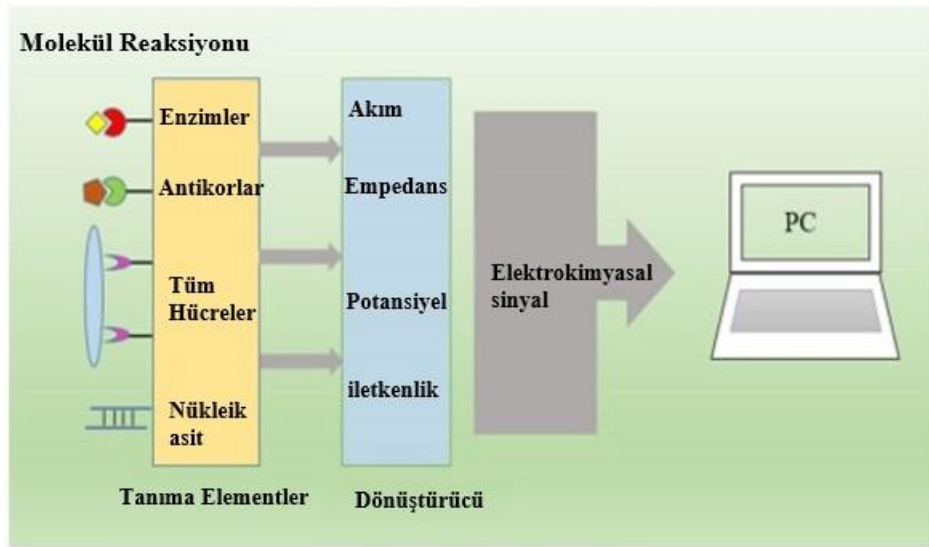


Şekil 1.7. Geleneksel biyoreseptör türlerini kullanan biyosensör konsepti [51].

1.5.4.4.2 Dönüştürücüler

1.5.4.4.2.1 Elektrokimyasal Biyosensörler

Elektrokimyasal biyosensör, biyokimyasal olayların elektrik sinyallerine dönüştürülmesine dayanan algılama cihazlarından biridir. Bu tip sensörde, elektrot, biyomoleküllerin hareketsizleştirilmesinde kullanılan önemli bir bileşendir [52]. Elektrokimyasal sensör, yüzeyinde bir elektrot tabakasından ve orta kısmında bir içbükey alan içeren, deforme olmayan malzemeden tasarlanan bir kapağa sahip yalıtım tabanından oluşmaktadır. Böylece taban ile birleştiğinde kapak ve taban, elektrot katmanını içeren bir boşluk oluşturur. Elektrot tabakası bir reaksiyon tabakası ile işlevsel temas halinde olduğunda (uygun bir analizle temas üzerine hareketli elektronların üretimine neden olan bir enzim dahil), analit konsantrasyonu, uygun bir analit ile temas ettirildiğinde hareketli elektronların akışı tarafından oluşturulan akım değerlerine bakılarak ölçüm alınmaktadır. Elektrokimyasal algılama genellikle bir referans elektrot, bir sayaç veya yardımcı elektrot ve aynı zamanda algılama veya redoks elektrot olarak da bilinen bir çalışma elektrotu gerektirir. Çalışma elektrodu, biyokimyasal reaksiyonda transdüksiyon elemanı olarak hizmet ederken, karşı elektrot elektrolitik solüsyonu ile temas oluşturur, böylece çalışan elektroda bir akım uygulanabilir. Bu elektrotlar hem iletken hem de kimyasal olarak kararlı olmalıdır. Bu nedenle, analite bağlı olarak değişmek kaydıyla platin, altın, karbon (örneğin grafit) ve silikon bileşikleri tasarımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Şekil 1.8, elektrokimyasal biyosensörlerin şematik bir temsili göstermektedir [53].



Şekil 1.8. Elektrokimyasal biyosensörlerin şematik gösterimi [54].

Biyomoleküllerin analizi için mevcut olan çeşitli teknik türleri arasında, elektrokimyasal biyosensörler taşınabilirlik, yerinde tespit yeteneği ve seçicilik özellikleriyle avantajlı konumdadır. Antikor bazlı biyosensörler, hedef analitlere karşı yüksek afiniteleri nedeniyle gelişmiştir. Bir çalışmada, Gupta, v.d. Elektrokimyasal biyosensörlerde antikor olarak biyo-tanıma molekülleri kullanmıştır [55]. *E. coli*, gıda ve su kaynaklı birçok hastalığa neden olan en yaygın patojenlerden biridir. Elektrokimyasal biyosensörler ile tespiti, grafen, grafen-altın veya grafen-gümüş nanopartikül kompozitleri gibi nano yüzeylerden yararlanılarak bildirilmiştir. Başka bir çalışmada, *E. coli* bakterilerinin oldukça hassas tespiti için Cu-MOF bazlı bir elektrokimyasal biyosensör geliştirilmiştir. Sensör, kısa bir tepki süresi ve yüksek seçicilikle çok düşük *E. coli* konsantrasyonlarını (2 CFU/mL) tespit etmek için yüksek hassasiyet göstermiştir [55].

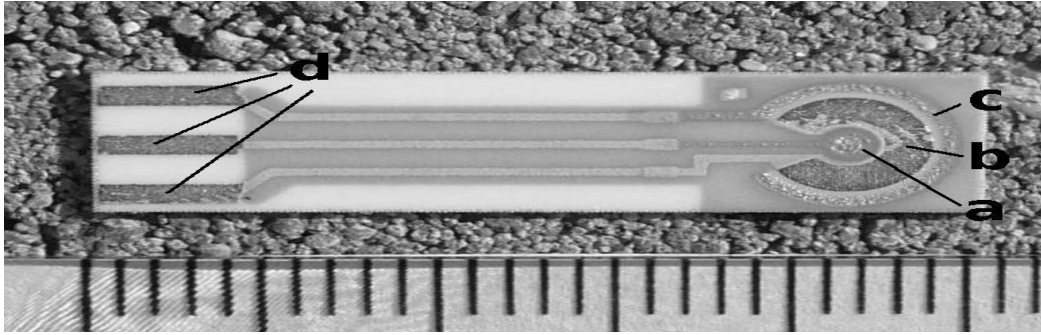
Elektrokimyasal biyosensörler 4 farklı sınıfa ayrılmaktadır:

1.5.4.4.2.1.1 Amperometrik biyosensörler

Amperometrik biyosensörler, çözeltideki analit konsantrasyonu ile ilgili bir biyokimyasal reaksiyonda elektroaktif bir türün oksidasyonu ve indirgenmesi yoluyla üretilen akımı ölçmektedir [56]. Amperometrik biyosensörün çalışma elektrodu genellikle ya soy bir metaldir ya da biyo-tanıma bileşeninin kapladığı ekran baskılı bir katmandır. Uygulanan potansiyel ile, enzim katmanında üretilen elektroaktif türlerin

dönüşümü elektrotta gerçekleşmekte ve ortaya çıkan akım (genellikle nA ila μ A aralığında) ölçülmektedir.

Amperometrik biyosensörler, iki veya üç elektrotlu konfigürasyonlarda çalışabilir. İlk durum, referans ve çalışma elektrotlarından oluşur. İki elektrotlu konfigürasyonun ana dezavantajı, daha yüksek akımlarla çalışan elektrot yüzeyindeki potansiyelin sınırlı kontrolüdür ve bu nedenle doğrusal aralık kısaltılabilir. Bu sorunu çözmek için üçüncü bir yardımcı elektrot kullanılmakta ve referans ile çalışan elektrotlar arasına voltaj uygulandığında çalışan ve yardımcı elektrotlar arasında akım akmaktadır. Şekil 1.9'de ortak bir ekran baskılı üç elektrot sensörü gösterilmektedir [57].



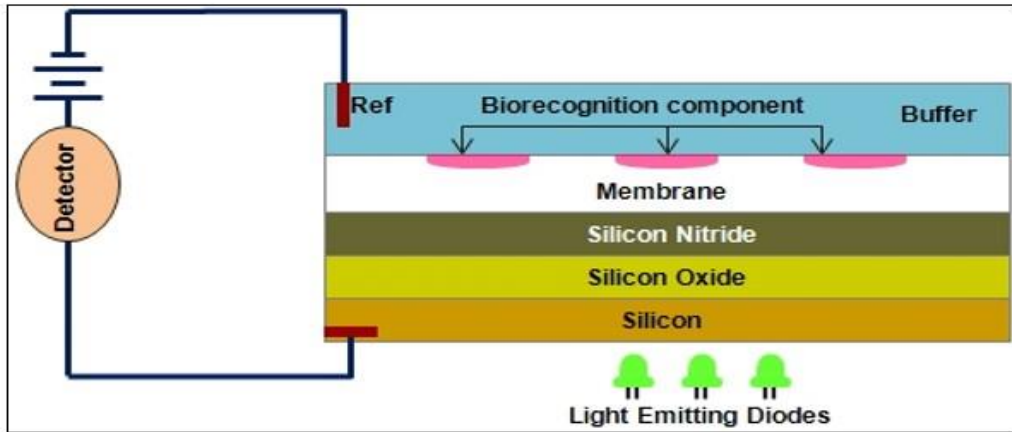
Şekil 1.9. Üç elektrotlu ekran baskılı sensör örneği. Sensör gövdesi seramikten yapılmıştır. Altın çalışan bir elektrot (a) bir Ag / AgCl referans elektrotu ile çevrilidir (b) altın yardımcı elektrot (c) D harfi, gümüş çıkış kontakları anlamına gelir [57].

Bir fruktozil peptid oksidaz (FPOX) enzimi, kitosan (CHIT), grafen oksit (GO) ve altın nanopartiküller (AuNP'ler) ile modifiye edilen elektrot yüzeyinde hareketsizleştirilmiş ve biyosensör, yüksek bir hassasiyetle farklı FruValHis konsantrasyonlarına karşı doğrusal bir yanıt gösterecek şekilde kurgulanmıştır. FPOX ile modifiye edilmiş elektrotun Fru-ValHis ile inkübasyonundan sonra elektron transfer direncinde önemli bir değişiklik gözlemlenirken, Fru-ValHis'in spesifik ölçümünü gösteren kontrol ile hiçbir yanıt elde edilememiştir. Ek olarak, FPOX'un uygun özgülüğü, biyoelektrotun Fru-ValHis seviyesine iyi yanıt vermesini sağlamış, bu da HbA1c biyobelirtecini spesifik tespiti için umut verici bir uygulama ortaya koymuştur [58].

1.5.4.4.2.1.2 Potansiyometrik biyosensörler

Potansiyometrik biyosensörler, iyon seçici elektrotlara (ISE) ve iyon duyarlı etkili transistörlere (ISFET) dayanır. Elektrot, enzim reaksiyonundan kaynaklanan izlenen

iyonun varlığını takip etmek için kullanılmaktadır. Elektrot içinden sıfıra eşit veya sıfıra yakın akım akmaktadır. ISFET'ler ve ışık potansiyometrik sensör (LAPS) tabanlı sistemler biyosensör yapımı için uygundur. ISFET prensibi, bir solüsyondan yüzey iyonları tarafından üretilen yerel bir potansiyele dayanmaktadır. Bu potansiyel, yarı iletken bir silikon boyunca akım akışını modüle etmektedir. ISFET'teki transistör geçit yüzeyi, pH tespiti için seçici bir zarla kaplıdır, LAPS prensibi, bir ışık yayan diyot (LED) ile yarı iletken aktivasyonuna dayanmaktadır. Sensör, tipik olarak 30 nm silikon oksit, 100 nm silikon nitrid ve indiyum-kalay oksit ile kaplanmış n-tipi bir silikondan yapılmıştır. LAPS, LED ile etkinleştirilen bölgedeki orta pH değerinin bir fonksiyonu olarak voltaj değişimini ölçmektedir. Bu, çok konumlu algılama ve bir dizi biyo-tanım bölgesi oluşturmanın yolunu açar [57].



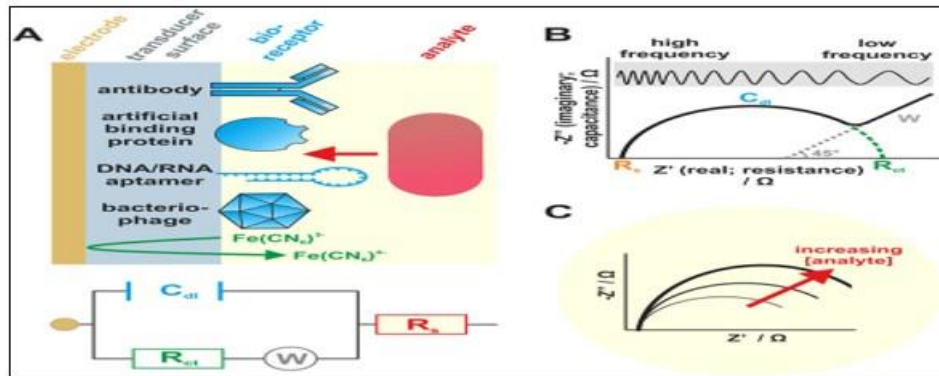
Şekil 1.10. Biyo-tanım bileşeni membrana bağlı ve tamponlu reaksiyon hücresi ile ışık potansiyometrik sensörünün diyagramı [57].

Bir çalışmada, seyreltilmemiş tam kan şekerinin direkt tespiti için potansiyometrik bir biyosensör geliştirilmiştir. İyonomeri değiştirerek, hassasiyeti korurken doğrusal aralığı kaydırarak analitik yanıt ayarlanabilir. Biyosensör bileşiminin optimizasyonu, özellikle doğrusal aralık ve hassasiyetin karakterizasyonuna odaklanılarak gerçekleştirilmiş. Tek bir damla tam kandaki kan şekeri seviyelerinin doğru ölçümü sunulmuştur [59]. Diğer bir çalışmada, tek iplikçikli bakteri DNA'sının (ssDNA) etiketsiz tespiti için ışık ile adreslenebilir bir potansiyometrik sensör (LAPS) kullanılmıştır. *Escherichia coli* (*E. coli*) O157:H7 DNA'sının tespiti için işlevsel, hassas bir yüzey, LAPS yüzeyi üzerinde spesifik prob tek iplikçikli DNA'nın (ssDNA) kovalent immobilizasyonu ile hazırlanmıştır. Sonuçlar, hedef *E. coli* ssDNA'yı tespit etmek için sinyal

değişikliklerinin kaydedilebileceğini göstermektedir ve hedef analit 10^2 CFU mL⁻¹ algılama limiti ile tespit edilmiştir [60].

1.5.4.4.2.1.3 İmpedimetrik Biyosensörler

"Empedans", elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), farklı biyolojik sistemleri karakterize etmek için kullanılmıştır. İmpedimetrik biyosensörler, çalışan bir elektrot yüzeyi boyunca kapasitansta ve elektron transfer direncinde bir değişikliğe neden olan analit-biyoreseptör etkileşimi ile çalışmaktadır (Şekil 1.11). Analit bağlanması, daha yüksek analit konsantrasyonu ile artar, bunun sonucunda, elektrot yüzeyindeki empedans değişir ve bir dönüştürücü ile tespit edilir. Empedansın, analite bağlı olarak arttığı veya azaldığı görülebilir. Biyoreseptör olarak, genellikle antikorlar, kullanılsa da proteinlerden bakterilere ve virüslere kadar farklı moleküller de kullanılmaktadır. Değişken tekrarlanabilirlik, yüksek algılama sınırları ve spesifik olmayan bağlanma ile ilgili sorunlar, impedimetrik biyosensörlerin ana dezavantajıdır. Zamana göre geniş bir frekans aralığında kaydedilir. İki ana bileşen, direnç (R) ve kapasitans (C) ölçülür. Empedans verileri genellikle Nyquist grafikleri olarak temsil edilir. Tipik bir Nyquist grafiği yarım daire şeklinde olmakta ve bazen düşük frekans ucunda 45 derecelik bir yükselme gözlemlenmektedir (Şekil 1.11B). Yüksek frekansta, empedansın ana bileşeni çözüm direncinden [R_s] kaynaklanır. Daha düşük frekansta ise empedans yük transfer direncinden [R_{ct}] ortaya çıkar. Nyquist grafiği, Randles tarafından önerilen eşdeğer devre modeline çevrilebilir (Şekil 1.11A). Ya katman katman sensör yapısı ya da analit bağlanması üzerine sensör yüzeyinde artan birikimden kaynaklanan empedanstaki değişiklikler kantitatif olarak çizilebilir (Şekil 1.11C) [25].



Şekil 1.11. İmpedimetrik biyosensörlerin yapısı ve elektrokimyasal işlevi [25].

Mikroorganizmaların miktarının ve aktivitesinin hızlı tespiti için birçok impedans biyosensörü türü tasarlanmıştır. Yang ve arkadaşları, (*E. coli*) tespiti için yüksek hassasiyete sahip bir impedimetrik lektin bazlı biyosensör geliştirmiştir. Biyosensörün, yüzey modifikasyonunda, MUA ve ditiyotritolün (DTT) birlikte kullanılmıştır. EIS biyosensörü gram negatif *E. coli*'yi gram pozitif bakterilerden ayırt etmede yüksek seçicilik göstermiştir. Bu biyosensörle, bakteri 10^2 ila 10^5 CFU/mL arasında geniş bir konsantrasyon aralığında ve bir algılama sınırında (75 CFU/mL) algılama sınırında tespit yapılmıştır [61]. Başka bir çalışmada, Chowdhury ve arkadaşları, *E.coli* O157: H7'nin impedimetrik biyosensörler ile tespit edilemesi için yeni ve basit bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, iletken bir polianilin (PANI) film yüzeyine kovalent olarak bağlanmış antikora ve antikor-antijen bağlanmasına dayanmaktadır. Elektrokimyasal empedans spektroskopisi (EIS), farklı bakteri konsantrasyonları ile inkübasyon öncesi ve sonrası elektrotların impedans değerlerindeki değişimi ölçerek sensör elektrodunun hassasiyetini ve etkinliğini test etmek için kullanılmıştır. Bu yöntemi kullanarak, Au / PANI / Glu / antikor sensöründe 10^7 CFU mL⁻¹ algılama limiti ile *E. coli* O157: H7 tespit edilmiştir [62].

1.5.4.4.2.1.4 Voltametrik Biyosensörler

Voltametri, bir potansiyeli değiştirerek ve ardından ortaya çıkan akımı ölçerek bir analitin tespit edildiği elektro-analitik yöntemdir. Çoğunlukla araştırma grupları tarafından biyoalgılama analizinde kullanılan voltametrik dönüştürücülerin en yaygın çeşididir [63]. Voltammetrik biyosensörler, akımı ölçer ve mevcut yanıt genellikle analit konsantrasyonuyla orantılı bir tepe veya platodur. Ayrıca akım (I), gerilim (E), zaman (T) ve yük (Q) gibi çeşitli parametreleri de analiz edebilir. Birçok voltametrik yöntem türü vardır, ancak en yaygın olarak doğrusal süpürme voltametri (LSV), döngüsel voltametri (CV), diferansiyel puls voltametri (DPV), kare dalga voltametri (SWV) kullanılmaktadır.

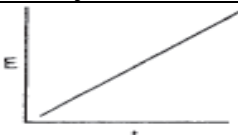
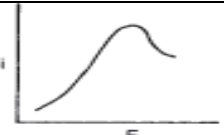
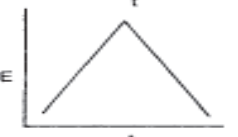
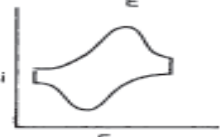
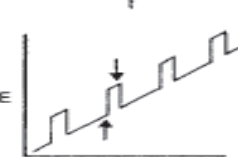
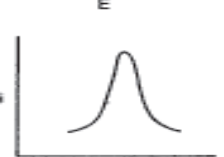
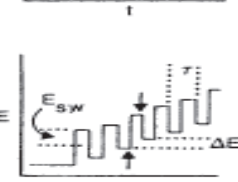
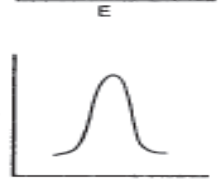
1. Doğrusal Tarama Voltametrisi (LSV): LSV'de elektrot potansiyeli, tarama boyunca sabit bir oranda değiştirilerek ortaya çıkan akım ölçülmektedir.
2. Döngüsel Voltametri (CV): CV'de, uygulanan potansiyel, akım izlenirken hem ileri hem de geri yönde çalışan bir elektrotla değiştirilir. Analize bağlı olarak, bir kısmı

döngü, bir tam döngü veya bir dizi döngü gerçekleştirilebilir. CV, redoks proseslerinin incelenmesi ve reaksiyon ürünlerinin stabilite değerlendirmesi için yaygın olarak kullanılmaktadır.

3. Diferansiyel plus Voltametrisi (DPV): Bu teknikte potansiyel, sabit ve küçük genlikli (10–100 mV) bir dizi darbe ile taranarak yavaş değişen temel potansiyele uygulanmaktadır. Akım, her darbe için iki noktada belirlenir; ilk nokta darbe uygulamasından önce kaydedilir ikincisi ise darbenin sonunda alınır. Bu örnekleme noktaları, faradik olmayan (şarjlı) akımın azalmasına izin vermek için seçilmektedir. Bu noktalardaki akım ölçümleri arasındaki fark, her darbe için belirlenir ve temel potansiyelin bir fonksiyonu olarak çizilir.

4. Kare Dalga Voltametrisi (SWV): SWV'de, uyarma sinyali, dalga formunun ileri darbesinin merdiven basamağıyla çakıştığı, adım yüksekliği ΔE olan bir merdiven dalga formu üzerine bindirilmiş E_{sw} genlikli simetrik bir kare dalga darbesinden oluşur. Net akım redoks potansiyeli üzerinde ortalanan ve ileri geri akımlar arasındaki fark ölçülerek belirlenir [64].

Tablo 1.4 Voltametrik teknikler [65].

Teknik	Uygulanan potansiyel	Ölçülen sinyal	Yorumlar
Doğrusal Tarama Voltametrisi (LSV)			Esas olarak teşhis amaçlı kullanılmaktadır.
Döngüsel Voltametri (CV)			İleri taramanın sonunda potansiyelin tersine çevrilmesi, bu yöntemi avantajlı kılmaktadır..
Diferansiyel plus Voltametrisi (DPV)			Görüntülenen sinyal, uygulanan darbenin hemen önündeki ve sonundaki akım arasındaki farktır.
Kare Dalga Voltametrisi (SWV)			Görüntülenen sinyal, ileri ve geri darbelerde ölçülen akımlar arasındaki farktır.

2019 yılında yapılan güncel bir çalışmada, tükürük örneklerinde glikoz tespiti için bir voltametrik biyosensör tasarlanmıştır. Rassas ve arkadaşları, enzimatik bir elektrokimyasal sensör geliştirmişlerdir. Bu sensör, glikoz algılama için altın bir elektrot (Au) üzerinde biriktirilmiş glukoz oksidaz (GOD) kapsülleyen altın nanopartiküller (AuNP'ler) ile katkılanmış bir polielektrolit kompleksinden (PEC) oluşmaktadır. Akımın değişimi (μA) (Glikoz konsantrasyonunun logunun bir fonksiyonu olarak), PEC / GOD ile modifiye edilmiş elektrot (93.7) ile karşılaştırıldığında modifiye edilmiş elektrotun üç kat daha yüksek hassasiyete sahip olduğu görülmüştür [66]. Huang ve arkadaşları, E.coli O157: H7'nin direkt tespiti için etiketsiz altın nanoparçacıkları modifiye serigrafı karbon elektrotlar geliştirmiştir. Escherichia coli'nin kantitatif tespiti için döngüsel voltametri kullanmıştır. Bu elektrokimyasal immünosensör, 10^3 - 10^9 CFU/mL ve 5.9×10^2 CFU/mL LOD tespit aralığına sahiptir [67].

1.5.4.4.2.2 Fiziksel Biyosensörler

1.5.4.4.2.2.1 Piezoelektrik Biyosensör

Piezoelektrik veya piezoelektrik etki, bir maddenin mekanik olarak gerildiğinde voltaj üretme yeteneğini ifade eden fiziksel bir fenomendir. Bir piezoelektrik platform veya piezoelektrik kristal, piezoelektrik kristal yüzeyine bağlı bir kütle nedeniyle salınım değişikliği prensibi üzerinde çalışan bir sensör parçasıdır [68]. Gerilim değiştiğinde, bir piezoelektrik malzemenin yüzeyine verilen gerilim, mekanik strese veya salınıma neden olmaktadır. Anizotropik kristaller, piezoelektrik uygulayan tipik malzemelerdir. Tipik piezoelektrik malzemeler olarak isimlendirilmektedir. Örneğin: Alüminyum fosfat (berlinit), alüminyum nitrür, çinko oksit, kristalize topaz (Al_2SiO_4 (F, OH) 2), baryum ve kurşun titanat, galyum ortofosfat, kuvars (SiO_2) [69]. Genel olarak, iki ana tür piezoelektrik cihaz vardır: kuartz kristal mikrobals (QCM) ve yüzey akustik dalga (SAW) cihazı. Piezoelektrik biyosensörler üzerine yapılan yoğun araştırmalar, bu sistemlerin biyokimyasal reaksiyonları yüksek hassasiyetli, tek adımda, düşük maliyetli olarak tespit etme potansiyelini göstermektedir. QCM, piezoelektrik bir kristaldır ve 15 MHz'nin altındaki frekanslarda çalışmaktadır [69]. Kuvars, çeşitli özelliğinden dolayı analitik uygulamalarda en yaygın olarak kullanılan kristal tipidir [70].

Analitik bir kimya bakış açısı düşünüldüğünde, piezoelektriklik, fiziksel sensörler ve biyosensör yapımı için çok uygundur. Bu sistemin prensibi, basitleştirici bir açıklama takip edilerek anlatılacak olursa; biyosensör yüzeyde iki elektrot tarafından verilen alternatif voltajla uyarılmaktadır. Alternatif voltaj, kristalin mekanik salınımlarına neden olur ve salınımların frekansı, kristal salınım devresine sokulurken ölçülmektedir [71]. Kristal yüzeyine bağlanan analit veya diğer herhangi bir kütle, salınım frekansının değişmesine neden olmaktadır [72]. Frekanstaki değişiklik, Sauerbreay denklemi ile açıklandığı gibi kristale bağlı kütle ile orantılıdır [72]. Ancak orta viskozitedeki değişiklik, Kanazawa ve arkadaşları tarafından tanımlanan salınımları da etkileyebilmektedir [73]. Piezoelektrik platform, biyosensör platformları arasında en ideal olanlardan biri olarak gösterilmiştir. Herhangi bir spesifik reaktif uygulamaya gerek kalmadan, afinite reaksiyonlarını kolayca kaydedilebilmektedir [69].

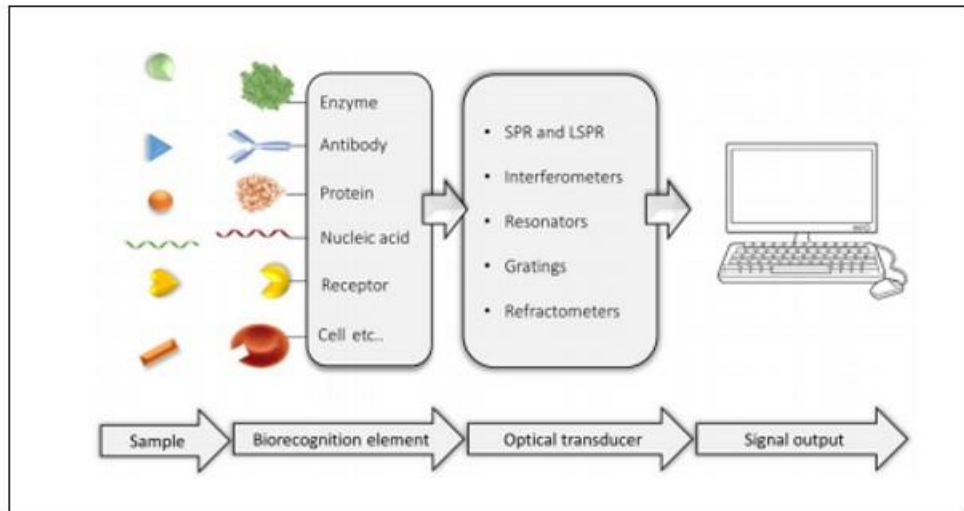
1.5.4.4.2.2 Termal Biyosensör

Termometrik biyosensörler, girdi verilerinin biyo-tanıma elemanı ile analit arasındaki enzimatik reaksiyonu takiben ortamın sıcaklık değişimi olduğu bir biyosensör türüdür. Analit enzimle temas ettiğinde, enzimin ısı reaksiyonu ölçmekte ve analit konsantrasyonuna göre kalibre edilmektedir. Sıcaklıktaki değişim hassas termistörler kullanılarak ölçülmektedir. Termometrik biyosensörün biyosensörün yaygın uygulamaları, pestisitlerin ve patojenik bakterilerin tespitini içermektedir [74]. Zheng ve arkadaşları, pestisit tespiti için enzim reaksiyonuna bazlı yeni bir termal biyosensör geliştirmiştir. Bu biyosensör, bir akış enjeksiyon analiz sistemidir. Enzim reaksiyon kolonu ve özdeş referans kolonuna sahip iki kanaldan oluşmaktadır. Enzim reaksiyonu, enzim reaksiyon kolonunda sabit bir sıcaklıkta (40 C°) gerçekleşmektedir. Bu biyosensörün pestisitleri tespit etme yeteneği, iki tip termosensör modunda hidrolitik ısının azalmış derecesi ile gösterilmektedir. Gerçek numunenin tespiti, bu biyosensörün organofosfat pestisit kalıntısının tespiti için kullanılabileceğini göstermektedir [75]. Başka bir çalışmada Yao ve arkadaşları, su numunelerinin kimyasal oksijen ihtiyacının (COD) belirlenmesi için akış enjeksiyon analiz sistemine sahip bir termal biyosensör geliştirmiştir. Glikoz çözeltileri, farklı konsantrasyonlarda ve gerçek su örnekleriyle test edilmiştir. Daha sonra numuneler periyodik asit içeren bir kolondan geçerken oluşan ısı ölçülerek COD değerleri belirlenmiştir.

Biyosensör, geniş bir doğrusal aralık (5 ila 3000 mg/L) ve düşük bir saptama sınırı (1.84 mg/L) sergilemiştir. Sensör, gerçek numunelerin COD değerlerini tespit etmek için başarıyla kullanılmıştır [76].

1.5.4.2.3 Optik Biyosensörler

Optik biyosensör, kompakt bir analitik cihazdır. Optik dönüştürücü sistemle entegre bir biyo-tanım algılama elemanı içermektedir (Şekil 1.12). Bir optik biyosensörün temel amacı, ölçülen bir maddenin (analit) konsantrasyonu ile orantılı bir sinyal üretmektir. Optik biyosensör, biyo-tanım elemanları olarak enzimler, antikorlar, antijenler, reseptörler, nükleik asitler, tam hücreler ve dokular dahil olmak üzere çeşitli biyolojik malzemeleri kullanabilmektedir [77].



Şekil 1.12. Optik biyosensörler

Bir çalışmada, gıda kaynaklı bakterilerin tespiti için nanomateryal tabanlı optik biyosensörler kullanılmıştır [78]. Farklı moleküler tanıma elemanlarına ve optik biyosensörlere çeşitli nanomalzemelerin dahil edilmesine odaklanmayı sağlamıştır. Diğer çalışmalarda, tek hücre tespiti, hücre hattı ve antikanser ilaç tespiti, protein ve antijen-antikor tespiti için Grafen bazlı optik biyosensörler kullanılmıştır. Çalışmaların sonuçları, yeni grafen bazlı optik sensörlerin yüzeydeki yapısal değişiklikleri ve biyomoleküler etkileşimleri tespit edebildiğini göstermiştir [79].

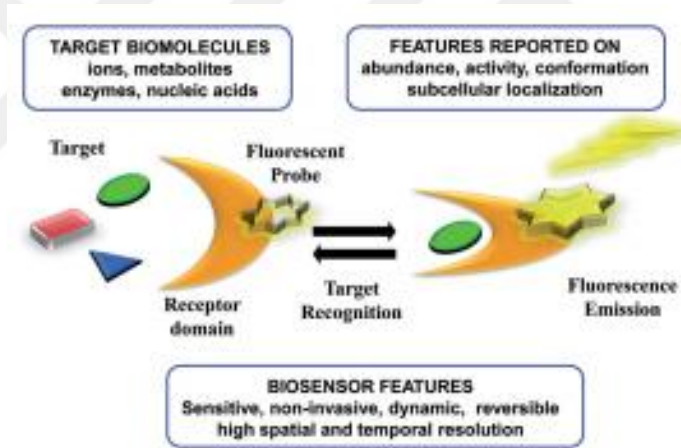
1.5.4.4.2.3.1 Reflektometrik girişim spektroskopisi biyosensörleri

Reflektometrik girişim spektroskopisi (RIfS), etiketsiz ve zaman çözümlemeli bir yöntemdir. Basit optik kurulum, ince katmanlardaki beyaz ışık girişimine dayanmaktadır. Polarize ışığın fazındaki ve genliğindeki değişiklikler, adsorbe edilmiş protein tabakasının kalınlığı ve kırılma indisi hakkında bilgi sağlamaktadır [77]. RIfS prensibi, girişim katmanının fiziksel kalınlığının (d) ve kırılma indisinin (n) çarpılmasıyla tanımlanan optik kalınlıktaki değişiklik nedeniyle spektral yansıma kayması ölçümlerine dayanmaktadır. Beyaz ışığın bir kısmının her bir sınırdaki yansıtıldığı ve reflektometrik girişim fenomenine neden olmaktadır. Optik kalınlık, girişim katmanının ve fiziksel kalınlığı ile yansıtma indeksi çarpılarak elde edilir. Bu nedenle, RIfS yanıtı ile girişim katmanı kalınlık değişimini tahmin etmek mümkündür [80]. Birleştirilmiş Reflektometrik Girişim Spektroskopisi ve Kuvars Kristal Mikrobalsan (QCM) SiO_2 , TiO_2 ve Au yüzeylerinde farklı faz geçiş sıcaklıklarına sahip lipid vesiküllerin diferansiyel adsorpsiyonunu tespit etmektedir. 2017'de Kojima ve arkadaşları, biyomoleküllerin adsorpsiyonunu eşzamanlı olarak analiz etmek için birleşik bir reflektometrik girişim spektroskopisi (RIfS) ve QCM geliştirmiştir. RIfS, adsorbe edilen kütleyi yansımasına göre tespit eder ve transfer matrisi yöntemini kullanarak yansıma spektrumlarını modelleyerek adsorbe edilen durumu tahmin etmektedir. Bunun karşısında, QCM adsorbe edilmiş moleküllerin fizikokimyasal özelliklerini adsorbe edilmiş kütle ile birlikte tespit etmektedir. Birleşik RIfS-QCM, farklı yüzey özelliklerine sahip proteinlerin ve farklı faz geçiş sıcaklıklarına sahip lipid veziküllerin adsorpsiyonunu başarıyla tespit etmişlerdir. Çalışma sonuçları, RIfS-QCM'nin çeşitli yüzeylerde moleküler adsorpsiyonu nicel olarak analiz etmek için yararlı bir araç olarak hizmet ettiğini göstermektedir [81].

1.5.4.4.2.3.2 Floresan Biyosensörleri

Floresan biyosensörler, bir reseptör parçası taşıyan biyolojik tespit bileşenleridir. Bu biyosensörler, bir veya birkaç floresan proba genetik, enzimatik veya kimyasal olarak bağlı olan bir hedefin veya biyolojik aktivitesinin tanınmasından sorumludur. Ek olarak, tanıma olayını tespit edilebilir ve ölçülebilir bir optik sinyale dönüştürür (Şekil 1.13). Floresansın yüksek hassasiyeti, canlı hücrelerde yüksek uzaysal ve zamansal çözünürlük ile dinamik ve geri dönüşümlü varyasyonların tespitine izin vermektedir.

Böylelikle karmaşık sinyal yollarında enzimlerin hassas aktivasyonunu ve inaktivasyonunu deşifre etmek için araçlar sağlanmaktadır [82]. İki tür floresan biyosensör geliştirilmiştir: genetik olmayan ve genetik olarak kodlanmış protein. Genetik olarak kodlanmış biyosensörlerin transfekte edilmesi kolaydır, ancak ektopik ifadeleriyle bağlı sınırlamalarla karşı karşıya kalmaktadır. Genetik olmayan biyosensörler, genetik olarak kodlanmış karıştırlarının ektopik ifadesi için gereken süreyi atlamaya izin vermektedir. Bu biyosensörler, flüoresan rezonans enerjisini birbirleri arasında transfer edebilen sentetik boyaların konjugasyonu yoluyla tasarlanmıştır (FRETbiyosensörler). *In vitro* olarak kolaylıkla uygulanabilir, ancak canlı hücrelerde ve *in vivo* uygulama için mikroenjeksiyon veya kolaylaştırılmış teslimat gerektirmektedir. Floresan biyosensörler, biyomedikal uygulamalarda biyobelirteçlerin tespiti için yaygın olarak kullanılmaktadır [83].

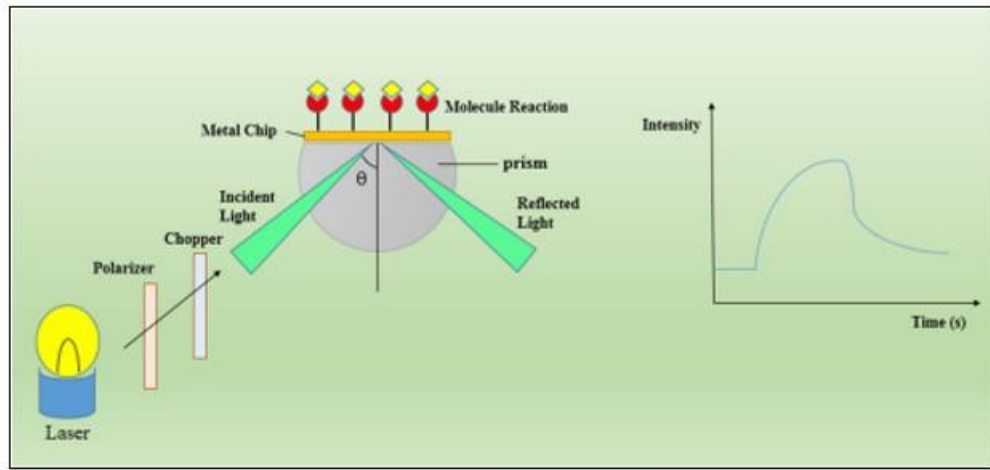


Şekil 1.13. Floresan biyosensörün şematik gösterimi [83].

1.5.4.4.2.3 Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörleri (SPR)

Yüzey plazmon rezonansı fiziksel bir optik fenomendir. Yüzey plazmon rezonans biyosensörü, hedef analit sensördeki biyo tanıma elemanı ile reaksiyona girdiğinde değişiklikleri tespit etmek için yüzey plazmon dalgalarını (elektromanyetik dalga) kullanmaktadır. Prensip olarak, SPR biyosensör herhangi bir değişikliğe maruz kaldığında, reaksiyonu ölçmek için kullanılan kırılma indisinde değişikliklere neden olacaktır. SPR dönüştürücü, biyomolekül / biyo-tanım elemanı ile birleştirilmiştir. Daha sonra, hedef analizi, sensör yüzeyindeki inaktive edilmiş biyomolekül ile

reaksiyona girer, böylece sensör yüzeyinde kırılma indisinde bir değişiklik meydana gelir. Bu, değişiklikler yüzey plazmon dalgasının yayılma sabitinde bir varyasyon oluşturur ve bu varyasyon, sonuç üretmek için ölçülmektedir. Numunenin absorpsiyon spektrumunu ölçmek için bir spektrofotometre kullanılmaktadır. Prensibinin görsel açıklaması Şekil 1.14'te gösterilmektedir [84].



Şekil 1.14. SPR biyosensörlerin şematik gösterimi [54].

Son on yılda, SPR'nin biyomedikal uygulamalarda kullanımında, DNA hibridizasyonunun ölçümü, enzim-substrat reaksiyonları, poliklonal antikor karakterizasyonu ve etiketsiz immünolojik testlerde büyük bir gelişme görülmüştür [85]. Hemorajik kolitin erken teşhisi ve uygun tedavisi için, Tawil ve arkadaşları, *E. coli* O157: H7 ve metisiline dirençli *Staphylococcus aureus*'un saptanması için bir tür SPR biyosensör geliştirmiştir. *E. coli*'yi tespit etmek için T4 bakteriyofajları kullanırken, MRSA'yı tespit etmek için spesifik bir bakteriyofaj kullanılmıştır. Sistem, 20 dakikadan daha kısa bir sürede 10^3 koloni oluşturan birim / mL konsantrasyonları için patojenlerin spesifik ve hızlı tespitine izin vermektedir [86]. 2015 yılında yapılan bir çalışmada, Yılmaz ve arkadaşları, optik ve kütleye duyarlı cihazlarda tüm hücrenin mikro temas baskısı kullanarak sudaki *Escherichia coli* (*E.coli*) bakterisini tespit etmek için tespit limiti 10^6 CFU/mL ile yeni bir yöntem geliştirmişlerdir. Ancak SPR biyosensörün büyük fiziksel boyutu hala çözülmesi gereken bir sorundur [87].

1.5.4.4.2.3.4 Fiber optik biyosensörler

Fiber optik biyosensörler, fiber optik bir cihazın transdüksiyon elemanı olarak görev yaptığı analitik cihazlardır. Fiber optik biyosensörler, ışığın silika cam fiber veya plastik optik fiber boyunca analiz alanına iletilmesine dayanmaktadır. Optik fiber biyosensörler, farklı spektroskopik tekniklerle kullanılabilir; örneğin, absorpsiyon, floresans, fosforesans, yüzey plazmon rezonansı (SPR) vb. Fiber optik kullanımına dayalı optik biyosensörler iki farklı bölüme ayrılabilir: iç sensörler; analit ile etkileşimin optik fiberin bir elemanı içinde gerçekleşmekte ve harici sensörler: optik fiberle ışığı birleştirmek için kullanılmaktadır [88]. 2018'de Kaushik ve arkadaşları, bakteri tespiti için tek mod konik ve çoklu mod (SMS) yapısına dayanan etiketsiz bir fiber optik biyosensör geliştirmiştir. Temel amaç, fosfat tamponlu salin (PBS) içinde *Salmonella*'nın hassas tespitidir. Biyosensör, *Staphylococcus aureus* varlığında yüksek seçicilik göstermiştir [89]. Başka bir çalışmada, Huang ve arkadaşları, kolesterol ve glikozun sıralı tespit etmek için bir fiber optik biyosensör geliştirmiştir. Çalışma sonuçları, biyosensörün büyük tekrarlanabilirliğe, yüksek seçiciliğe sahip olduğunu ve numuneler üzerinde tatmin edici tespit sonuçları verdiğini göstermiştir [90].

1.5.4.4.2.4 Kantilever Biyosensörler

Kantilever biyosensörler ultra yüksek hassasiyetli elektromekanik sensörlerdir. Çok sayıda biyolojik varlığın etiketsiz tespiti için başarıyla kullanılmıştır [91]. Kantilever biyosensörün rezonans frekansındaki değişim dinamik modda ölçülürken, kuantil biyosensör yüzeyleri arasında meydana gelen bükülme statik modda ölçülmektedir. Kantilever biyosensörlerin yüzey gerilimi modunda çalıştırılması, hedef moleküllerin bir konsolun yalnızca bir tarafına bağlanmasına dayanır, aksi takdirde karşı yüzeyden gelen ek gerilim iptal olur ve konsol bükülmez. Bir yüzey, hedef moleküller için reseptörler sağlamalı, diğeri ise numune moleküllerinin herhangi bir spesifik veya spesifik olmayan adsorpsiyonunu önlemelidir. Fritz 2008 yılında yaptığı bir araştırmada bu sensörlerin, pH ve ısı değişikliklerini algılayabildiğini ve DNA hibridizasyonu dahil olmak üzere antikör- antijen etkileşimlerini ayrıca bakteri absorpsiyonunu bile tespit edebildiğini açıklamıştır [92]. Mertens ve arkadaşları, bir konsol yüzeyine yapışan bakterilerin nanomekanik hareketini kullanarak *Escherichia coli* ve bakteriyofaj T7 arasındaki etkileşimi tespit etmek için yeni bir yöntem geliştirmiştir. Sistem, geniş bir

frekans aralığında mekanik enerjinin dalgalanması yoluyla birkaç bin parçacık arasındaki etkileşimi tespit edebilmiştir. Ayrıca, 10^9 CFU mL⁻¹'e kadar geniş bir virüs konsantrasyonu aralığında E. coli ile T7 etkileşimini izlemek için kullanılmıştır [93].

1.6 Farklı bakteri tespit yöntemlerinin karşılaştırılması:

Tablo 1.5 Birkaç bakteri saptama yönteminin karşılaştırması [54].

Bakteriyel tespit yöntemi	LOD	Avantajlar	Dezavantajlar	Kaynaklar
ELISA	10^4 CFU/mL	Hızlı, gerçek zamanlı, kolay	Düşük hassasiyet, çapraz reaktivite, etiketli, yanlış pozitif, yanlış negatif	[31]
PCR	<100 CFU/mL	Hızlı, hassas, özgün	Karmaşık ön işlem adımları, canlı ve cansız hücreler arasında ayırım yapmada başarısızlık, Pahalı	[42]
EIS	10^7 CFU/mL	Hızlı, hassas, etiketsiz, düşük maliyetli	Düşük stabilite, tekrarlanabilirlik, karmaşık klinik örnekler için düşük başa çıkma yeteneği	[62]
Optik SPR	10^3 CFU/mL	Hassas, özgün	Gelişmiş aletler, karmaşık ön işlem aşamaları	[86]

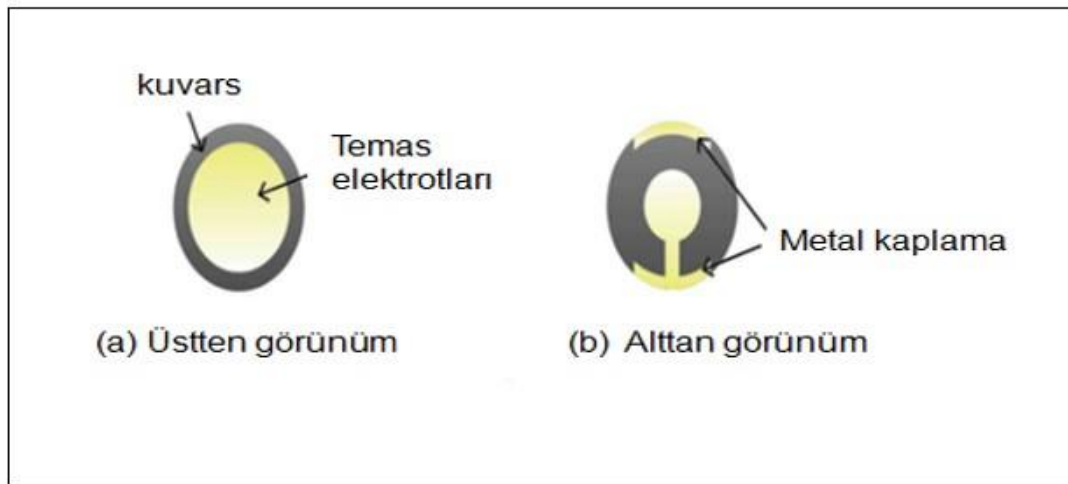
Şimdiye kadar, Escherichia coli suşunun tespit etmek için bazı farklı protokoller mevcuttur. Örneğin bakteri kültürü ve koloni sayımı yöntemleri. Ancak sonuç vermesi fazla zaman almaktadır. Bu nedenle hızlı bakteri taranması için uygun değildir. Diğer kullanılan yöntemlerden olan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile hızlı bir şekilde E.coli tespiti sağlanmaktadır. Bu yöntemler daha duyarlı ve özgündür. Fakat PCR cihazları hem çok pahalı hem de fazla manipülasyon gerektirir [24]. Genellikle, bakterinin tespiti ELISA ile yapılmaktadır. Bu teknik, PCR'e nazaran gerçekleştirmesi daha ucuz ve daha kolaydır. ELISA özgün olmasına rağmen E.coli bakterisini tespit edilmesi için uzman personel gerekmektedir [13]. Bu engellerin üstesinden gelebilmek için biyosensörlere tabanlı yöntemler ön plana çıkmaktadır. Elektrokimyasal biyosensörler genellikle ucuz ve yerinde tespit edilebilmesine rağmen duyarlı Elektrokimyasal biyosensörler (ör.(EIS)) nispeten pahalıdır ve kolayca taşınabilir.

değillerdir [62]. Bu nedenle, doğru bir yorum elde etmek için daha duyarlı ve hızlı tepki süresine sahip bir algılama sistemine ihtiyaç duymaktadır.

Tablo 1. 5'te kullanılan yöntem tipine ve elde edilen LOD'ye göre E.coli bakterinin saptanması için bazı yöntemler özetlenmiştir.

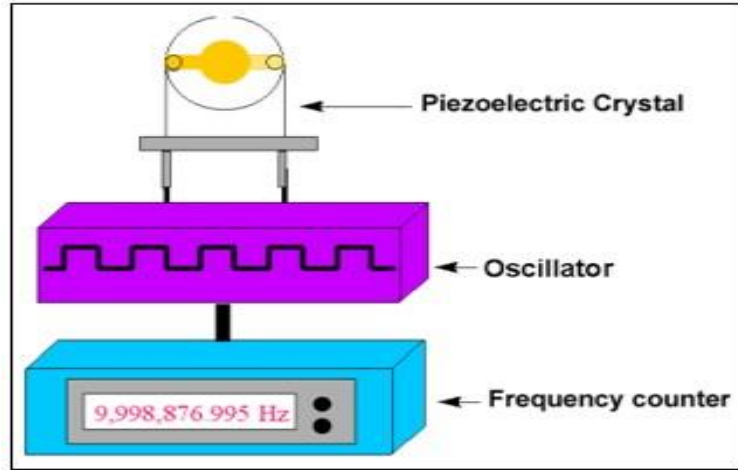
1.7 Kuvars kristal Mikrodenge (QCM):

QCM, Piezoelektrik dönüştürücülerin her iki tarafına tutturulmuş altın elektrotlarla ince bir kuvars plakasından üretilen piezoelektrik cihazlardır. Elektrotlar, kristal yüzeyde biriken / adsorbe edilen kütle ile rezonans frekansı değişimleri arasındaki ilişkinin keşfedilmesinden bu yana kimyasal sensör olarak kullanılmaktadır. Kuvars, düşük maliyeti ve termal, kimyasal ve mekanik strese karşı dayanıklılığı nedeniyle en yaygın kullanılan piezoelektrik malzemedir. Şekil 1.15'te önden ve arkadan alınan algılama için kullanılan piezoelektrik Kuartz kristallerin görüntülerini göstermektedir [94].



Şekil 1.15. Bir piezoelektrik kuvars kristalinin şeması [94].

QCM sistemi 3 kısımdan oluşur: Kuartz kristali, Osilatör, Frekansmetre. Şekil 1.16'de gösterildiği gibi [95].



Şekil 1.16. QCM sistemi temel elemanları [95].

Kuvars kristali mikro terazi (QCM) tekniği, kütleye duyarlı bir dedektör olarak kullanılmaktadır. Bu dedektör, harici bir alternatif elektrik alanının uygulanmasıyla temel bir frekansta rezonansa giren salınımlı bir piezoelektrik kuvars kristalinin rezonans frekansındaki kaymanın takibine dayanmaktadır. Kuvars kristali mikro terazisi (QCM), bir kuvars kristali rezonatörünün frekansındaki değişikliği ölçerek birim alandaki kütle değişimini ölçmektedir. Çalışma sırasında bu prensipten yararlanılarak immobilizasyon sırasında moleküllerin ne miktarda tutunduğu belirlenmektedir [96]. Bu ilişki Sauerbrey'in denklemiyle ifade edilir:

$$\Delta f = -\frac{2\Delta m f_0^2}{A\sqrt{\rho_q \mu_q}} = -2.3 \times 10^6 f_0^2 \frac{\Delta m}{A} \quad 1.1.$$

Burada,

ρ_q = kuvars yoğunluğudur

μ_q = kristal kesme modülüdür

f_0 = piezoelektrik kuvars kristalinin kristal temel frekansdır,

A = kristal piezoelektrik olarak aktif geometrik alandır

Δf = frekansın değişmesidir (Hz)

Δm = kütle değişimidir

Bununla birlikte, bu Sauerbrey denklemi yalnızca sert kaplamalı malzeme için geçerli fakat sıvı parametrelerinin ölçümü için geçersizdir. Frekans tepkileri ayrıca kuvarsın

kalınlığı, yoğunluğu ve sabit olan kayma modülü ve bitişik ortamın fiziksel parametreleri (sıvının yoğunluğu veya viskozitesi) gibi birçok faktörden etkilenmektedir [98]. Bu nedenle, QCM'nin frekans kayması ile numune sıvısının yoğunluğu ve viskozitesi arasındaki bağıl ilişkiyi ortaya çıkaran Kanazawa modeli geliştirilmiştir [114].

Aşağıdaki (1.2.) denkleminde bu ilişki gösterilebilir:

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

Burada da,

f_0 = QCM'nin çalıştırma frekansıdır

ρ = numune sıvısının yoğunluğudur

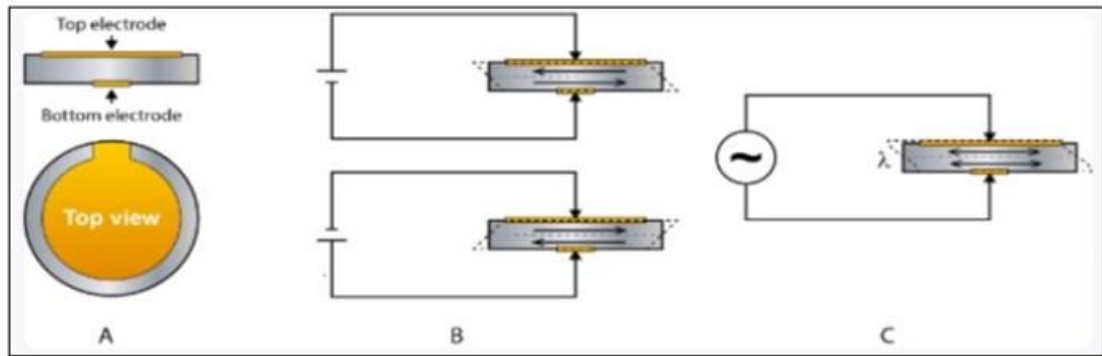
η = numune sıvısının viskozitesidir

ρ_q = kuvarsın yoğunluğu

η_q = kuvarsın kayma modülüdür

1.7.1 Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM) Prensibi

QCM'nin çalışma prensibi şekil 1.17 'de gösterildiği gibi açıklanabilmektedir. QCM'nin çalışması, kristalin malzemelerde meydana gelen piezoelektrik etkiye dayanmaktadır. Bu etki, metal elektrotlarla kaplı ince bir kuvars katmanlı yüzey üzerine bir voltaj uygulandığında mekanik olarak deforme olmasına neden olmaktadır. QCM çalışmalarında en yaygın kullanılan elektrotlar altın elektrotlarıdır. Çünkü altın hava içerisinde okside olmaz. Bununla birlikte, Cu, Ni, Pt ve diğer metaller de kullanılmaktadır). Kristal boyunca uygulanan bir AC voltajı, rezonans frekansında büyük bir hassasiyete sahip salınımına neden olmaktadır. Salınan kristalin yüzeyine yapışan herhangi bir molekül, frekansının düşmesine neden olmaktadır. Bu frekans değişimi ölçülerek yüzeyde biriken kütle miktarı belirlenebilmektedir [99]



Şekil 1.17. A.) Bir QCM sensörünün şematik yandan ve önden görüşleri. QCM sensörü, iki metal elektrot arasına yerleştirilmiş bir kuvars kristal diskten yapılmıştır. B.) Yüzeye voltaj uygulanması deforme yapacaktır. Deformasyonun yönü, uygulanan voltajın işaretine ve kristal kesilmesine bağlıdır. C.) Kuvars kristaline alternatif bir voltaj uygulandığında, ileri geri salınmaktadır [99].

Piezoelektrik kuvars kristali sensörleri, basitliklerinden dolayı biyoanalitik analizler ve biyomoleküler etkileşimlerin karakterizasyonu için rekabetçi araçlar olarak büyük önem taşımaktadır. Bu biyosensörlerde, biyoreseptör, harici bir alternatif elektrik alanının uygulanmasıyla rezonansa giren kuvars kristali üzerinde hareketsiz hale getirilmektedir. Biri yüzeyde hareketsiz hale getirilmiş ve diğeri çözelti veya gaz fazında serbest olan iki etkileşimli molekül arasındaki biyospesifik reaksiyon takip edilebilmektedir. Numuneler, genellikle sensör yüzeyindeki hareketsizleştirilmiş liganda sabit bir akışla uygulanmaktadır. Böylece hücre içinden akışın herhangi bir bölümünde sabit bir analit konsantrasyonu sağlanır ve difüzyon etkileri ihmal edilebilmektedir. Ek olarak, optimize edilmiş bir hücre tasarımı, toplu taşıma etkilerinden kaçınmaya yardımcı olur. Bununla birlikte, viskozite etkileri, spesifik sinyale müdahale eden frekans kaymalarına neden olabilmektedir. Bu nedenle biyosensör, viskozite değişikliğinin bir sinyal oluşturduğu zamanı belirlemek için viskoz bir çözelti ile kalibre edilmelidir. Bir ölçümden sonra, bağlı analiti sensör yüzeyinden çıkarmak için sensörün yeniden oluşturulması gerekmektedir. Ligandın hareketsiz hale getirilmesi nedeniyle, bir derece özgürlük kaybedilir, bu nedenle QCM yöntemi gerçek yakınsama ölçümüne izin vermez. Dolayısıyla, ölçülen afiniteler, azalan mobilite ve sterik engelden etkilenebilmektedir. Diğer yandan, hareketsizleştirilmiş ligandın kısmi denatürasyonu, görünür bağlanma afinitesini azaltabilmektedir [94].

1.7.2 QCM'in Avantajları:

Kuvars kristali mikro terazisi (QCM), fiziksel, kimyasal ve biyolojik biyosensörler alanında çok yönlü bir cihazdır. QCM sensörlerinin önemli bir avantajı, etiketleme ajanlarına ihtiyaç duymadan sensör cihazları olarak kullanılabilmesidir [100]. Buna ek olarak, QCM sensörlerin tanıyıcı bölümünün ucuz ve küçük olması ve çok küçük miktarlarda örnek ile çalışmaya olanak sağlaması, çok sayıda farklı çip yüzeyi hazırlanarak sayısız tayin yapılabilmesi, yerinde ölçüm yapmaya olanak vermesi, yöntemlerin basitliği, tekrarlanabilirliği, tasarım kolaylığı, yüksek hassasiyet, düşük algılama sınırları, uygun maliyetli, hızlı sonuçlar, taşınabilirlik ve kullanım kolaylığı gibi birçok avantaja sahiptir [101].

1.7.3 QCM Uygulamaları:

Son yıllarda kuvars kristali mikro terazi (QCM) tabanlı biyosensör, konseptindeki basitliği, kullanım kolaylığı, düşük maliyeti, daha kısa analiz süresi ve etiketsiz ölçüm için uygunluğu nedeniyle patojenlerin ve bakterilerin hızlı tespiti için yeni bir teknoloji olmuştur [102]. QCM sensörleri biyolojik etkileşimleri izlemek için geniş bir kullanım olanağı sunmaktadır. Sensör uygulamaları arasında Kuartz Kristal Mikrodenge (QCM), biyomedikal ve biyokimyasal alanlarda öne çıkmaktadır. QCM'nin yüksek hassasiyeti, son derece küçük biyomoleküllerin temel etkileşimlerini inceleyen biyolojik uygulamalarda yoğun kullanımına da yol açmıştır. Uygulamalar, biyomolekülleri (proteinler, lipidleri, nanopartikülleri, polimerleri, polimer filmleri ve hücreler/bakterileri) içermektedir [103]. Kuvars kristal mikroterazi cihazları biyokimyasal aktivitelerde yaygın olarak kullanılmaktadır, çünkü sıvı ortamlarda, gaz fazında ve vakum altında kullanılabilir. Mikroterazi cihazları, DNA veya RNA moleküllerinin kısa fragmanlarını tanımak için kullanılan antikorları ve DNA biyosensörleri tanımlamada kullanılan immüno-biyosensörlerde de uygulanmaktadır [104]. Hedef bakteriyel hücrelerin antijenitesine bağlı olarak çeşitli immünosensörler geliştirilmiştir. Bu sensörler kuvars kristal mikroterazi (QCM) kullanmaktadır. QCM sensör ile *E. coli* suşunun tespit edilmesi basit, kullanımı kolay, düşük maliyetli, kısa süreli bir yöntem olacaktır [105]. Patojenik bakterileri tespit etmek için QCM sensör ile yapılan yöntemler mevcuttur. Örneğin Shen, Z., ve diğerleri yaptığı çalışmada, QCM immünosensörü kullanılarak *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7'nin saptanması için

yeni bir yöntem geliştirmiştir. Sonuç olarak, bu yöntemle yüksek özgüllük ve stabilite sağlanmıştır [106]. Başka bir çalışmada, Ngo vd. QCM immünosensörünü kullanarak *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7'nin tespit etmek için yeni bir yöntem geliştirmiştir. Anti-*E. coli* O157:H7 antikorları, kendiliğinden birleşen bir tek katman (SAM) üzerinde hareketsizleştirilmiştir. SAM, (EDC) ve (NHS) varlığında 16-merkaptopropanoik asit ile aktive edilmiştir. *E. coli* O157: H7'nin adsorpsiyonuna bağlı olarak değişen frekansın sonucu, QCM biyosensör sistemi tarafından ölçülmüştür. Çalışma sonuçları, antikorların *E. coli* O157: H7'nin saptanmasında özgüllüğünü gösterilmiştir. Ayrıca, bir piezoelektrik immünosensör yapmak için SAM yöntemi, protein A gibi ara bağlantı ajanı kullanılan ve boşluklu yüzeye sahip olan yöntemlerden daha iyidir [102]. Patojenik bakterileri tespit etmek için QCM sensörüyle kullanılabilen yöntemler vardır. Örneğin, Poitras, C. ve ark., *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7'nin tespiti için, dağılma izlemeli (QCM-D) bir kuvars kristali mikrobalsı kullanarak bir biyosensör geliştirmiştir. *Escherichia coli* (*E. coli*) O157: H7'nin tespiti için bir biyosensör, dağılma izlemeli (QCM-D) bir kuvars kristali mikrobalsı kullanılarak geliştirilmiştir. Algılama platformu, poliklonal antikorların, sistemin kendinden oluşumlu bir tek tabaka aracılığıyla altın kaplı QCM-D kuvars kristalleri üzerine immobilizasyonuna dayanmaktadır. Çok çeşitli bakteri hücre konsantrasyonları üzerinde yapılan QCM-D ölçümleri, optimal biyosensör yanıtının, geçen zamanın bir fonksiyonu olarak dağılım kaymasının ilk eğimi olduğunu göstermektedir (Dslope). *E. coli* O157: H7'nin geniş bir hücre konsantrasyon aralığında tespiti için ilk Dslope'deki yüksek log tepkisi elde edilmiştir. Ayrıca tatmin edici seçicilik ve yüksek hassasiyet göstermiştir [107].

2. BÖLÜM

YÖNTEM VE MATERYAL

2.1. Deney Kimyasalları ve Malzemeleri

2.1.1. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

- 1) Quartz Kristal Mikrobalans (QCM) sensörü – Biolin Scientific– QSX 301.
Yaklaşık 100 µl/dk debiye sahip kapalı döngü bir sistemdir. Sensörün salınım frekansı 5 MHz'dir. QCM sensörleri, her iki yüzeyinde simetrik dairesel ve metalik (Au) elektrotlara sahip AT kesimli piezoelektrik kuvars kristallerinden oluşmaktadır.
- 2) QCM sensörü temel olarak 3 bileşenden oluşmaktadır: tespit hücresi, hücre platformu ve flow (akış) modülüdür.



Şekil 2.1. QCM cihazı

- 3) Peristaltik Pompa – BT100-2J –Longer Pump. (Pompa, 0.0002 mL/dk ile 380 mL/dk arası akış hızları sağlamaktadır).

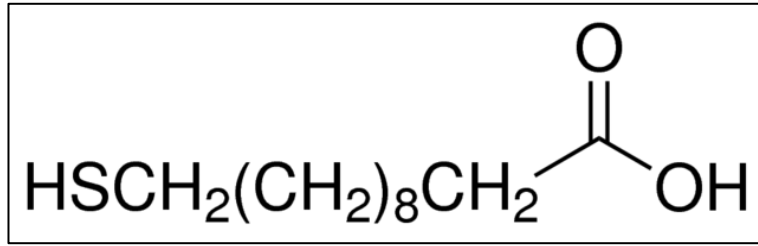


Şekil 2.2. Peristaltik Pompa

- 4) Empedans Analizörü - AIM-4300. (Frekans aralığı 5 KHz - 300 MHz).
- 5) Hassas Terazî - RADWAG AS 220.R2. (AS 220.R2'nin terazisi, standart bir analitik tartıdır ve yüksek ölçüm doğruluğu ile öne çıkar).
- 6) Vorteks Karıştırıcı - SA8- BioCote.
- 7) Veri analizi için bilgisayar.
- 8) pH / Sıcaklık Metre – MW 102 – Milwaukee.

2.1.2 Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

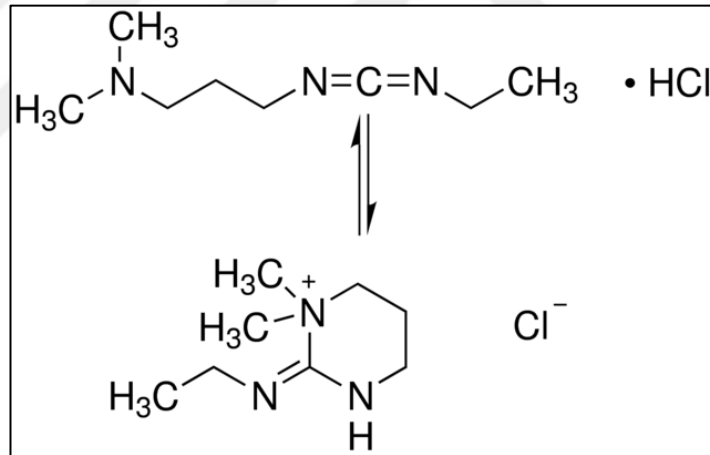
1. *Escherichia coli* ATCC 25922 suşu – (Erciyes Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvar'ından 0.5 McFarland olarak temin edilmiştir)
2. Saf Su (Erciyes Üniversitesi Çevre Mühendisliği Laboratuvarından temin edilmiştir)
3. Etil Alkol (Erciyes Üniversitesi Biyolojik ve Medikal Diagnostik Sensörler Laboratuvarı'dan temin edilmiştir)
4. Hidrojen Peroksit (MERCK=K48030900-633).
5. 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) – (SIGMA-ALDRICH= 450561-5G)



Şekil 2.3. MUA'nın kimyasal yapısı[108].

Kapalı Yapısı = $\text{HS}(\text{CH}_2)_{10}\text{CO}_2\text{H}$

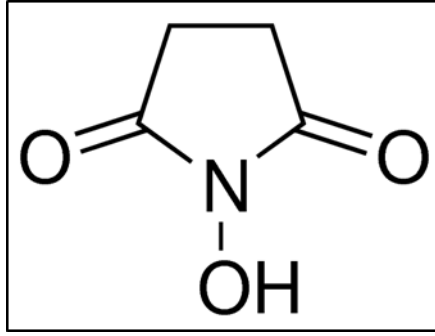
6. Anti-*E.coli* antibody (ab25823- Cambridge, UK), Abcam firmasından temin edilmiştir.
7. N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)– (SIGMA-ALDRICH= 03450-5G).



Şekil 2.4. EDC'nin kimyasal yapısı[109].

Kapalı Yapısı = $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$

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



Şekil 2.5. NHS'nin kimyasal yapısı[110].

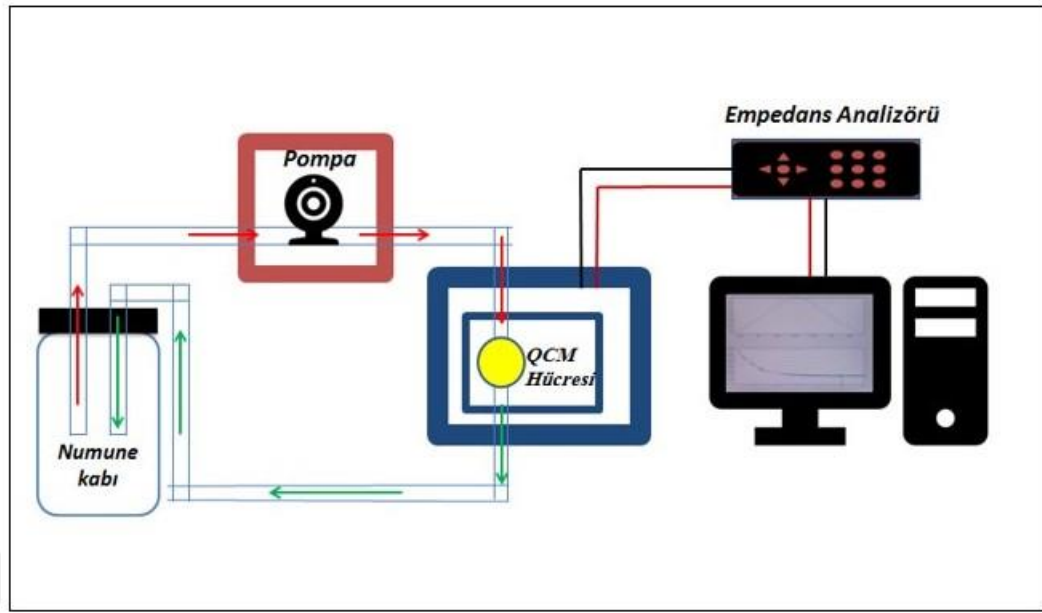
Kapalı Yapısı = $C_4H_5NO_3$

9. Fosfat Tamponlu Serum (Phosphate Buffered Saline) (PBS) (SIGMA-ALDRICH = P4417-100TAB).
10. Sığır Serum Albümini (Bovine Serum Albumin (BSA)) (SIGMA-ALDRICH = A2153-10G).

2.2 DENEY DÜZENEĞİ

2.2.1. QCM Tespit Sistemi

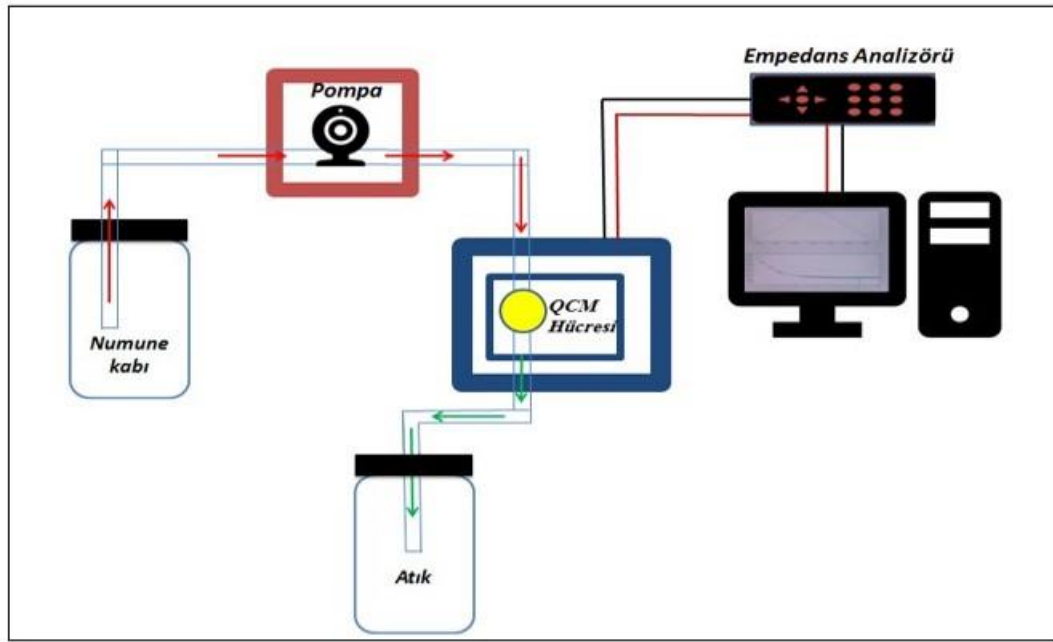
QCM, bir kuvars kristali rezonatörünün frekansındaki değişikliği ölçerek birim alandaki kütle değişimini ölçmekte olup yaklaşık 100 μ L/dk akış hızına sahip bir kapalı döngü sistemi ile çalıştırılmıştır. Kullanılan sensör, 5 MHz AT kesimli kuvars kristalidir. QCM, etiketleme gereksinimleri olmadan biyomoleküller etkileşimlerin gerçek zamanlı izlenmesine izin vermektedir. Her bir deney, oda sıcaklığında 30-60 dk arasında gerçekleştirilmiş ve en az 3'er kez tekrarlanarak yapılmıştır. Tespit sistemi; numune kabı, peristaltik pompa, QCM sensör, direnç analizörü ve veri analizi için bilgisayardan oluşturulmaktadır. Şekil 2.6'da tespit sistemi gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Kapalı Döngü QCM Tespit Sistemi

2.2.2. QCM Sensör Çipleri ve Algılama Hücresi Temizleme İşlemi

QCM sensörü kullanmadan önce; QCM altın çipleri, piranha çözeltisi (1,5 mL H_2SO_4 , 0,5 mL H_2O_2) kullanılarak 2 dakika süre ile temizlenmiştir. (Dikkat: Piranha ile yüzey temizliği işlemi tehlikelidir ve laboratuvar güvenlik kurallarına uyarak dikkatli kullanılmalıdır). Ardından sensör çipleri sırasıyla etil alkol (ethanol) ve deiyonize (DI) su ile temizlenmiştir. Son olarak, sensör çipleri kurutularak deney için hazır hale getirilmiştir. QCM sistemine ait her bir parça (conta, O-ring parçaları, flow (akış) modülü) sırasıyla etil alkol ve deiyonize su kullanılarak temizlenmiştir. Deney sırasında kullanılan hortum yapılarının deney öncesi ve sonrasında temiz kalması için sırasıyla etil alkol ve deiyonize su ile 10 dakika süre ile açık döngü yapılarak temizlenmiştir. Şekil 2.7’de sistem için kullanılan açık döngüde temizlik işleminin şeması gösterilmektedir.

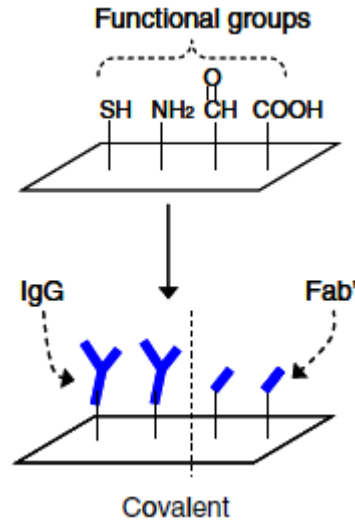


Şekil 2.7. Açık döngü QCM tespit sistemi

2.2.3. *E. coli* Tespit Deney Aşamaları:

- QCM Biyosensör yüzey Modifikasyonu.
- BSA Bloklama.
- *Escherichia coli* ATCC 25922 Tespiti.

Bu çalışmada, gerçek tükürük içerisinde *Escherichia coli* (*E. coli*) bakterisinin tespiti Quartz Crystal Microbalance (QCM) sensörü kullanılarak yapılmıştır. Ab25823 antikoru, spesifik olarak *E. coli* bakterisine bağlanabilmesi sebebiyle bir biyo-tanım ajanı olarak kullanılmıştır. Bundan sonra yapılan işlemler, QCM sensör yüzeyinin modifikasyonu içermektedir. Antikor immobilizasyonunda aktif bir yüzey oluşturmak için çeşitli modifikasyon yöntemleri vardır. Örneğin, kendiliğinden monte edilmiş tek katman (SAM, altın bir yüzey üzerinde), organosilanlar (silika yüzey üzerinde) ve dendrimerler. Fakat, kovalent immobilizasyon, antikor immobilizasyonu için en çok tercih edilen yöntemdir. (Şekil 2.8) Çünkü bu yöntem, tanıma moleküllerinin eklendikten sonra biyolojik aktivitesinin daha uzun tutulmasına izin vermektedir [111]. Yüzey modifikasyonundan sonra QCM sensör yüzeyi tespitiye hazır hale gelmektedir.

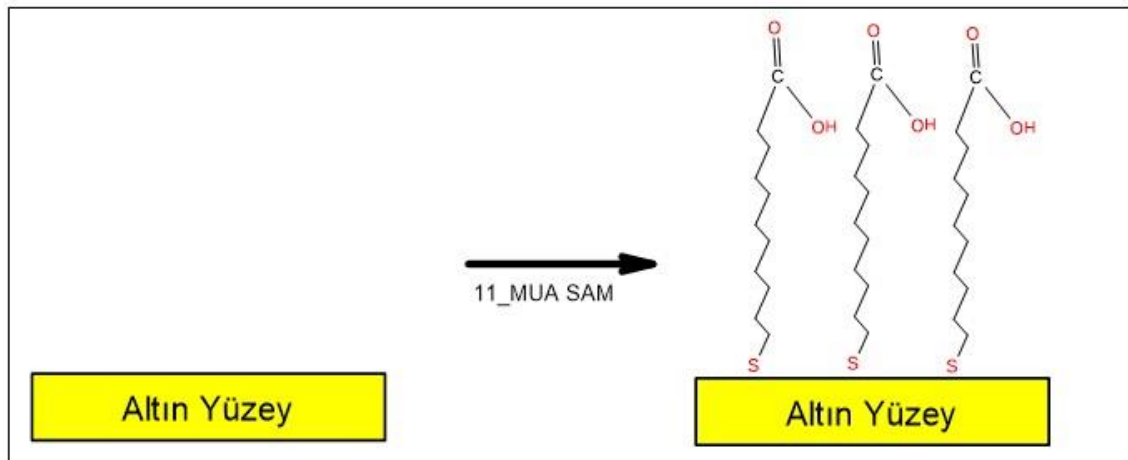


Şekil 2.8. Kovalent immobilizasyon yönteminin şematik gösterimi [111].

2.2.3.1 QCM Biyosensör Yüzey Modifikasyonu

2.2.3.1.1 QCM Sensörünün MUA ile Kaplanması

QCM sensör yüzeyinin işlevselleştirilmesi, 11-MUA (11-Mercaptoundecanoic acid) ile gerçekleştirilmiştir. MUA, kendiliğinden birleşen tek katman (SAM) adı verilen kimyasal olarak kararlı ve iyi sıralı tek katmanlar oluşturmaktadır. MUA, bir ucunda sülfidril grubu, diğer ucunda bir amino reaktif grup oluşturarak altınla kovalent bir bağ kurmaktadır.



Şekil 2. 9. QCM Sensörünün Yüzeyinin MUA ile Kaplanması

2.2.3.1.1.1 MUA Solüsyonunun Hazırlanması

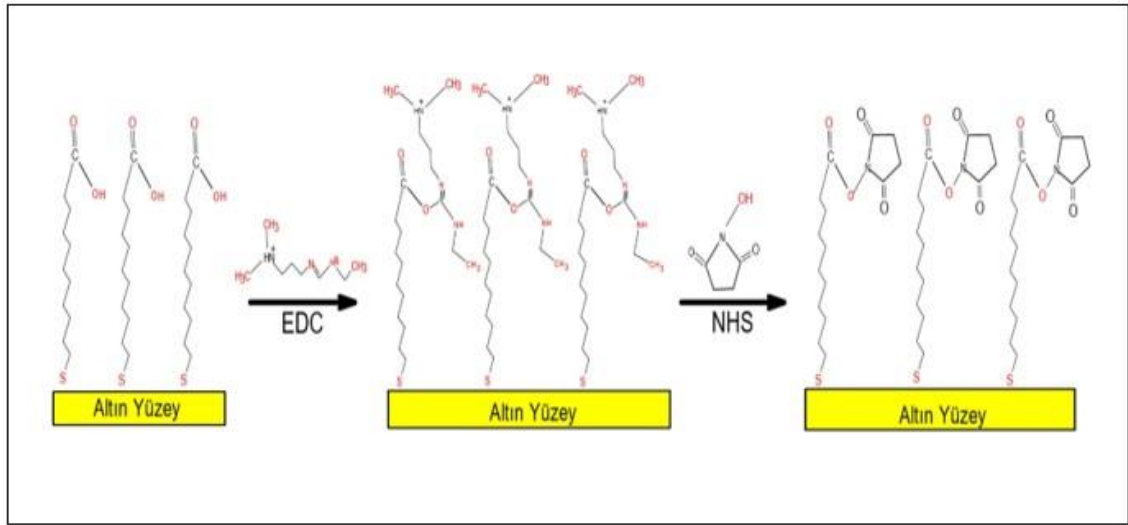
MUA çözeltisinin hazırlanmak için, ilk olarak 11-Merkaptoundekanoik asit Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. Daha sonra, QCM sensörünün MUA ile yüzey modifikasyonu sağlamak için 0.7 mg/mL MUA (pH = 4,5) 1 mL etil alkol içerisinde çözündürülerek, yüzey solüsyona maruz bırakılmıştır.

2.2.3.1.1.2 MUA Kaplama İşleminin Uygulanması

Kuvars kaplaması, kontaminasyonu önlemek için steril bir başlık altında gerçekleştirilmiştir. Sensörü kullanmadan önce, oda sıcaklığında gece boyunca 300 µL 11-Mercaptoundecanoic acid'den (MUA) oluşan bir etanol solüsyonunda inkübe edilmiştir.

2.2.3.1.2 EDC/ NHS Crosslinking (Çapraz bağlanma)

Çapraz bağlama, iki veya daha fazla molekülü kovalent bir bağ ile kimyasal olarak birleştirme işlemidir. EDC, biyokimyasal konjugasyonlar için en popüler sıfır uzunluklu çapraz bağlayıcıdır. Çünkü iki protein molekülü arasında, bir protein ile bir peptit arasında, proteinler ile oligonükleotitler arasında ve küçük moleküller ile verimli bir şekilde konjugatlar oluşturabilmektedir. Direkt EDC aracılı çapraz bağlama, EDC, hedef moleküller arasındaki nihai amid bağının bir parçası haline gelmeden yapılabilmektedir. EDC, karboksil gruplarını aktive eder ve bir amid bağı oluşturmak için kendiliğinden birincil aminler ile reaksiyona giren bir amin reaktif olan O-acylisourea ara maddesi oluşturmaktadır. O-acylisourea ara ürünü, sulu çözeltelerde kararsızdır ve su ile kolayca hidrolize edilmektedir. Bir amin ile reaksiyona girmeme, ara ürünün hidrolizine, orijinal karboksilat molekülüne geri dönmesine ve N-ikameli bir ürenin salınmasına neden olacaktır. Bu sınırlamanın üstesinden gelmek için, N-hidroksisülfosüksinimid N-hydroxysulfosuccinimide (Sulfo-NHS) veya NHS (N-hydroxysulfosuccinimide), kararlı bir amid bağı oluşturmak üzere birincil aminlerle yavaş reaksiyona giren daha kararlı bir Sulfo-NHS ester ara maddesi oluşturmak üzere reaksiyona eklenebilmektedir [113].



Şekil 2.10. EDC/NHS'in MUA ile etkileşimi

2.2.3.1.2.1 EDC / NHS Solüsyonunun Hazırlanması

EDC/NHS Sigma-Aldrich'den temin edilmiştir. EDC / NHS çapraz bağlama için, 5 mg/mL EDC (pH = 6,5) 1 mL saf su içerisinde çözülmüştür; NHS solüsyonu için, aynı önceki aşamalar uygulanmıştır. 5 mg/mL NHS (pH = 6,5) 1 mL saf su içerisinde çözülmüştür. Son olarak, her bir solüsyon 30 saniye boyunca vorteks edilmiştir.

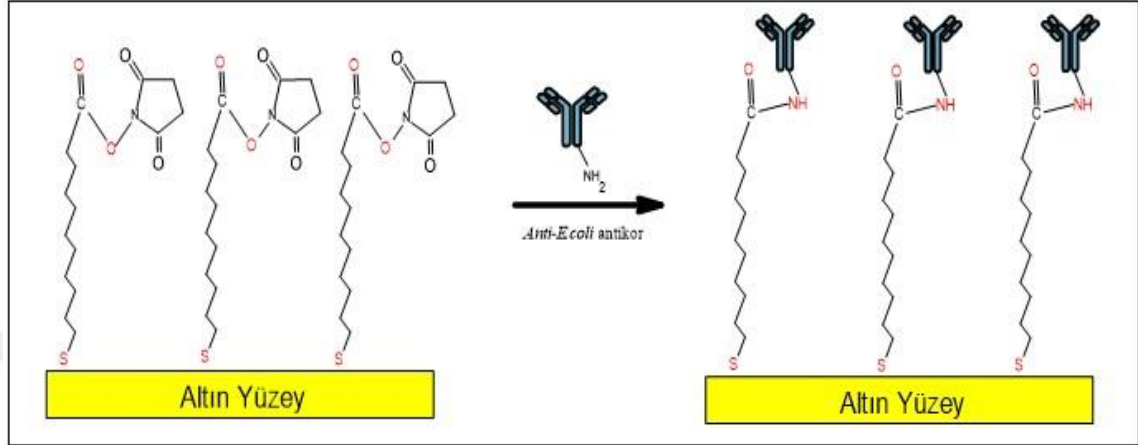
2.2.3.1.2.2 EDC / NHS Çapraz bağlanma İşleminin Uygulanması

MUA Kaplama işleminin yapıldıktan sonra, pompa hızı 60rpm'e ayarlanmıştır. Daha sonra, yüzeylere fiziksel olarak emilen fazla kimyasalları kaldırmak için, QCM sensörünün yüzeyi 10 dakika boyunca açık döngüde etil alkol ile yıkanmıştır. 10 dk geçtikten sonra, kapalı döngü ile 30 dk sürede QCM sensörü yüzeyine EDC verilmiştir. Ardından QCM sensörü yüzeyi, 10 dakika boyunca açık döngüde DIW ile yıkanmıştır. Son olarak, 30 dk sürede QCM sensörünün yüzeyine kapalı döngü ile NHS verilmiştir.

2.2.3.1.3 Antikor İmmobilizasyonu:

Antikor, patojenik bakteri tespiti için sıklıkla kullanılan bir biyo-tanım ağıdır. Ab25823 antikor, spesifik olarak *E. coli* bakterisine bağlanabildiği için biyo-tanım ajanı olarak kullanılmıştır. Buna ek olarak, antikorlar hedef türler için yüksek seçicilik ve bağlanma etkinliği sergiler ve çok çeşitli enfeksiyöz ajanlar için üretilebilmektedir.

Antikor immobilizasyonu için kovalent bağlanma yöntemi uygulanmıştır; çünkü eklendikten sonra tanıma moleküllerinin biyolojik aktivitesinin daha iyi tutulmasına izin vermiştir [114].



Şekil 2. 11. Antikor immobilizasyonu

2.2.3.1.3.1 Antikor Çözeltisinin Hazırlanması

Bu çalışmada, Anti-*E.coli* Antikor ab25823 kullanılmıştır. Bu antikor, Abcam firmasından elde edilmiştir. Antikor çözeltisi, 1 mL fosfat tamponlu serum (PBS) içerisine önceden stok haline getirilmiş çözeltiden 100 µl çekilerek hazırlanmıştır. Daha sonra, 10^{14} ab/mL ilave edilip ve karıştırıcı ile 30 saniye boyunca vorteks edilmiştir. Bu şekilde, *E. coli* bakterisinin tespiti için 10^{13} ab/mL konsantrasyonunda antikor kullanılmıştır.

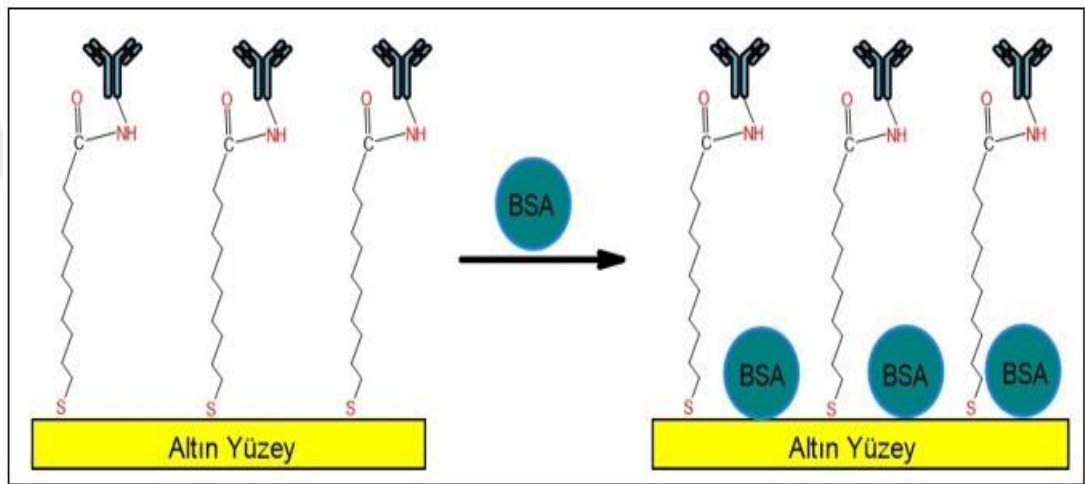
2.2.3.1.3.2 Antikor İmmobilizasyonu İşleminin Uygulanması

Anti-*E. coli* Antikoru uygulanmak için, kapalı döngü ile 60 dk süreyle QCM sensörü yüzeyine antikor solüsyonu verilmiştir. Daha sonra, QCM sensörü yüzeyi, spesifik olarak bağlanmamış herhangi bir molekülü kaldırmak için 10 dakika boyunca açık döngüde PBS çözeltisi (pH 7.4) ile yıkanmıştır.

2.2.3.2 BSA Bloklama

İnsan tükürüğü % 0.02 ila % 0.03 aralığında spesifik olmayan proteinler içeresinde olduğundan dolayı bloklama gerekmektedir.

Bovine serum albumin (BSA veya "Fraksiyon V" olarak da bilinir), ineklerden izole edilen bir serum albümin proteindir. BSA, birçok uygulamada evrensel engelleme reaktifi olarak kabul edilmektedir [115]. BSA, altın yüzeydeki doldurulmamış herhangi bir alanı kapatmak ve sonraki adımlarda olası hücrelerin spesifik olmayan etkileşimleri önlemek için kullanılmıştır. Ayrıca, BSA analizlerdeki sinyali artırması, birçok biyokimyasal reaksiyonda etkisinin olmaması ve düşük maliyeti nedeniyle kullanılmaktadır [116].



Şekil 2. 12. BSA bloklama

2.2.3.2.1 Bovine Serum Albümin (BSA) Çözeltisinin Hazırlanması

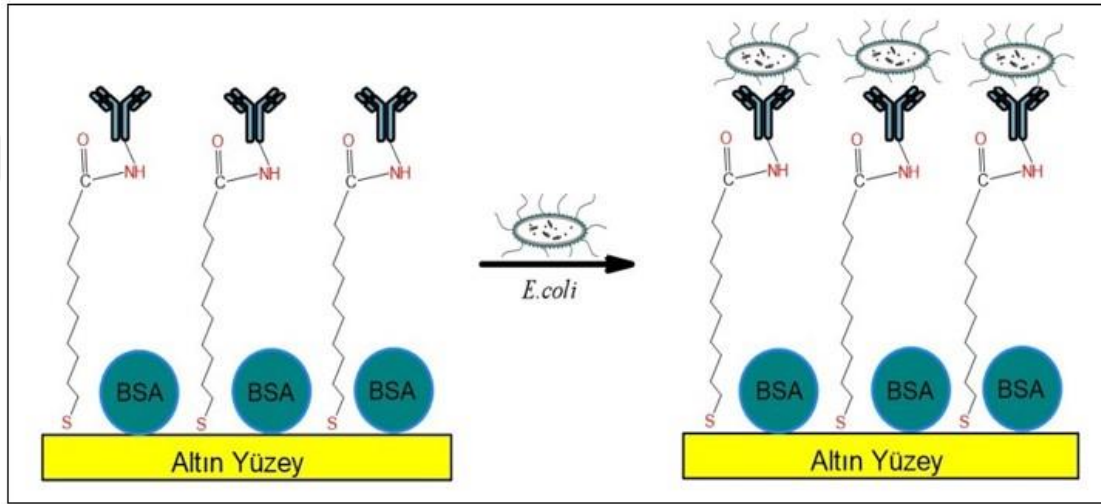
Bovine serum albümin Sigma'dan elde edilmiştir. QCM sensör yüzeyinde spesifik olmayan bağlanmayı bloklamak için % 5 BSA çözeltisi (10 mL PBS içinde 0,5 mg BSA) eklenmiştir. Daha sonra, homojenitesi sağlanan çözelti yaklaşık 30 sn süreyle vorteks edilmiştir.

2.2.3.2.2 BSA Bloklama Uygulanması

Antikor immobilizasyonu işleminin yapıldıktan sonra, BSA solüsyonu, 60 dk boyunca QCM sensörü yüzeyine 60 rpm'de kapalı döngü şeklinde uygulanmıştır. Böylece yüzey %5 oranında proteine doyurulmuştur. Daha sonra, QCM sensör yüzeyindeki herhangi bir fazla antikoru kaldırmak için, 10 dakika boyunca açık döngüde PBS çözeltisi (pH 7,4) ile yıkanmıştır.

2.2.3.3 QCM sensörü ile *E.coli* bakteri ATCC 25922 suşunu tespiti.

Bu çalışmada, tükürük içerisinde *Escherichia coli* bakteri ATCC 25922 suşunu hedef olarak kullanılmıştır. *Escherichia coli*, laboratuvar çalışmalarında moleküler çalışmalar için hızlı büyüme hızı ve basit laboratuvar büyüme gereksinimleri nedeniyle en yaygın kullanılan laboratuvar suşu haline gelmiştir. Ayrıca, *E.coli* ATCC 25922, patojenik olmayan bir bakteridir ve ticari olarak güvenlik suşları olarak mevcuttur [117].



Şekil 2. 13. QCM sensörü ile *E.coli* Bakteri gerçek tükürük içerisinde tespiti

2.2.3.3.1 *Escherichia coli* Bakteri Çözeltilisinin Hazırlanması

Escherichia coli ATCC 25922 suşu – (Erciyes Üniversitesi Hastanesi Laboratuvar Merkezi'nden 0,5 McFarland olarak temin edilmiştir). McFarland Standartları, test süspansiyonunun bulanıklığını McFarland Standardı ile karşılaştırarak bir sıvı süspansiyondaki yaklaşık bakteri sayısını standartlaştırmak için kullanılmaktadır. Mikrobiyoloji laboratuvarında en yaygın olarak kullanılan standart, 0,5 McFarland standardıdır. 0.5 McFarland bulanıklık standardı, 1.5×10^8 (CFU/mL) koloni oluşturan birimden oluşan bir bakteri süspansiyonunun yoğunluğuyla karşılaştırılabilir bir optik yoğunluk sağlamaktadır [118]. Deneyler için, tükürük içerisinde *E. coli* bakterisi üç farklı konsantrasyonda (10^7 CFU/mL, 10^5 CFU/mL ve 10^3 cfu/mL) kullanılmıştır. Bu konsantrasyonları elde etmek için; *Escherichia coli* bakterisi tükürük içerisinde (pH = 7,4) 1:10 oranında seyreltme faktörü ile seyreltilmiştir.

2.2.3.3.2 *Escherichia coli* Bakteri Çözeltisinin Uygulanması

Escherichia Coli ATCC 25922 suşunun tükürük içerisinde QCM sensör ile direkt tespit etmek için, deneylerde kullanılan 3 mL gerçek tükürük numunesine (pH = 7,4) üç farklı konsantrasyonda (10^7 , 10^5 ve 10^3 CFU/mL) *Escherichia coli* bakterisi eklenmiştir. 60 dk sürede QCM sensörü yüzeyine kapalı döngü ile 60 rpm’de, *E.coli* bakteri solüsyonu verilmiştir. Frekans kayması verilerinin ortalamalarını ve standart sapmalarını elde etmek için her deney en az 3’er kez tekrarlanmıştır.



3. BÖLÜM

BULGULAR VE SONUÇLAR

3.1 Araştırma Modeli

Kuvars Kristal Mikro Terazı (QCM) sistemi, kütle birikimi yoluyla düşük miktarlarda biyolojik veya kimyasal maddeleri tespit etmek için kullanılabilmektedir. Bu teknik, kuvars kristalinin frekans kayması (Δf) ile kütleindeki değişimler (Δm) arasındaki basit ilişkiye dayanmaktadır, bu ilişki Sauerbrey denklemi ile verilmektedir. Elde edilen sonuçlar, QCM kristallerindeki frekans kaymasının her işlem aşamasından sonra değiştiğini göstermiştir. Gözlemlenen frekans kaymasına göre, yüzey kristali üzerine yüklenen kütle Sauerbrey denkleminde (3.1) açıklandığı gibi hesaplanabilmektedir [119].

$$\Delta m = - C. \Delta f / n \quad 3.1.$$

Ayrıca, Molekül miktarları N , kütle Δm , moleküler ağırlık M_w ve Avogadro sabiti A (6.023×10^{23} mol⁻¹), denklem 3.2 ile açıklandığı gibi hesaplanabilmektedir.

$$N = \Delta m / M_w \times 6.023 \times 10^{23} \quad 3.2.$$

Burada,

Δm = kütle değişimi,

Δf = frekansın değişmesidir (Hz),

C = duyarlılık faktörü ($17.7 \text{ ng Hz}^{-1} \text{ cm}^{-2}$)

n = aşırı ton numarası ($n=1, 3, 5, 7$).

f_0 = kuvars kristalinin kristal temel frekansı,

N = moleküllerinin miktarı,

A = Avogadro sabiti ($6.023 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$).

M_w = molekül ağırlığı,

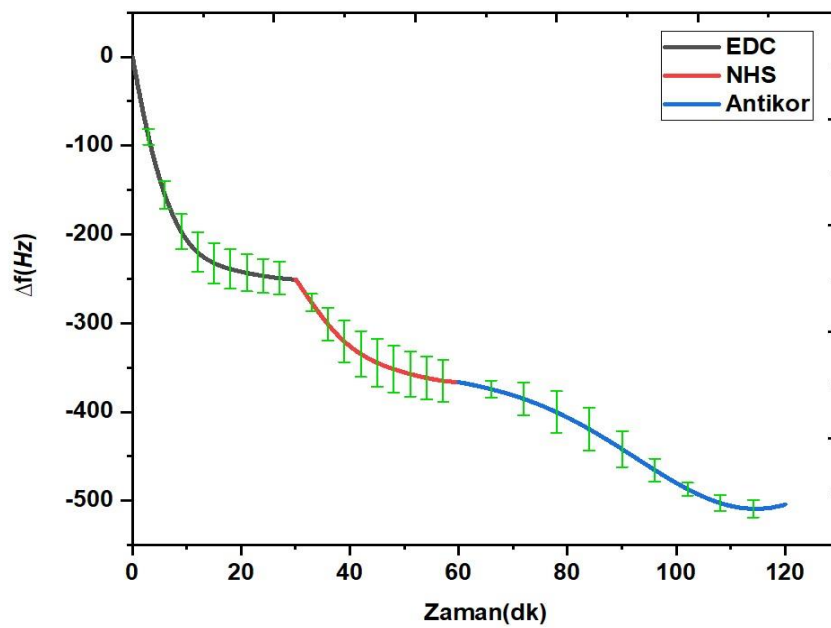
Aşağıdaki denklemle açıklandığı gibi, ifadeyi (3.1.) denklem (3.2.) 'e yerine konulurken, moleküllerin miktarları (N) direkt frekans kaymasından (Δf) hesaplanabilmektedir [120].

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

3.2 Deney Aşamalarının Frekans Analizi

3.2.1. Yüzey Modifikasyonunun QCM Biyosensör ile Takibi

Bu çalışmada, *Escherichia coli*'yi tespit etmek için antikorları bir Kuartz Kristal Mikrodengenin (QCM) altın elektrotları üzerinde immobilize edilmesi için kendinden birleştirilmiş tek tabakalı (SAM) yöntemi kullanılmıştır.



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

Bu işlem birkaç adım içerir:

3.2.1.1. 11-Mercaptoundecanoic acid (MUA) kullanılarak QCM sensörü yüzey modifikasyonu

QCM sensörü, oda sıcaklığında gece boyunca 0.7 mg/mL 11-merkaptoundekanoik asit (MUA) etanol çözeltisine batırılmıştır. Bu aşamada, QCM sensörü inkübasyon işlemi nedeniyle frekans kaymasını kaydetmeden gerçekleştirilmiştir. Bu şekilde, Au-SH etkileşimi yoluyla QCM kristallerinin altın yüzeyinde MUA'nın kendinden birleşik bir tek tabakası (SAM) oluşturulmuştur.

EDC, NHS ve antikor immobilizasyon aşamalarından elde edilen sonuçlara göre MUA molekülünü altın elektrot üzerine bağlandığı ve SAM tek tabaka oluşturulduğu anlaşılmaktadır.

3.2.1.2. QCM sensör yüzey aktivasyonu

Karboksilik grupların aktivasyonu, antikor bağlanması için 1- (3 (dimethylamino-propyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) ve hydroxysuccinimide (NHS) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu reaksiyonda karboksil grupları, ligandın amin grupları ile reaksiyona giren bir NHS-ester ara maddesi oluşturmaktadır. QCM yüzeyi, 30 dakika süreyle EDC / NHS solüsyonu ile aktive edilmiştir. Süre aktivasyon seviyesini etkileyen bir faktördür. Aktivasyon süresinin sınırlandırılması hem yan reaksiyon olasılığını azaltır hem de aşırı sayıda NHS-ester oluşumunu engeller, bu da spesifik olmayan bağlanmaya neden olabilmektedir [121]. Şekil 3.1'de gösterildiği gibi, EDC solüsyonu uygulandığında, QCM sisteminin rezonans frekansında ortalama (250 ± 17.5) Hz'lik bir kayma gözlemlenmiştir. Ayrıca, NHS solüsyonu uygulandıktan sonra, QCM sisteminin rezonans frekansında ortalama (115 ± 23) Hz'lik bir kayma gözlemlenmiştir. Frekans kaymasının değerlerine bakıldığında, moleküllerinin miktarları (N) EDC / NHS için hesaplanmıştır. Sensör yüzeyine tutturulmuş yaklaşık (13.9×10^{15}) EDC molekülü ve (10.5×10^{15}) NHS molekülü vardır.

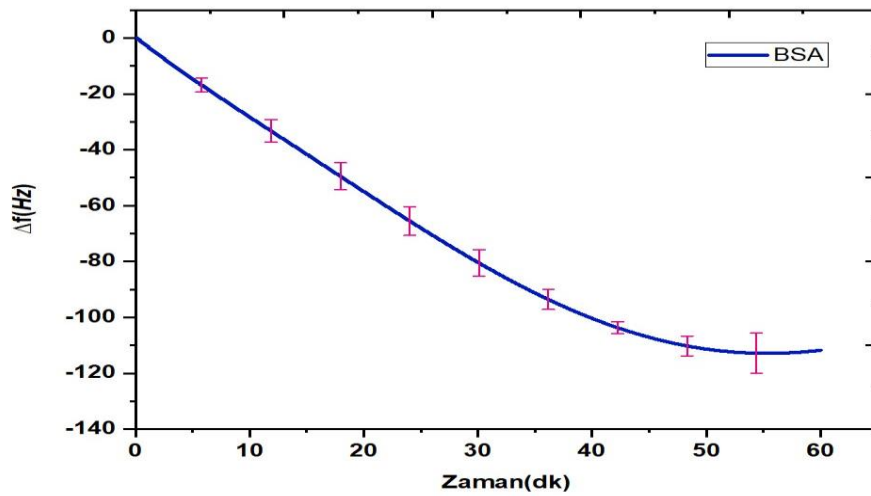
3.2.1.3. Antikor immobilizasyonu

QCM sensör modifikasyonunun son aşamasıdır. Altın elektrot yüzeyinde antikor *E. coli* immobilizasyonu, *E. coli* bakterilerini yakalamak için önemli bir çalışmadır. QCM

sensör yüzeyi 1 saat süreyle EDC / NHS kullanılarak aktive edildikten sonra kristal yüzey antikoru immobilize etmek için uygun hale gelmiştir. Şekil 3.1’de gösterildiği gibi, antikor, sensör yüzeyinde immobilize edildikten sonra, QCM sisteminin rezonans frekansında ortalama (137 ± 9.8) Hz’lik bir kayma gözlemlenmiştir. Molekül miktarı hesaplanırken (N), QCM sensörü yüzeyine (0.97×10^{13}) anti-*E.coli* antikorun immobilize edildiği bulunmuştur. Anti-*E.coli* antikorunun immobilizasyonu, frekans artışına neden olmuştur. Bu, QCM sensörünün yüzeyinde antikor immobilizasyonunun başarısını doğrulamıştır. Sonuç olarak, EDC, NHS ve antikor immobilizasyon aşamalarından elde edilen olumlu sonuçlar, MUA molekülünün Au-SH reaksiyonu yoluyla QCM kristallerinin altın yüzeyine bağlandığını ve kendi kendine birleşen bir tek tabakanın (SAM) oluştuğunu doğrulamaktadır.

3.2.1.4. BSA Bloklama

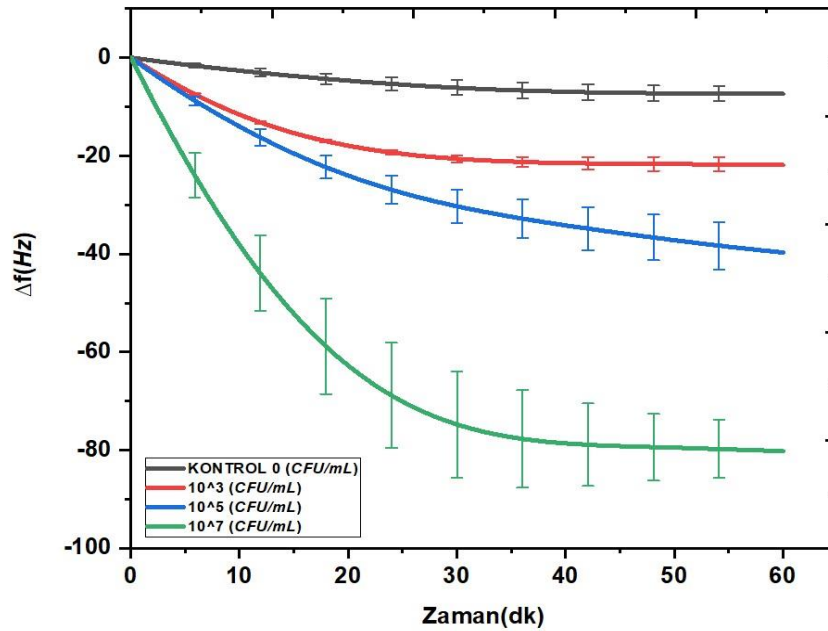
Bu aşamada, BSA bloklama işlemi yapıldı. BSA’nın kullanım amacı, altın yüzeydeki herhangi belirsiz bir alanı kapatmak ve sonraki adımlarda olası spesifik olmayan etkileşimleri önlemektir. BSA solüsyonu 60 dakika uygulandıktan sonra, sistem doyuma ulaşmıştır. Bloklama sonucunda, QCM sisteminin rezonans frekansında, (111 ± 8) Hz’lik bir azalma gerçekleşmiştir. Yani, %5’lik BSA solüsyonu içerisindeki BSA moleküllerinin absorpsiyonu, yaklaşık (111 ± 8) Hz’lik bir frekans kaymasına neden olur. Bu değer, denklem (3.3.) uygulandığında QCM sensörü yüzeyine 1.79×10^{12} BSA immobilize edildiği işettir.



Şekil 3. 2. BSA Bloklama İşleminin QCM Biyosensör ile Takibi.

3.2.1.5. *Escherichia coli* ATCC 25922 tespiti

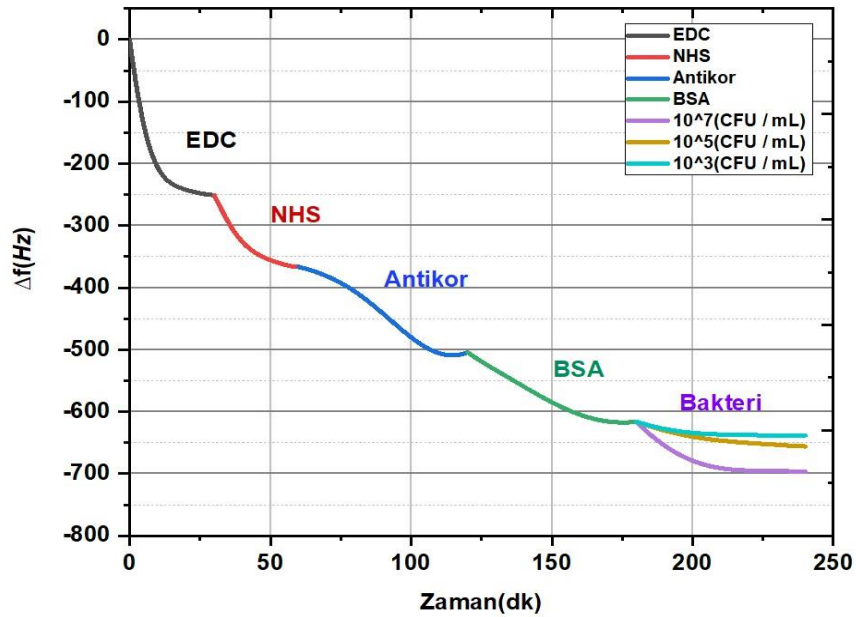
Bu aşamada, *E. coli* ATCC 25922'nin tespiti için ortam hazırlanmış ve QCM sisteme negatif kontrol olarak *E. coli* bakterisi bulunmayan gerçek tükürük uygulanmıştır. Son olarak, önceki işlemleri tamamladıktan sonra, 10^3 , 10^5 ve 10^7 CFU/mL konsantrasyonlarında *Escherichia coli* bakterisinin ATCC 25922, QCM sistemine uygulama işlemi yapılmıştır. Şekil 3'te, 10^0 , 10^3 , 10^5 ve 10^7 CFU/mL konsantrasyonlarında *E. coli* ATCC 25922 solüsyonları uygulandığında elde edilen rezonans frekansındaki değişimler gösterilmektedir.



Şekil 3. 3. Farklı *E. coli* ATCC 25922 Konsantrasyonlarının rezonans frekansındaki değişimler.

Negatif kontrol olarak içerisinde *E. coli* bakterisi bulunmayan solüsyon QCM sistemine uygulandıktan sonra, sistemin rezonans frekansında ortalama (7 ± 2.8) Hz'lik bir kayma izlenmiştir. Burada elde edilen frekans kayması, tükürük çözeltisindeki spesifik olmayan bağlantıya sebebiyet verebilecek proteinlerden veya kalsiyum ve magnezyum minerallerinin QCM sensörünün yüzeyi ile etkileşiminden kaynaklanmaktadır. Şekil 3.3'te kırmızı renk ile gösterilen kısımda, 10^3 CFU/mL konsantrasyonundaki *E. coli* bakteri solüsyonu QCM sistemine uygulandığında, rezonans frekansında ortalama (22 ± 2.9) Hz'lik bir kayma izlenmiştir. Bu konsantrasyon, planlanan deneydeki negatif kontrolün en düşük seviyede ayırt edilebildiği bir hedef analit konsantrasyonudur. Bu

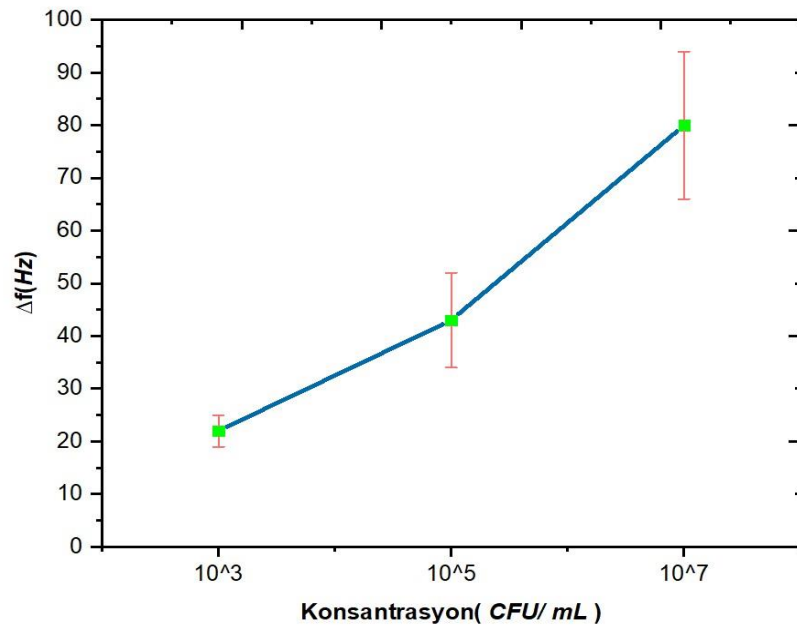
konsantrasyon çok düşük olduğundan, spesifik antikorlar tarafından yakalanan bakteri sayısı, kayda değer bir frekans değişimi için yeterli değildir. Ancak, Şekil 3.3'te mavi renk ile gösterilen kısımda, 10^5 CFU/mL konsantrasyonundaki *E.coli* bakteri solüsyonu QCM sistemine uygulandığında, rezonans frekansında ortalama (43 ± 9.8) Hz'lik bir kayma izlenmiştir. bakteri Konsantrasyonun artmasıyla, *E.coli* bakterisinin immobilize antikorlara bağlanması nedeniyle QCM sensörünün rezonans frekansı artmıştır. Benzer bir şekilde, Şekil 3.3'te yeşil renk ile gösterilen kısımda, 10^7 CFU/mL konsantrasyonundaki *E.coli* bakteri solüsyonu QCM sistemine uygulandığında, rezonans frekansında ortalama (80 ± 14.1) Hz'lik bir kayma tespit edilmiştir. Şekil 3.4. de gösterildiği gibi, $10^0 - 10^7$ CFU/mL *E. coli* çalışma aralığının tamamında, konsantrasyon ne kadar yüksek olursa, sensör tepkileri o kadar büyük olur ve bu nedenle frekans kaymaları artmaktadır. Bu artış, spesifik antikorlar tarafından daha fazla *Escherichia coli* bakterisinin yakalanmasına, SAM katmanının yüzeyindeki kütlenin artmasına ve ölçümdeki frekans değişim oranının azalmasına neden olmaktadır.



Şekil 3. 4. Deney aşamalarının QCM Biyosensör ile takibi

E.coli bakterisinin $10^3, 10^5$ ve 10^7 CFU/mL örnek solüsyonları ile çalışılırken frekans kayması ayırt edilebilmektedir. Bu nedenle bu sistem $10^3 \sim 10^7$ CFU/mL algılama aralığına sahiptir. Hücre konsantrasyonunun logaritması ile frekans kaymasının kalibrasyon grafiği Şekil 3.5'te gösterilmektedir. Şekil 3.5, hücre konsantrasyonunun artmasıyla, frekans değişiminin de arttığını göstermektedir. Başka bir anlamda, bakteri

konsantrasyonu 10^3 CFU/mL olduğunda, frekans kayması ortalama olarak yaklaşık (22 ± 2.9) Hz iken, numune negatif kontrol olduğunda, geçici tepki eğrileri negatif kontrolün taban çizgisinden ayırt edilememiştir. Sonuç olarak, yüksek bakteri konsantrasyonunda, solüsyonda bol miktarda bulunan bakterilerin yüzeydeki immobilize edilmiş antikorları doyurabileceği, ancak düşük bakteri konsantrasyonunda, düşük miktarda bakterinin yalnızca küçük bir kütle değişimi sağlayacağı görülmektedir. Denklem (3.1.) uygulandığında, *E. coli* bakterisinin kütle değişimi (Δm) üç farklı konsantrasyon (10^3 , 10^5 ve 10^7 CFU/mL) için hesaplanmıştır. Δm sonuçları sırasıyla, (389.4×10^{-9}), (761.1×10^{-9}) ve (1416.28×10^{-9}) dur. Tek bakterinin ağırlığı $\sim 10^{-12}$ g ise [122], QCM sensörünün yüzeyine bağlı üç farklı konsantrasyon için (10^3 , 10^5 ve 10^7 CFU/mL) ortalama *E. coli* bakterisi sayısı sırasıyla (389.4×10^3), (7.61×10^5) ve (1.42×10^6) ifade edilebilmektedir. Bu nedenle frekans kayması, en düşük ve en yüksek konsantrasyonlarda açık bir şekilde değişmeyecektir. Bu sonuçlar, QCM sisteminin hücre çözeltisindeki bakteri konsantrasyonunun nitel ve nicel analizi için kullanılmasına izin vermektedir. Bu çalışmada, 22 Hz frekans kayması ile *Escherichia coli* bakterisinin en düşük konsantrasyonundaki hedef bakteri ve immobilize edilmiş antikorlar arasında iyi bir doğrusal ilişki elde edilmiştir.



Şekil 3. 5. Kalibrasyon eğrisi

3.3 İstatiksel Analiz (T-Testi)

Yapılan tez çalışmasında, negatif kontrolde elde edilen ortalama negatif frekans kayması ile en düşük *Escherichia coli* konsantrasyonunda elde edilen ortalama frekans kayması arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olup olmadığını değerlendirmek için çift taraflı ve iki değişken bağımsız t-test uygulanmıştır. T-testi sonucunda 3.88×10^{-248} gibi küçük bir p değeri elde edilmiştir. P değeri, 0.05'den çok küçük olduğu için, negatif kontrolden elde edilen sinyal ile en düşük konsantrasyondan elde edilmiş sinyal arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark vardır.



4. BÖLÜM

TARTIŞMA-SONUÇ ve ÖNERİLER

Çoğu *Escherichia coli* (*E. coli*) suşunun, insanların ve hayvanların gastrointestinal sistemine zarar oluşturmayacak bir şekilde, normal bir flora üyesi olarak kolonize olmasına rağmen, dünya çapında çok çeşitli hastalıklara ve ölümlere neden olan patojenik *E. coli* suşları vardır. Bu nedenle, biyolojik numunelerde bakterilerin hızlı ve hassas bir şekilde tespit edilmesine yönelik artan bir ihtiyaç vardır. Son yıllarda, bu husus ile alakalı birçok araştırma yapılmıştır ve yapılmaya da devam etmektedir. Bu çalışmaların çoğunluğu, bakterilerin, spesifik ve hassas tespiti için laboratuvar tabanlı tespit sistemlerini göstermektedir. Bununla birlikte, hassasiyet seviyeleri gelişme altında olan diğer biyosensör platformlarının elde ettiğinden daha yetersiz kalmaktadır. Bu çalışmada, biyolojik numune olarak gerçek tükürük içerisinde Kuvars Kristal Mikroterazi (QCM) sensör ile *Escherichia coli* ATCC 25922 suşunun direkt tespiti gerçekleştirilmiştir. Ölçüm sistemi, *E. coli* bakterisi, anti-*E. coli* antikoru (ab25823) ve QCM sensörden oluşmaktadır. Bu sistem ile hassas, hızlı, güvenilir ve tekrarlanabilir ölçümlerin elde edilmesi hedeflenmiştir. Yapılan deneyler sonucunda, gerçek tükürükteki *Escherichia coli* bakterisi üç farklı konsantrasyonda (10^7 , 10^5 ve 10^3 CFU/mL), en az 3 tekrarlı uygulanarak, tespit sisteminin ölçüm sığı belirlenmiştir. Ayrıca, *E.coli* bakterisi ATCC 25922 suşunun nitel ve nicel tespitini hızlı, basit ve hassas bir şekilde ölçmek için, MUA ve deneylerde diğer kullanılan kimyasalların etkisi incelenmiştir. QCM sensörünün yüzeyini değiştirmenin genellikle birkaç yöntemi vardır. Önceki literatür incelendiğinde, 11-MUA SAM'lerin, kimyasal olarak kararlı tek tabakalı yüzeyler oluşturmak için biyomateryal araştırmalarında en yaygın kullanılan yöntemlerden biri olduğu bulunmuştur [123], [124]. Bu çalışmada, 11-mercaptoundecanoic acid dayalı SAM'nin, QCM ile *E.coli* tespiti için uygun olduğu, biyoalgılayıcı tek tabakanın oluşturulmasındaki uygulanabilirliği ile gösterilmiştir.

Ayrıca, iki çapraz bağlama ajanının, EDC ve NHS'nin kullanımının, stabiliteyi arttırdığı ve antikorla uygun bir amid bağlantısının oluşumunu kolaylaştırdığı, elektrot yüzeyinde tekrarlanabilir ve yoğun antikor paketlenmesine izin verdiği gösterilmiştir. SAM modifikasyonunun neden olduğu frekans kaymaları, kristal frekansındaki düşüş ile doğrulanmıştır. Wang'un çalışmasında QCM sensörünün yüzeyini modifiye etmek için kullandığı MHDA-SAM yöntemiyle karşılaştırıldığında, QCM kullanarak elde edilen frekans kaymaları, sırasıyla EDC / NHS ve antikor E. coli katmanları için (120.3) ve (271.4) Hz olmuştur [125]. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar, sırasıyla EDC / NHS ve antikor E. coli katmanları için frekans kaymalarının (115) ve (137) Hz olduğunu göstermiştir. Yüksek frekans kaymaları, kullanılan QCM kristallerinin daha büyük temel rezonans frekansına bağlanabilir. Çünkü, bu çalışmada temel frekansı 5MHz olan bir kristal kullanılırken, Wang ve arkadaşları, 8 MHz'lik bir kristal kullanmışlardır [125]. Ayrıca, bu tez araştırmasında altın yüzeyine bağlanan NHS ve antikor E. coli miktarları sırasıyla (10.5×10^{15}) ve (0.97×10^{13}), Wang ve arkadaşlarının çalışmasındaki miktarları sırasıyla (8.8735×10^{14}) ve (1.5351×10^{12}) civarındadır. Kullanılan NHS moleküllerinin miktarı ve sensöre immobilize edilmiş antikorların sayısı, Wang ve arkadaşlarının çalışmasındaki NHS moleküllerinin miktarına ve antikorların sayısına benzer niteliktedir. Fakat, bu çalışmadan EDC/NHS için elde edilen yüzeye bağlanan molekül miktarı, Wang ve arkadaşlarının çalışmasında elde edilenlerden daha fazladır. Sonuç olarak, bu çalışmada kullanılan 11-MUA SAM yönteminin, MHDA-SAM yöntemine göre NHS aktivasyonununa daha yüksek verimle etki ettiği ve daha yüksek antikor immobilizasyon etkinliği ortaya çıkardığı gösterilmiştir. Bu çalışmada ayrıca, *Escherichia coli* bakterisini tespit etmek için kullanılan, güncel literatürdeki, farklı QCM tespit çalışmaları üzerine de inceleme yapılmıştır. Yapılan deneylerde elde edilen *E.coli* algılama hassasiyeti ile literatürdeki *E.coli* algılama hassasiyetleri kıyaslanmıştır. Poitras ve arkadaşları, *Escherichia coli*'nin tespiti için dağılım izleme (QCM-D) ile bir kuvars kristali mikro terazisi kullanarak 3×10^5 ila 1×10^9 CFU/mL arasında saptama sınırına sahip bir biyosensör geliştirmişlerdir [126]. 2015 yılında, Farka ve arkadaşları, QCM immünosensörü kullanarak *Escherichia coli* (*E.coli*) bakterisini tespit etmek için, tespit limiti 10^4 CFU/mL olan yeni bir yöntem geliştirmişlerdir [127]. Başka bir çalışmada, E. coli bakterisinin tespiti için sensör yüzeyi MHDA, EDC ve NHS ile modifiye edilerek, altın yüzeyli QCM kristali ile bir immünosensör geliştirilmiş ve tespit limiti 10^2 – 10^7 CFU ml⁻¹ olarak

raporlanmıştır [128]. Yapılan bir başka çalışmada, farklı bir yöntem kullanılarak, *E. coli* bakterisinin tespiti 1.0×10^3 CFU/mL hassasiyet ile gerçekleştirilmiştir [129]. Mao ve arkadaşları, *Escherichia coli*'nin tespiti için tespit limiti 2.67×10^2 CFU/ml olan nanopartikül amplifikasyon yöntemine dayalı bir kuvars kristali mikroterazi (QCM) DNA sensörü geliştirmiştir [130]. 2020 yılında, benzer şartlarda altında, QCM sensör kullanılarak yapay tükürük içerisinde *Escherichia coli* bakterisini tespit etmek için 10^4 CFU/mL hassasiyet ile bir araştırma yapılmıştır [131]. Bu tez çalışmasında ise; elde edilen sonuçlar, (22 ± 2.9) Hz'lik frekans kayması ile sistemin en düşük tespit konsantrasyonu olan Tespit Sınırı (Limit of Detection (LOD)) 10^3 CFU/mL'de de bile hassas bir şekilde tespit yapıldığını göstermektedir. Ayrıca elde edilen sonuçlar ışığında, (80 ± 14.1) Hz'lik frekans kayması ile sistemin en yüksek tespit konsantrasyonu olan 10^7 CFU/mL'de tespit yapıldığı da gösterilmiştir. Bu çalışmada elde edilen sonuçlar baz alındığında, QCM sistemi ile *Escherichia coli* bakterisi, 10^3 - 10^7 CFU/mL aralığında başarı ile tanımlanmıştır.

Literatür araştırmalar incelendiğinde QCM sensörü kullanarak gerçek tükürük içerisinde *E.coli* bakteri direkt tespit edilmesi ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır. Bu tez çalışmasında tespit ortamı diğer çalışmalardan farklı olduğundan dolayı elde edilen sonuçlar çok benzer olmayacaktır. Ek olarak, antikorun *E.coli* bakterisine bağlanma aktivitesi birinden diğerine farklılık gösterir. Fakat, yapılan deneylerde elde edilen *E.coli* bakteri algılama hassasiyeti ile literatürdeki başka ortamlarda veya yöntemler ile *E.coli* bakteri algılama hassasiyetleri kıyaslanabilmektedir. Tablo 6.1'de bu tez çalışması hassasiyeti (10^3 CFU/mL) ve bazı çalışmalarda elde edilen verilerin hassasiyetleri ile kıyaslanmasını göstermektedir.

Tablo 6.1 Kullanılan yöntem tipine ve elde edilen LOD'ye göre bakterinin saptanması için bazı yöntemler özetlenmiştir.

Bakteri Türü	Yöntem	LOD	Kaynaklar
<i>E.coli</i>	SPR	10^6 CFU/mL	[132]

<i>E.coli</i>	EIS	10^3 CFU/mL	[133]
<i>E.coli</i>	Potansiyometrik	10^2 CFU/mL	[134]
<i>E.coli</i>	ELISA	10^4 CFU/mL	[135]
<i>E.coli</i>	QCM İmmunosensör	10^3 CFU/mL	Bu çalışma

Bu çalışmalardan en küçük algılama oranı 10^2 CFU/mL (Potansiyometrik biyosensör kullanarak). Fakat bu teknik tipik olarak aptamer etiketleme ve immobilizasyon gerektirmektedir. Bu süreçler sadece ekstra zaman ve maliyet gerektirir, aynı zamanda bakteriler ve aptamerler arasındaki bağlanma afinitesini de etkileyebilmektedir. Potansiyometrik yöntemlerin kurulumunun çok maliyetli olması bu çalışmada için tercih edilen bir yöntem değildir. Elektrokimyasal biyosensörler genellikle ucuz ve yerinde tespit edilebilmesine rağmen duyarlı Elektrokimyasal biyosensörler (ör.(EIS)) nispeten pahalıdır ve kolayca taşınabilir değildir. Ayrıca, ELISA yöntemi hızlı ve kolay olmasına rağmen bir Etiketleme ihtiyacı vardır ve bazen yanlış pozitif ve yanlış negatif vermektedir. Ek olarak, Optik SPR biyosensörleri duyarlı bir biyosensördür. Fakat karmaşık ön işlem aşamaları gerektirir. Bu engellerin üstesinden gelebilmek ve ve eksiklikleri tamamlamak için bu çalışmada, QCM İmmunosensörü kullanılmıştır. QCM sensörlerinin, yüksek hassasiyetli ve uygun fiyatlıdır. Ayrıca, her kullanılan antikorun pahalı ve tehlikeli etiketlenmesini gerektirmemektedir. karmaşık ön işlem aşamaları gerektirmeden tespit sağlayabilmektedir. Son olarak, Uzman personeli ihtiyaç duyulmamaktadır. QCM sensor kullanarak, gerçek tükürük içerisinde *E.coli* tespiti, yaklaşık 50-60 dk süre içerisinde gerçekleştirilmiş; ek olarak, QCM biyosensörün yüksek hassasiyet, özgüllük ve tekrarlanabilirliğe sahip olduğu da ortaya koyulmuştur. Bu nedenle, QCM biyosensörün, yüksek maliyetli ve büyük fiziksel boyutlara sahip cihazlar olmadan, bakım noktası (POC) testleri için oldukça umut verici olduğu da gösterilmiştir. Ayrıca, özellikle gelişmiş klinik ekipmanlarının olmadığı, tanı hizmeti veren kuruluşlarda diğer patojenlerin de erken, güvenilir ve invazif olmayan tespiti için alternatif bir platform ortaya koyulmuştur.

İleride yapılacak çalışmalar, karmaşık numuneler (insan kan serumu, dışkı, gıda vb.) içerisinde *E.coli* bakterisini tespit etmeyi amaçlar ise bu çalışmada geliştirilen kuvars

kristal mikroterazi(QCM) tespit yöntemini kolaylıkla kullanabileceklerdir. Ayrıca, uygun antikorlar seçildiği takdirde, önerilen teknik ile farklı biyo-algılama uygulamaları da yapılabilir. Dizi QCM sistemi kullanılarak birden fazla bakteri türü tespit edilebilir, tükürük içerisinde spesifik bir bakterinin tespiti, farklı bakteri türleri ile karşılaştırılabilir. Son olarak, QCM sensörünün yüzey modifikasyonu farklı yöntemlerle incelenebilir ve SAM yöntemiyle karşılaştırılabilir. Gelecekteki araştırmalar, birçok bakterinin aynı zamanda analiz edilebildiği sensör yüzeyi modifikasyonları da odaklanabilir. Yeni yüzey işlevselleştirme teknikleri kullanılarak elde edilecek, uygun maliyetli, hassas, özgül biyo-algılama süreçlerinde, bu çalışmada önerilen sistemin de başarılı olabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKÇA

1. Bhattacharya, A., Nsonwu, O., Johnson, A. P., & Hope, R. (2018). Estimating the incidence and 30-day all-cause mortality rate of Escherichia coli bacteraemia in England by 2020/21. **Journal of Hospital Infection**, **98**(3), 228-231.
2. Sadık, E. Ş., Saraoğlu, H. M., Ebeoğlu, M. A., Gürol, İ., & Koçak, F. E. (2016, October). Measurement of glucose levels with Quartz Crystal Microbalance (QCM) based sensor. In 2016 **Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO)** (pp. 1-4). IEEE.
3. Miller, S. M. (1994). Saliva testing--a nontraditional diagnostic tool. Clinical laboratory science: **journal of the American Society for Medical Technology**, **7**(1), 39-44.
4. Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic escherichia coli. **Nature reviews microbiology**, **2**(2), 123-140.
5. Shen, Z, Wang, J, Qiu, Z, Jin, M, Wang, X, 2011. QCM Immunosensor Detection of Escherichia Coli O157:H7 Based on Beacon Immunomagnetic Nanoparticles and Catalytic Growth of Colloidal Gold, Elsevier, **Biosensors and Bioelectronics** (26): 3376–3381.
6. Moreno-Fuentes, A. M., & Nieto-Sánchez, C. (2017). Biomarkers in Saliva as a Tool for Health Diagnosis. New Trends in Biomarkers and Diseases: **An Overview**, **436**.
7. Lim, J. Y., Yoon, J. W., & Hovde, C. J. (2010). A brief overview of Escherichia coli O157: H7 and its plasmid O157. **Journal of microbiology and biotechnology**, **20**(1), 5.
8. Vaughan, R. D., Carter, R. M., O'Sullivan, C. K., & Guilbault, G. G. (2003). A quartz crystal microbalance (QCM) sensor for the detection of Bacillus cereus. **Analytical letters**, **36**(4), 731-747.
9. Campuzano, S., Yáñez-Sedeño, P., & Pingarrón, J. M. (2017). Molecular biosensors for electrochemical detection of infectious pathogens in liquid biopsies: current trends and challenges. **Sensors**, **17**(11), 2533.

10. Streckfus, C. F., & Bigler, L. R. (2002). Saliva as a diagnostic fluid. **Oral diseases**, **8**(2), 69-76.
11. de Almeida, P. D. V., Gregio, A. M., Machado, M. A., De Lima, A. A., & Azevedo, L. R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. **J Contemp Dent Pract**, **9**(3), 72-80.
12. Granger, D. A., Hibel, L. C., Fortunato, C. K., & Kapelewski, C. H. (2009). Medication effects on salivary cortisol: Tactics and strategy to minimize impact in behavioral and developmental science. **Psychoneuroendocrinology**, **34**(10), 1437-1448.
13. Javaid, M., Ahmed, A., Durand, R., 2016, undefined. (n.d.). Saliva as a diagnostic tool for oral and systemic diseases. **Elsevier**.
14. Rathnayake, N., Gieselmann, D. R., Heikkinen, A. M., Tervahartiala, T., & Sorsa, T. (2017). Salivary Diagnostics—Point-of-Care diagnostics of MMP-8 in dentistry and medicine. **Diagnostics**, **7**(1), 7.
15. Humphrey, S. P., & Williamson, R. T. (2001). A review of saliva: normal composition, flow, and function. **The Journal of prosthetic dentistry**, **85**(2), 162-169.
16. Malamud, D. (2011). Saliva as a diagnostic fluid. **Dental Clinics**, **55**(1), 159-178.
17. Kubala, E., Strzelecka, P., Grzegocka, M., Lietz-Kijak, D., Gronwald, H., Skomro, P., & Kijak, E. (2018). A review of selected studies that determine the physical and chemical properties of saliva in the field of dental treatment. **BioMed research international**, 2018.
18. Parthasarathy, S., Swamikannu, B., & SR, J. (2019). Reliability of Saliva as a Diagnostic Fluid. **Indian Journal of Public Health Research & Development**, **10**(8).

19. Silhavy, T. J., Kahne, D., & Walker, S. (2010). The bacterial cell envelope. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, 2(5), a000414.\
20. Omerovic, M., Müştak, H. K., & Kaya, İ. B. Escherichia coli Patotiplerinin Virülens Faktörleri. **Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi**, 28(1), 1-6.
21. Robinson, R. K. (2014). **Encyclopedia of food microbiology**. Academic press.
22. Escherichia coli bacteria E. coli. Medically accurate 3D illustration, labeled. (Web sayfası: <https://www.dreamstime.com/escherichia-coli-bacteria-e-coli-medically-accurate-d-illustration-labeled-illustration-showing-escherichia-coli-bacteria-e-coli-image151515456>) (Erişim tarihi: Şubat 5, 2021).
23. Farooq, U., Yang, Q., Ullah, M. W., & Wang, S. (2019). Principle and Development of Phage-Based Biosensors. In **Biosensors for Environmental Monitoring**. IntechOpen.
24. Ngo, V. K. T., Nguyen, D. G., Nguyen, H. P. U., Nguyen, T. K. M., Huynh, T. P., Lam, Q. V., ... & Truong, T. N. L. (2014). Quartz crystal microbalance (QCM) as biosensor for the detecting of Escherichia coli O157: H7. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 5(4), 045004.
25. Ahmed, A., Rushworth, J. V., Hirst, N. A., & Millner, P. A. (2014). Biosensors for whole-cell bacterial detection. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 631-646.
26. Verma, J., Saxena, S., & Babu, S. G. (2013). ELISA-based identification and detection of microbes. In **Analyzing Microbes** (pp. 169-186). Springer, Berlin, Heidelberg.
27. TIP, T. (2010). ELISA technical guide and protocols. **Thermo Fisher Scientific Inc USA**, Bartlesville, OK.
28. Bloemen, M. (2015). Immunomagnetic separation of bacteria by iron oxide nanoparticles.
29. Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. **Peptides**, 72, 4-15.

30. Xi, H., Cai, Q., He, M., & Shi, H. (2007). Detection of Escherichia coli in wastewater based on enzyme immunoassay. **Frontiers of Environmental Science & Engineering in China**, 1(3), 381-384.
31. Pang, B., Zhao, C., Li, L., Song, X., Xu, K., Wang, J., ... & Meng, X. (2018). Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157: H7 detection. **Analytical biochemistry**, 542, 58-62.
32. Evans, M. F. (2009). The polymerase chain reaction and pathology practice. **Diagnostic histopathology**, 15(7), 344-356.
33. Bartholomew, R. A., Hutchison, J. R., Straub, T. M., & Call, D. R. (2016). PCR, Real-Time PCR, Digital PCR, and Isothermal Amplification. **Manual of Environmental Microbiology**, 2-3.
34. Maheaswari, R., Kshirsagar, J. T., & Lavanya, N. (2016). Polymerase chain reaction: A molecular diagnostic tool in periodontology. **Journal of Indian Society of Periodontology**, 20(2), 128.
35. Duman,T., 2013. HLA Tiplendirmesi PCR-SSP. (Web sayfası:<https://docplayer.biz.tr/3890652-Hla-tiplendirmesi-pcr-ssp-turker-duman-phd.html>) (Erişim tarihi: Şubat 7, 2021).
36. Liu, H. Y., Hopping, G. C., Vaidyanathan, U., Ronquillo, Y. C., Hoopes, P. C., & Moshirfar, M. (2019). Polymerase chain reaction and its application in the diagnosis of infectious keratitis. **Medical Hypothesis, Discovery and Innovation in Ophthalmology**, 8(3), 152.
37. Shaheen Shahzad, M. A., Sikandar, S., & Afzal, I. (2020). Polymerase Chain Reaction. **Genetic Engineering: A Glimpse of Techniques and Applications**, 13.
38. Burgart, L. J., Robinson, R. A., Heller, M. J., Wilke, W. W., Iakoubova, O. K., & Cheville, J. C. (1992). Multiplex polymerase chain reaction. **Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc**, 5(3), 320-323.

39. Dey, P. (2018). Polymerase chain reaction: principle, technique and applications in pathology. In **Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology** (pp. 201-211). Springer, Singapore.
40. Korbie, D. J., & Mattick, J. S. (2008). Touchdown PCR for increased specificity and sensitivity in PCR amplification. **Nature protocols**, **3**(9), 1452.
41. Carter, M., & Shieh, J. C. (2015). Guide to research techniques in neuroscience. **Academic Press**.
42. Imtiaz, J., Hashmi, I., Saeed, A., Qazi, I. A., & Arshad, M. (2013). Development of PCR protocol for detection of Escherichia coli in drinking water. **WIT Transactions on Ecology and The Environment**, **171**, 225-232.
43. He, L., Yang, H., Xiao, P., Singh, R., He, N., Liu, B., & Li, Z. (2017). Highly selective, sensitive and rapid detection of Escherichia coli O157: H7 using duplex PCR and magnetic nanoparticle-based chemiluminescence assay. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, **13**(10), 1243-1252.
44. Nikhil, B., Pawan, J., Nello, F., & Pedro, E. (2016). Introduction to biosensors. **Essays in Biochemistry**, **60**(1), 1-8.
45. Clark Jr, L. C., & Lyons, C. (1962). Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. **Annals of the New York Academy of sciences**, **102**(1), 29-45.
46. Shukla, S. K., Govender, P. P., & Tiwari, A. (2016). Polymeric micellar structures for biosensor technology. In **Advances in Biomembranes and Lipid Self-Assembly** (Vol. 24, pp. 143-161).
47. Sarihi, P., Shalmani, A. A., Araban, V., & Raoufi, M. (2019). Nanoparticles for Biosensing. In **Nanomaterials for Advanced Biological Applications** (pp. 121-143). Springer, Cham.
48. Metkar, S. K., & Girigoswami, K. (2019). Diagnostic biosensors in medicine—A review. **Biocatalysis and agricultural biotechnology**, **17**, 271-283.

49. O'sullivan, C. K., Vaughan, R., & Guilbault, G. G. (1999). **Piezoelectric immunosensors-theory and applications.**
50. Jha, S. N. (2015). Rapid detection of food adulterants and contaminants: theory and practice. **Academic Press.**
51. Stratis-Cullum, D. N., & Finch, A. S. (2013). Current trends in ubiquitous biosensing. **ARMY RESEARCH LAB ADELPHI MD.**
52. Cho, I. H., Kim, D. H., & Park, S. (2020). Electrochemical biosensors: perspective on functional nanomaterials for on-site analysis. **Biomaterials Research, 24(1), 1-12.**
53. Shruthi, G. S., Amitha, C. V., & Mathew, B. B. (2014). Biosensors: a modern day achievement. **J Instrument Technol, 2, 26-39.**
54. Chen, Y., Wang, Z., Liu, Y., Wang, X., Li, Y., Ma, P., ... & Li, H. (2018). Recent advances in rapid pathogen detection method based on biosensors. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases, 37(6), 1021-1037.**
55. Gupta, A., Bhardwaj, S. K., Sharma, A. L., Kim, K. H., & Deep, A. (2019). Development of an advanced electrochemical biosensing platform for E. coli using hybrid metal-organic framework/polyaniline composite. **Environmental research, 171, 395-402.**
56. Wang, Y., Xu, H., Zhang, J., & Li, G. (2008). Electrochemical sensors for clinic analysis. **Sensors, 8(4), 2043-2081.**
57. Pohanka, M., & Skládal, P. (2008). Electrochemical biosensors--principles and applications. *Journal of Applied Biomedicine (De Gruyter Open), 6(2).*
58. Shahbazmohammadi, H., Sardari, S., & Omidinia, E. (2020). An amperometric biosensor for specific detection of glycated hemoglobin based on recombinant engineered fructosyl peptide oxidase. **International Journal of Biological Macromolecules, 142, 855-865.**

59. Cánovas, R., Blondeau, P., & Andrade, F. J. (2020). Modulating the mixed potential for developing biosensors: Direct potentiometric determination of glucose in whole, undiluted blood. **Biosensors and Bioelectronics**, **112302**.
60. Tian, Y., Liang, T., Zhu, P., Chen, Y., Chen, W., Du, L., ... & Wang, P. (2019). Label-Free Detection of E. coli O157: H7 DNA Using Light-Addressable Potentiometric Sensors with Highly Oriented ZnO Nanorod Arrays. **Sensors**, **19**(24), 5473.
61. Yang, H., Zhou, H., Hao, H., Gong, Q., & Nie, K. (2016). Detection of Escherichia coli with a label-free impedimetric biosensor based on lectin functionalized mixed self-assembled monolayer. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **229**, 297-304.
62. Chowdhury, A. D., De, A., Chaudhuri, C. R., Bandyopadhyay, K., & Sen, P. (2012). Label free polyaniline based impedimetric biosensor for detection of E. coli O157: H7 Bacteria. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **171**, 916-923.
63. Touhami, A. (2014). Biosensors and nanobiosensors: design and applications. **Nanomedicine**, **15**, 374-403.
64. Labib, M., Sargent, E. H., & Kelley, S. O. (2016). Electrochemical methods for the analysis of clinically relevant biomolecules. **Chemical reviews**, **116**(16), 9001-9090.
65. Edmonds, T. E. (1988). Voltammetric and amperometric transducers. In **Chemical Sensors** (pp. 193-213). Springer, Dordrecht.
66. Rassas, I., Braiek, M., Bonhomme, A., Bessueille, F., Rafin, G., Majdoub, H., & Jaffrezic-Renault, N. (2019). Voltammetric glucose biosensor based on glucose oxidase encapsulation in a chitosan-kappa-carrageenan polyelectrolyte complex. **Materials Science and Engineering: C**, **95**, 152-159.
67. Huang, Y., Wu, Z., Zhao, G., Dou, W., 2019. A label-free electrochemical immunosensor modified with aunps for quantitative detection of escherichia coli o157:h7. **Springer**, **48**(12), :7960–7969.

68. Pohanka, M. (2018). Overview of piezoelectric biosensors, immunosensors and DNA sensors and their applications. **Materials**, **11**(3), 448.
69. Li, Y. Li, Yanbin. 2006. Section 2.3 Biosensors, pp. 52-93, of Chapter 2 Hardware, in **CIGR Handbook of Agricultural Engineering Volume VI Information Technology**. Edited by CIGR-The International Commission of Agricultural Engineering; Volume Editor, Axel Munack. St. Joseph, Michigan, USA: ASABE. Copyright American Society of Agricultural Engineers. Çevirmenler: Pınar DEMİRCİOĞLU ve İsmail BÖĞREKÇİ.
70. Tombelli, S., Minunni, M., & Mascini, M. (2005). Piezoelectric biosensors: strategies for coupling nucleic acids to piezoelectric devices. **Methods**, **37**(1), 48-56.
71. García-Martínez, G., Bustabad, E. A., Perrot, H., Gabrielli, C., Bucur, B., Lazerges, M., ... & Vives, A. A. (2011). Development of a mass sensitive quartz crystal microbalance (QCM)-based DNA biosensor using a 50 MHz electronic oscillator circuit. **Sensors**, **11**(8), 7656-7664.
72. Pohanka, M. (2017). The piezoelectric biosensors: principles and applications. **Int J Electrochem Sci**, **12**, 496-506.
73. Zhang, C., Liu, N., Yang, J., & Chen, W. (2011). Thickness-shear vibration of AT-cut quartz plates carrying finite-size particles with rotational degree of freedom and rotatory inertia [Correspondence]. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, **58**(3), 666-670.
74. Kazemi-Darsanaki, R., Azizzadeh, A., Nourbakhsh, M., Raeisi, G., & AzizollahiAliabadi, M. (2012). Biosensors: functions and applications. **J Biol Today's World**, **2**, 20-23.
75. Zheng, Y. H., Hua, T. C., & Xu, F. (2005). A novel thermal biosensor based on enzyme reaction for pesticides measurement. **Journal of environmental sciences**, **17**(4), 615-619.

76. Yao, N., Wang, J., & Zhou, Y. (2014). Rapid determination of the chemical oxygen demand of water using a thermal biosensor. **Sensors**, **14**(6), 9949-9960.
77. Damborský, P., Švitel, J., & Katrlík, J. (2016). Optical biosensors. Essays in **biochemistry**, **60**(1), 91-100.
78. Du, H., Li, Z., Wang, Y., Yang, Q., & Wu, W. (2020). Nanomaterial-based Optical Biosensors for the Detection of Foodborne Bacteria. **Food Reviews International**, **1**-30.
79. Li, Z., Zhang, W., & Xing, F. (2019). Graphene optical biosensors. **International journal of molecular sciences**, **20**(10), 2461.
80. Ooya, T., Sakata, Y., Choi, H. W., & Takeuchi, T. (2016). Reflectometric interference spectroscopy-based sensing for evaluating biodegradability of polymeric thin films. **Acta biomaterialia**, **38**, 163-167.
81. Kojima, T. (2017). Combined reflectometric interference spectroscopy and quartz crystal microbalance detect differential adsorption of lipid vesicles with different phase transition temperatures on SiO₂, TiO₂, and Au surfaces. **Analytical chemistry**, **89**(24), 13596-13602.
82. Morris, M. C., & Blondel, M. (2014). **Fluorescent biosensors**.
83. Prével, C., Kurzawa, L., Van, T. N. N., & Morris, M. C. (2014). Fluorescent biosensors for drug discovery new tools for old targets—Screening for inhibitors of cyclin-dependent kinases. **European journal of medicinal chemistry**, **88**, 74-88.
84. Perumal, V., & Hashim, U. (2014). Advances in biosensors: Principle, architecture and applications. **Journal of applied biomedicine**, **12**(1), 1-15.
85. Englebienne, P., Van Hoonacker, A., & Verhas, M. (2003). Surface plasmon resonance: principles, methods and applications in biomedical sciences. **Spectroscopy**, **17**(2, 3), 255-273.

86. Tawil, N., Sacher, E., Mandeville, R., & Meunier, M. (2012). Surface plasmon resonance detection of *E. coli* and methicillin-resistant *S. aureus* using bacteriophages. **Biosensors and Bioelectronics**, **37**(1), 24-29.
87. Yilmaz, E., Majidi, D., Ozgur, E., & Denizli, A. (2015). Whole cell imprinting based *Escherichia coli* sensors: A study for SPR and QCM. **Sensors and Actuators B: Chemical**, **209**, 714-721.
88. Bosch, M. E., Sánchez, A. J. R., Rojas, F. S., & Ojeda, C. B. (2007). Recent development in optical fiber biosensors. **Sensors**, **7**(6), 797-859.
89. Kaushik, S., Pandey, A., Tiwari, U. K., & Sinha, R. K. (2018). A label-free fiber optic biosensor for *Salmonella Typhimurium* detection. **Optical Fiber Technology**, **46**, 95-103.
90. Huang, J., Liu, Y., Zhang, P., Li, Y., & Ding, L. (2017). A temperature-triggered fiber optic biosensor based on hydrogel-magnetic immobilized enzyme complex for sequential determination of cholesterol and glucose. **Biochemical Engineering Journal**, **125**, 123-128.
91. Xu, S., & Mutharasan, R. (2009). Cantilever biosensors in drug discovery. **Expert opinion on drug discovery**, **4**(12), 1237-1251.
92. Fritz, J. (2008). Cantilever biosensors. **analyst**, **133**(7), 855-863.
93. Mertens, J., Cuervo, A., & Carrascosa, J. L. (2019). Nanomechanical detection of *Escherichia coli* infection by bacteriophage T7 using cantilever sensors. **Nanoscale**, **11**(38), 17689-17698.
94. Marrazza, G. (2014). Piezoelectric biosensors for organophosphate and carbamate pesticides: a review. **Biosensors**, **4**(3), 301-317.
95. Özel, F. (2010). Organik molekül temelli gaz sensörü çalışmaları (**Doctoral dissertation, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü**).
96. Jha, S. N. (2015). Rapid detection of food adulterants and contaminants: theory and practice. **Academic Press**.

97. Tlili, A., Abdelghani, A., Hleli, S., & Maaref, M. A. (2004). Electrical Characterization of a Thiol SAM on Gold as a First Step for the Fabrication of Immunosensors based on a Quartz Crystal Microbalance. **Sensors**, **4**(6), 105-114.
98. Bai, Q., & Huang, X. (2016). Using quartz crystal microbalance for field measurement of liquid viscosities. **Journal of Sensors**, 2016.
99. Edvardsson, M., 2019. The working principles of QCM and QCM-D technology. (Web sayfası: <https://blog.biolinscientific.com/how-does-qcm-technology-work>) (Erişim tarihi: Mart 3, 2021).
100. Fuchiwaki, Y., Tanaka, M., Makita, Y., & Ooie, T. (2014). New approach to a practical quartz crystal microbalance sensor utilizing an inkjet printing system. **Sensors**, **14**(11), 20468-20479.
101. Battal, D., Akgönüllü, S., Yalcin, M. S., Yavuz, H., & Denizli, A. (2018). Molecularly imprinted polymer based quartz crystal microbalance sensor system for sensitive and label-free detection of synthetic cannabinoids in urine. **Biosensors and Bioelectronics**, **111**, 10-17.
102. Ngo, V. K. T., Nguyen, D. G., Nguyen, H. P. U., Nguyen, T. K. M., Huynh, T. P., Lam, Q. V., ... & Truong, T. N. L. (2014). Quartz crystal microbalance (QCM) as biosensor for the detecting of Escherichia coli O157: H7. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, **5**(4), 045004.
103. Sadık, E. Ş., Saraoğlu, H. M., Ebeoğlu, M. A., Gürol, İ., & Koçak, F. E. (2016, October). Measurement of glucose levels with Quartz Crystal Microbalance (QCM) based sensor. In 2016 **Medical Technologies National Congress (TIPTEKNO)** (pp. 1-4). IEEE.
104. Beşergil, B. Kuvars Kristal Mikroterazi (quartz crystal microbalance). (Web sayfası: <http://bilsenbesergil.blogspot.com/p/kuvars-kristal-mikroterazi-quartz.html>) (Erişim tarihi: Mart 12, 2021).
105. Temel, F, Ozcelik, E, Akpınar, M, Tabakci, M, 2016. Sensing Studies of a Amine Functionalized Calixarene Derivative Coated QCM Biosensor in **Aqueous**

Solution, 249, 3rd International Congress on Biosensors, 5-7 October, Ankara/Turkey, Hacettepe University, 144 s/pp.

106. Li, Y., Afrasiabi, R., Fathi, F., Wang, N., Xiang, C., Love, R., ... & Kraatz, H. B. (2014). Impedance based detection of pathogenic E. coli O157: H7 using a ferrocene-antimicrobial peptide modified biosensor. **Biosensors and Bioelectronics, 58**, 193-199.
107. Poitras, C., & Tufenkji, N. (2009). A QCM-D-based biosensor for E. coli O157: H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. **Biosensors and Bioelectronics, 24**(7), 2137-2142.
108. Sigma-Aldrich. N-(3-dimethylaminopropyl)-n'-ethylcarbodiimide hydrochloride. (Web sayfası: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/03450?lang=en®ion=TR>) (Erişim tarihi: Nisan 18, 2021).
109. Sigma-Aldrich. N-hydroxysuccinimide 98%. (Web sayfası: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/130672?lang=en®ion=TR>) (Erişim tarihi: Nisan 18, 2021).
110. Sigma-Aldrich. 11-mercaptoundecanoic acid 95% | sigma-aldrich. (Web sayfası: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/450561?lang=en®ion=TR>) (Erişim tarihi: Nisan 18, 2021).
111. Xu, S. (2012). Electromechanical biosensors for pathogen detection. **Microchimica Acta, 178**(3-4), 245-260.
112. High Efficiency & Stability Protein CrossLinking with EDC & NHS., 2017. (Web sayfası: <https://info.gbiosciences.com/blog/2-step-protein-coupling-edc-nhs>) (Erişim tarihi: Nisan 20, 2021).
113. Millipore, M. (2015). Microsphere Coupling—Two-step EDC/Sulfo NHS Covalent Coupling Procedure for Estapor® Carboxyl-modified Dyed Microspheres 2015. **Application Note**.
114. Xu, S. (2012). Electromechanical biosensors for pathogen detection. **Microchimica Acta, 178**(3-4), 245-260.

115. Rockland, 2018. Bovine Serum Albumin Overview. (Web sayfası: <https://rockland-inc.com>), (Erişim tarihi: Nisan 27, 2021).
116. Maglio, O., Costanzo, S., Cercola, R., Zambrano, G., Mauro, M., Battaglia, R., ... & Lombardi, A. (2017). A quartz crystal microbalance immunosensor for stem cell selection and extraction. **Sensors**, **17**(12), 2747.
117. Bauer, A. P., Dieckmann, S. M., Ludwig, W., & Schleifer, K. H. (2007). Rapid identification of Escherichia coli safety and laboratory strain lineages based on Multiplex-PCR. **FEMS microbiology letters**, **269**(1), 36-40.
118. San Juan, J. C. R. (2011). Nicté Yaxal Arenas Heredia (**Doctoral dissertation, University of Toronto**).
119. Icoz, K., Soylu, M. C., Canikara, Z., & Unal, E. (2018). Quartz-crystal microbalance measurements of CD19 antibody immobilization on gold surface and capturing B lymphoblast cells: effect of surface functionalization. **Electroanalysis**, **30**(5), 834-841.
120. Wang, L. J., Wu, C. S., Hu, Z. Y., Zhang, Y. F., Li, R., Wang, P., 2008. Sensing escherichia coli o157:h7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based qcm immunosensor. Journal of Zhejiang University: **Science B**, **9**(2), :121–131.
121. Ertekin, Ö., Öztürk, S., & Öztürk, Z. Z. (2016). Label free QCM immunobiosensor for AFB1 detection using monoclonal IgA antibody as recognition element. **Sensors**, **16**(8), 1274.
122. Escherichia coli Statistics. (Web sayfası: https://ecmdb.ca/e_coli_stats) (Erişim tarihi: Haziran 12, 2021).
123. Campuzano, S., Pedrero, M., Montemayor, C., Fatás, E. ve Pingarrón, J.M. (2006). Elektrokimyasal empedans spektroskopisi ile alkanetiyol ile birleştirilmiş tek tabakalı modifiye edilmiş altın elektrotların karakterizasyonu. **Elektroanalitik Kimya Dergisi**, **586** (1), 112-121.
124. Yang, M.H., Jong, S. B., Chung, T.W., Huang, Y. F. ve Ty, Y. C. (2011). Klinik uygulamada kuvars kristali mikro terazisi. **Sağlık, Çevre ve Biyogüvenlik için Biyosensörler**, **257-272**.

125. Wang, L. J., Wu, C. S., Hu, Z. Y., Zhang, Y. F., Li, R., Wang, P., 2008. Sensing escherichia coli o157:h7 via frequency shift through a self-assembled monolayer based qcm immunosensor. **Journal of Zhejiang University: Science B**,9(2), :121–131.
126. Poitras, C., & Tufenkji, N. (2009). A QCM-D-based biosensor for E. coli O157: H7 highlighting the relevance of the dissipation slope as a transduction signal. **Biosensors and Bioelectronics**, 24(7), 2137-2142.
127. Farka, Z., Kovář, D., & Skládal, P. (2015). Rapid detection of microorganisms based on active and passive modes of QCM. **Sensors**, 15(1), 79-92.
128. Ngo, V. K. T., Nguyen, D. G., Nguyen, H. P. U., Nguyen, T. K. M., Huynh, T. P., Lam, Q. V., ... & Truong, T. N. L. (2014). Quartz crystal microbalance (QCM) as biosensor for the detecting of Escherichia coli O157: H7. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, 5(4), 045004.
129. Geng, P., Zhang, X., Meng, W., Wang, Q., Zhang, W., Jin, L., ... & Wu, Z. (2008). Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, 53(14), 4663-4668.
130. Mao, X., Yang, L., Su, X. L., & Li, Y. (2006). A nanoparticle amplification based quartz crystal microbalance DNA sensor for detection of Escherichia coli O157: H7. **Biosensors and Bioelectronics**, 21(7), 1178-1185.
131. Al-Tairi, A., 2020. Yapay tükürük içerisinde kuvars kristal mikrodenge sensör ile Escherichia coli bakterisi ATCC 25922 suşunun direkt tespiti. Erciyes university, Yüksek Lisans Tezi, Kayseri, Sayfa sayısı 69.
132. Geng, P., Zhang, X., Meng, W., Wang, Q., Zhang, W., Jin, L., ... & Wu, Z. (2008). Self-assembled monolayers-based immunosensor for detection of Escherichia coli using electrochemical impedance spectroscopy. **Electrochimica Acta**, 53(14), 4663-4668.

133. Tian, Y., Liang, T., Zhu, P., Chen, Y., Chen, W., Du, L., ... & Wang, P. (2019). Label-Free Detection of E. coli O157: H7 DNA Using Light-Addressable Potentiometric Sensors with Highly Oriented ZnO Nanorod Arrays. *Sensors*, **19**(24), 5473.
134. Yilmaz, E., Majidi, D., Ozgur, E., & Denizli, A. (2015). Whole cell imprinting based Escherichia coli sensors: A study for SPR and QCM. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **209**, 714-721.
135. Pang, B., Zhao, C., Li, L., Song, X., Xu, K., Wang, J., ... & Meng, X. (2018). Development of a low-cost paper-based ELISA method for rapid Escherichia coli O157: H7 detection. *Analytical biochemistry*, **542**, 58-62.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: AYLAK KOURDI

Uyruğu: Suriye

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek Lisans	Erciyes Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyomedikal Mühendisliği Ana Bilim Dalı	2020 - 2021
Lisans	Halep Üniversitesi, Biyoteknoloji Mühendisliği Ana Bilim Dalı.	2014 - 2015
Lise	Bechara El Khoury, Halep	2010 - 2011

YABANCI DİL

İngilizce

Türkçe

YAYINLAR

1. Kourdi, W., Soylu, M.Ç. (2020). “ The direct detection of *Escherichia coli* ATCC 25922 strain in saliva based on quartz crystal microbalance (QCM) sensor ”, in the International Eurasian Conference on Biotechnology and Biochemistry (BioTechBioChem 2020) , Ankara – Turkey.