

SULARDA FEKAL KİRLİLİK TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

BIOSENSOR DEVELOPMENT FOR THE DETECTION OF FAECAL POLLUTION IN WATER

ÖZGE CAN ERDEM

PROF. DR. NİLÜFER CİHANGİR

Tez Danışmanı

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Eş Danışman

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

ÖZGE CAN ERDEM' in hazırladığı “**Sularda Fekal Kirlilik Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi**” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından **BİYOLOJİ ANABİLİM DALI**'nda **DOKTORA TEZİ** olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Aysun ERGENE

Başkan



Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Danışman



Prof. Dr. Sevgi ERTUĞRUL KARATAY

Üye



Prof. Dr. Handan YAVUZ

Üye



Dr. Öğr. Üyesi Neslihan İDİL

Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından **DOKTORA TEZİ** olarak / / tarihinde onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Sevgili aileme..



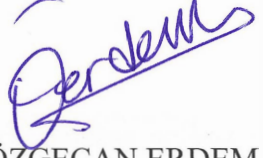
ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada,

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

20/09/2019


ÖZGECAN ERDEM

YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

Yükseköğretim Kurulu tarafından yayınlanan “**Lisansüstü Tezlerin Elektronik Ortamda Toplanması, Düzenlenmesi ve Erişime Açılmasına İlişkin Yönerge**” kapsamında tezim aşağıda belirtilen koşullar haricince YÖK Ulusal Tez Merkezi / H. Ü. Kütüphaneleri Açık Erişim Sisteminde erişime açılır.

- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren 2 yıl ertelenmiştir.
- ☐ Enstitü / Fakülte yönetim kurulu gerekçeli kararı ile tezimin erişime açılması mezuniyet tarihimden itibaren ay ertelenmiştir.
- ☐ Tezim ile ilgili gizlilik kararı verilmiştir.

20/09/2019

ÖZGE CAN ERDEM

ÖZET

SULARDA FEKAL KİRLİLİK TAYİNİNE YÖNELİK BİYOSENSÖR GELİŞTİRİLMESİ

Özgecan ERDEM

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Eş-Danışman: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Eylül 2019, 82 sayfa

İçme ve yüzey sularının mikroorganizmalar ile kontaminasyonu insan sağlığını tehdit ettiğinden dolayı dikkat çeken bir problemdir. Sularda fekal bir kirlilik olduğunu belirleyen mikroorganizmalardan birisi de koliform bakterileri enfekte eden bakteriyofajlardır. Mikroorganizma tespiti için hali hazırda kullanılan yöntemler, zaman alıcı olmalarının yanı sıra fazla emek isterler. Bu yüzden bir alternatif olarak hızlı, hassas ve düşük maliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada biyosensörler, mikroorganizma tespiti için yararlı araçlardır. Bunlardan birisi de optik biyosensörler sınıfında yer alan yüzey plazmon rezonans biyosensörlerdir. Biyosensör yüzeyinde moleküler baskılanmış polimerlerin kullanılması yüksek seçiciliğe ve hassaslığa sahip olduğundan dolayı tercih edilen bir yöntemdir. Sunulan tez çalışmasının amacı, fekal indikatör mikroorganizmalardan biri olan T4 bakteriyofajını tespit etmeye yönelik bakteriyofaj baskılanmış yüzey plazmon rezonans biyosensörler hazırlamaktır. Nanopartikül ve nanofilm temelli polimer ile iki farklı yüzey plazmon rezonans biyosensör hazırlanmış ve sularda fekal kirlilik tayinindeki etkinlikleri karşılaştırılmıştır. Bu bağlamda öncelikle fonksiyonel monomer olan N-metakroil-(L)-histidin metil ester sentezlenmiş ve karakterizasyonu Fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi ve nükleer

manyetik rezonans analizleri ile yapılmıştır. Uygun fonksiyonel monomer ve T4 bakteriyofajı kalıp molekülü ile hazırlanmış ön-kompleks varlığında T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküller mini-emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile sentezlenmiştir. Zeta boyut, fourier dönüşümlü kızıl ötesi spektroskopisi, taramalı elektron mikroskobu, geçirimli elektron mikroskobu ve atomik kuvvet mikroskobu analizleri ile karakterize edildikten sonra yüzey plazmon rezonans çip yüzeyine immobilize edilmiştir. Biyosensör yüzeyi, elipsometri ve temas açısı ile karakterize edildikten sonra kinetik, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik ve gerçek örnek analizleri için kullanılmıştır. Seçicilik çalışmaları için T2 ve MS2 bakteriyofajları kullanılırken, gerçek örnek analizlerinde çeşme suyu ve deniz suyu kullanılmıştır. Mikro-temas baskılama yöntemi kullanılarak, T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmler hazırlanmıştır. Yine hazırlanan biyosensör yüzeyi, temas açısı, elipsometri ve atomik kuvvet mikroskobu ile analiz edildikten sonra aynı koşullarda kinetik, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik ve gerçek örnek analizleri için kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre nanopartiküller ve nanofilm polimerleri kullanılarak hazırlanan yüzey plazmon rezonans biyosensörlerin 1×10^4 - 4×10^6 pfu (plaque forming unit)/mL derişim aralığında sırasıyla %99 ve %92 doğrulukta ölçüm yapabildiği görülmüştür. Tayin limiti nanopartikül temelli yüzey plazmon rezonans biyosensör için 6×10^3 pfu/mL iken nanofilm temelli yüzey plazmon rezonans biyosensör için 8×10^3 pfu/mL olarak hesaplanmıştır. Ayrıca nanopartikül temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörün geri kazanım değerleri çeşme ve deniz suyu örneklerinde %91-96 iken nanofilm temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörün geri kazanım değerleri %85-90 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen sonuçlar her iki yüzey plazmon rezonans biyosensörün de yüksek seçicilikte ölçüm yapabildiğini ancak nanopartikül polimer temelli yüzey plazmon rezonans biyosensörün daha yüksek duyarlılığa ve seçiciliğe sahip olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Bakteriyofaj, moleküler baskılama, yüzey plazmon rezonans, biyosensör.

ABSTRACT

BIOSENSOR DEVELOPMENT FOR THE DETECTION OF FAECAL POLLUTION IN WATER

Özgecan ERDEM

Doctor of Philosophy, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR

Co-Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

September 2019, 82 pages

Contamination of drinking and surface waters with microorganisms is a threatening health problem that attracts attention. One of the microorganisms that determine fecal contamination in water is bacteriophages which infect coliform bacteria. The methods currently used for microorganism detection are time consuming and require more labor. Therefore, there is a need for fast, precise and low-cost methods as an alternative. At this point, biosensors are useful tools for microorganism detection. One of these is surface plasmon resonance (SPR) sensors which are in the class of optical biosensors. The use of molecularly imprinted polymers on the sensor surface is a preferred method because of its high selectivity and sensitivity. The aim of this thesis is to prepare bacteriophage imprinted biosensors to detect T4 bacteriophage which is one of the fecal indicator microorganisms. Two different biosensors were prepared with nanoparticle and nanofilm based polymers and compared. In this context, the functional monomer N-methacryl-

(L)-histidine methyl ester was synthesized and its characterization was made by fourier transformed infrared spectroscopy and nuclear magnetic resonance. T4 bacteriophage imprinted and non-imprinted nanoparticles were synthesized by mini-emulsion polymerization method and immobilized on SPR biosensor surface after zeta size, fourier transform infrared spectroscopy, scanning electron microscopy, transmission electron microscopy and atomic force microscopy analysis. After the biosensor surface was characterized by ellipsometry and contact angle, the prepared biosensor was used for kinetic, selectivity, reusability and real sample analysis. While T2 and MS2 bacteriophages were used for selectivity studies, tap water and sea water were used in real sample analyzes. T4 bacteriophage imprinted and non-imprinted nanofilms were prepared using the micro-contact imprinting method. The prepared biosensor surface was analyzed by contact angle, ellipsometry and atomic force microscopy and used for kinetic, selectivity, reusability and real sample analysis under the same conditions. According to the results obtained, SPR biosensors prepared using nanoparticles and nanofilm polymers were able to measure 99% and 92% accuracy in 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL concentration range, respectively. The limit of detection was 6×10^3 pfu/mL for the nanoparticle based biosensor and 8×10^3 pfu/mL for the nanofilm based biosensor. In addition, recovery values of nanoparticle based surface plasmon resonance biosensor were calculated as 91-96% in tap and sea water samples while recovery values of nanofilm based surface plasmon resonance biosensor were calculated as 85-90%. The results show that both surface plasmon resonance biosensors can measure with high selectivity, but nanoparticle polymer based surface plasmon resonance biosensor has higher sensitivity and selectivity.

Keywords: Bacteriophages, molecular imprinting, surface plasmon resonance, biosensor.

TEŞEKKÜR

Lisans ve lisansüstü eğitimim boyunca bilgisini, desteğini ve sevgisini esirgemeyen çok değerli danışman hocam Prof. Dr. Nilüfer Cihangir'e,

Doktora tezimden itibaren beni çalışma grubuna kabul eden, değerli bilgisini paylaşan ve desteğini her zaman gösteren Prof. Dr. Adil Denizli'ye,

Tez ve diğer tüm çalışmalarım süresince yardımları ve bilgisi ile bana destek olan Dr. Yeşeren Saylan'a,

Her zaman sevincimi ve üzüntümü paylaştığım, her koşulda yanımda olan çalışma arkadaşlarım; Kübra Erkan Türkmen, Hasan Akyıl, Gözde Koşarsoy Ağçeli, İrem Çelebier, Meltem Ulusoy, Melike Sayın, Selcan Genç, Cansu Sevim, Meriç Birben, Hamideh Hammamchi'ye,

Yüksek lisansa başladığımdan beri kendimi bir aile ortamında hissetmemi sağlayan, Biyoteknoloji Anabilim Dalı üyeleri değerli hocalarım, Prof. Dr. Nilüfer Aksöz, Prof. Dr. Işıl Seyis Bilkay, Dr. Öğr. Üyesi Neslihan İdil, Dr. Sinem Diken Gür, Dr. Hande Avcıoğlu, Dr. Sezen Bilen Özyürek, Dr. Gülcan Özbakır ve Dr. Doruk Aracagök'e,

Dahil olduğum andan itibaren hiç yabancılık çekmediğim, her konuda sorularıma karşı bilgi ve destek alabildiğim çok sevgili BIOREG ailesi hocalarına ve öğrencilerine,

Tez süresi boyunca maddi desteğinden ötürü Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne,

Tüm eğitim hayatım boyunca her zaman sevgiyle ve sabırla yanımda olan sevgili aileme,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Fekal Su Kirliliği.....	3
2.2. Fekal Su Kirliliği Tespit Yöntemleri.....	3
2.3. Fekal İndikatör Mikroorganizmalar	4
2.3.1. T4 Bakteriyofajı ve Yapısı	8
2.4. Bakteriyofaj Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	10
2.5. Biyosensörler.....	12
2.5.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması.....	13
2.5.1.1. Optik Biyosensörler.....	13
2.5.1.1.1. Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler.....	14
2.6. Moleküler Baskılama Yöntemi	15
2.6.1. Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Yaklaşımlar	18
2.6.1.1. Yığın Baskılama	18
2.6.1.2. Yüzey Baskılama.....	19
2.6.1.2.1. Mikro-temas Baskılama	20
2.6.1.3. Epitop Baskılama	20

2.6.2. Moleküler Baskılama Tekniğinde Önemli Malzemeler.....	21
2.6.2.1. Fonksiyonel Monomer	21
2.6.2.2. Çapraz Bağlayıcı.....	23
2.6.2.3. Çözücü	23
2.6.2.4. Başlatıcı	24
2.7. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri.....	24
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR	26
3.1. Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar ve Sarf Malzemeler	26
3.2. T4 Bakteriyofaj Süspansiyonunun Hazırlanması.....	27
3.3. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu	27
3.4. Uygun Ön-Kompleks Oranının Belirlenmesi	28
3.5. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması	29
3.5.1. Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu	29
3.5.2. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması ve Yüzeylerin Karakterizasyonu	31
3.5.3. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler.....	32
3.5.4. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri.....	33
3.5.5 Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi	33
3.5.6. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi	33
3.5.7. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi	34
3.6. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması	34
3.6.1. Cam ve SPR Yüzeylerinin Modifikasyonu.....	34
3.6.2. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu	35
3.6.3. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler	36

3.6.4. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri	37
3.6.5. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi ...	37
3.6.6. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi	37
3.6.7. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi.....	37
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	38
4.1. Fonksiyonel Monomerinin Karakterizasyonu	38
4.2. Uygun Ön-Kompleks Oranının Belirlenmesi.....	38
4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu	39
4.4. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu.....	42
4.5. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler	43
4.6. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi	48
4.7. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi	50
4.8. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri.....	51
4.9. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu	52
4.10. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler	55
4.11. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi	59
4.12. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi.....	61
4.13. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri	61
5. YORUM	66
6. KAYNAKLAR.....	70
EKLER	77
EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	77
EK 2 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	78
ÖZGEÇMİŞ	81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı [24].	9
Şekil 2.2. T4 bakteriyofajının litik yaşam döngüsü [26].	10
Şekil 2.3. Tipik bir biyosensörün şematik anlatımı.	12
Şekil 2.4. Moleküler baskılama yöntemi [60].	16
Şekil 2.5. Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısı.	22
Şekil 3.1. Fonksiyonel monomerin sentezi.	28
Şekil 3.2. Bakteriyofaj baskılanması ve SPR biyosensör uygulamasının şematik gösterimi.	31
Şekil 3.3. SPR biyosensörün altın yüzeyi (A) ve SPRImager®II sistemi (B).	32
Şekil 3.4. Cam yüzey modifikasyonu.	35
Şekil 3.5. SPR biyosensör yüzeyinde nanofilmin hazırlanması.	36
Şekil 4.1. Fonksiyonel monomerin FTIR spektrumu.	38
Şekil 4.2. Ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü.	39
Şekil 4.3. Bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin FTIR spektrumu.	40
Şekil 4.4. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin boyut analizi.	40
Şekil 4.5. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin TEM görüntüleri.	41
Şekil 4.6. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin SEM görüntüleri.	41
Şekil 4.7. Bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	41
Şekil 4.8. Bakteriyofaj baskılanmamış nanopartiküllerin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	42

Şekil 4.9. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	42
Şekil 4.10. Bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	43
Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş (A), bakteriyofaj baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR biyosensörlerin temas açısı ölçümleri.	43
Şekil 4.12. Farklı derişimlerdeki bakteriyofaj çözeltileri ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değerleri (A) ve SPR biyosensöre ait derişim ile kırılma değerleri arasındaki ilişki (B).	44
Şekil 4.13. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Scatchard (A) ve bağlanma (B) kinetik yaklaşımları.	46
Şekil 4.14. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon izoterm modelleri. Langmuir (A) ve Freundlich (B).	47
Şekil 4.15. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofajı baskılanmış SPR biyosensörün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.....	49
Şekil 4.16. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofajı baskılanmamış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.....	49
Şekil 4.17. T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile yarışmacı ajanların verdiği zamana karşı kırılma değerleri.	50
Şekil 4.18. Nanopartikül temelli SPR biyosensörün tekrarlanabilirliği.	51
Şekil 4.19. Gerçek örneklerden T4 bakteriyofaj tayini için hazırlanan SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı kırılma değerleri.	51
Şekil 4.20. Modifiye edilmemiş (A), edilmiş (B) ve baskılanmamış (C) ve baskılanmış (D) SPR biyosensörlerin temas açısı görüntüleri.	53
Şekil 4.21. Modifiye edilmiş SPR biyosensörün yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	53
Şekil 4.22. Baskılanmamış SPR biyosensör yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	54

Şekil 4.23. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).....	54
Şekil 4.24. Bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).	54
Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki bakteriyofaj çözeltileri ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değeri (A) ve bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensöre ait derişim ile kırılma değeri arasındaki ilişki (B).	55
Şekil 4.26. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Scatchard (A) ve bağlanma (B) kinetik yaklaşımları.....	57
Şekil 4.27. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon izoterm modelleri. Langmuir (A) ve Freundlich (B).	58
Şekil 4.28. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değeri.	60
Şekil 4.29. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değeri.	60
Şekil 4.30. T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile yarışmacı ajanların verdiği zamana karşı kırılma değeri.	60
Şekil 4.31. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün tekrarlanabilirliği.....	61
Şekil 4.32. Gerçek örneklerden T4 bakteriyofaj tayini için hazırlanan SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı kırılma değeri..	62

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Fekal indikatör mikroorganizmalar ve özellikleri.....	4
Çizelge 2.2. Rekreasyon amacıyla kullanılan kıyı ve deniz sularının sağlanması gereken standart değerler.	7
Çizelge 2.3. Doğal biyomoleküllerin ve moleküler baskılanmış polimerlerin karşılaştırılması.	17
Çizelge 3.1. Ön-kompleks hazırlama oranları.....	29
Çizelge 4.1. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitleri.	45
Çizelge 4.2. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için Langmuir ve Freundlich parametreleri.....	47
Çizelge 4.3. T4 bakteriyofajına göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik (k) ve bağlı seçicilik (k') katsayıları.	50
Çizelge 4.4. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitleri.	56
Çizelge 4.5. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için Langmuir ve Freundlich parametreleri.....	58
Çizelge 4.6. T4 bakteriyofaja göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik (k) ve bağlı seçicilik (k') katsayıları.	59
Çizelge 4.7. Nanopartikül ve nanofilm temelli SPR biyosensörlerin literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslanması.....	65

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

ΔR_{maks}	: Maksimum SPR sinyal kayması
ΔR_{denge}	: Denge halindeki SPR sinyal kayması
[C]	: Analit derişimi (pfu/mL)
k_a	: Bağlanma hız sabiti ($\text{pfu/mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$).
k_d	: Ayrılma hız sabiti ($1/\text{s}$)
K_A	: Bağlanma denge sabiti (mL/pfu)
K_D	: Ayrılma denge sabiti (pfu/mL)
$1/n$	: Freundlich yüzey heterojenite indeksi
pfu	: Plaque forming unit (plak oluşturan birim)
pfu/mL	: Mililitrede plak oluşturan birim
mL	: Mililitre
nm	: Nanometre
°C	: Santigrat derece

Kısaltmalar

EMS	: En muhtemel sayı
Soc	: Small outer capsid protein (Küçük dış kapsit proteini)
Hoc	: Highly immunogenic outer capsid protein (Yüksek immunojenik dış kapsit proteini)
PZR	: Polimeraz Zincir Reaksiyonu
ELISA	: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
AFM	: Atomic Force Microscope (Atomik Kuvvet Mikroskobu)

IUPAC : International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)

FET : Field Effect Transistor (Alan Etkili Transistör)

ISFET : Ion-sensitive field-effect transistor (İyon Duyarlı Alan Etkili Transistör)

SPR : Surface Plasmon Resonance

MAH : N-metakriloil-L-histidin metil ester

LB : Luria Bertani besiyeri

ATCC : American Type Culture Collection

PEG : Poli etilen glikol

FTIR : Fouirer Transform Infrared Spectrophotometer (Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi)

NMR : Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)

SEM : Scanning Electron Microscope (Taramalı Elektron Mikroskobu)

TEM : Transmission Electron Microscope (Geçirimli Elektron Mikroskobu)

APTES : 3-Triethoxysilylpropylamine

EGDMA : Etilen glikol dimetakrilat

AIBN : Azobisisobutyronitrile

SRC : Sülfid Redükleyen *Clostridium*'lar

H₂S : Hidrojen sülfür

1. GİRİŞ

Gelişmekte olan birçok ülkede temiz içme suyuna ulaşmakta yaşanan problemler son yıllarda daha da artmaya başlamıştır. Ekonomik durum ve yeterli alt yapının olmaması, nüfusun büyük bir kısmının, kontamine olmuş ve arıtılmamış yüzey ve yeraltı sularına maruz kalmasına neden olmaktadır [1]. Bir şehirde, özellikle yerleşim bölgelerinin yakınlarında akan suların kalitesinin yönetimi, o bölgede yaşayan insanlar için daha yüksek çevre kalitesinin gereksinimi olması sebebiyle önemlidir. Bununla birlikte, yüzey sularının ve yeraltı sularının işlenmemiş gübre ve kanalizasyon ile kirlenmesi ciddi bir çevre sorunu olmaya devam etmektedir [2].

Gıda, su güvenliği, halk sağlığı ve biyoterörizm alanlarında, patojen mikroorganizmaların tespiti, öncelikli bir ilgi konusu haline gelmiştir [3]. Özellikle içme suları gibi insanların çeşitli günlük ve temel amaçlarla kullandıkları sularda patojen mikroorganizmaların taşınmasıyla fekal kaynaklı meydana gelen kirlilikler önemli bir sorun teşkil etmektedir.

Sularda patojen mikroorganizmaların bulunması salgın riskini de beraberinde getirmektedir. Bu yüzden tespit edilmeleri önem arz etmektedir. Çeşitli fekal indikatör mikroorganizmalar kirlilik tespiti için kullanılmaktadırlar [4]. Bunlardan birisi de *Escherichia coli* (*E.coli*)'yi enfekte eden T4 bakteriyofajıdır. İndikatör bakteriler patojen değildir ancak virüsler gibi patojen mikroorganizmaların bulunması muhtemel olan insan kaynaklı atıklarda bol miktarda bulunurlar [5].

Mikroorganizma tespiti için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerin çoğu zaman alıcı olmalarının yanı sıra fazla emek istemektedir. Ayrıca donanımlı ekipman ve kişiye de ihtiyaç vardır. Bu yüzden bir alternatif olarak hızlı, hassas ve düşük maliyetli yöntemlere ihtiyaç duyulmakta, bu noktada da sensörler dikkat çekmektedir. Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanını fiziksel bir dönüştürücü ile birleştirip, ölçülebilir bir sinyal oluşturan analitik cihazlardır. Biyosensör sistemlerinde, tanıma elemanı hedef moleküle karşı bir cevap oluşturur ve bir dönüştürücü bu cevabı ölçülebilir bir sinyal haline getirir [6].

Oldukça yaygın ve birçok disiplinde kullanılan sensör çeşitlerinden biri de yüzey plazmon rezonans biyosensörlerdir. Bu sensörler, gümüş ya da altın bir yüzeyde hedef molekülü tanıyacak spesifik bölgeler oluşturulur. Ayrıca uygulamalarındaki kolaylık, düşük maliyet, etiketlemeye gerek duymama ve gerçek zamanlı ölçüm alabilme

imkanlarının yanı sıra yüksek seçicilik göstermeleri bu sensörlerin en önemli özelliklerindendir [7]. SPR temelli optik biyosensörler, etiketlemeye gerek duyulmadan moleküller arasındaki etkileşimleri ölçebilmektedirler. Etkileşimlerin anlaşılabilmesi amacıyla kullanılabilmesi açısından, bu cihazlar son yıllarda önem kazanmışlardır. Etkileşimlerin doğrudan ve eş zamanlı olarak ölçülmesi aynı zamanda kinetik ve termodinamik parametreler ile moleküllerin derişimlerinin belirlenebilmesini sağlamaktadır. SPR temelli biyosensörlerin kısa sürelerde yüksek seçiciliklerde cevap oluşturabilmektedirler. Enzim ya da radyoaktif maddelerle işaretleme gibi yöntemler ile SPR temelli biyosensörler karşılaştırıldığında avantajları sayesinde protein-protein, reseptör-ligand ve antikor-antijen etkileşimlerin anlaşılmasında kullanılabilirler [8].

SPR biyosensörlerin hazırlanmasında kullanılan yöntemlerden birisi ise moleküler baskılama yöntemidir. Moleküler baskılama yönteminde hedef bir kalıp molekül etrafında gerçekleşen polimerizasyonla spesifik tanıma ve katalitik bölgelere sahip olan polimer matriksler elde edilir. Molekül polimerden uzaklaştırıldığında ise hedefe özgül boşluklar oluşur [9]. Oluşturulan bu boşluklar kalıp molekülün şeklini ve boyutunu tanıyabilmektedirler.

Yapılan tez çalışmasında, önemli bir halk sağlığı problemi olan yüzey ve içme sularında *E.coli* bakteriyofajlarından ve fekal indikatör mikroorganizmalardan biri olan T4 bakteriyofajı tespitine yönelik iki farklı SPR biyosensör geliştirilmesi ve bu biyosensörlerin sularda fekal kirlilik tespitine yönelik etkinliklerinin karşılaştırılarak, verimli bir alternatif oluşturulması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fekal Su Kirliliği

Tatlı sular ve deniz suyunun da dahil olduğu yüzey suları; içme suyu ve besin kaynağı, birçok organizma için yaşam alanı olmalarının yanı sıra rekreasyon alanı olarak da kullanılmaktadır. Bu ortamlar; akıntı, hayvan dışkısı ve atık su deşarjlarından dolayı oluşabilecek olan mikrobiyal kirlenmeye karşı hassastırlar [10].

Nehir, göl, akarsu ve plaj gibi rekreasyon sularının mikrobiyal kirlenmesi, işlenmiş veya işlenmemiş dışkı maddelerini su yollarına taşıyan çeşitli giriş kaynaklarından meydana gelmektedir. Atık su arıtma tesislerinden atık su deşarjı veya yerel hayvan üretim tesislerinden sızma gibi noktasal dışkı kirlenme kaynakları; tanımlanması, karakterize edilmesi ve hafifletilmesi nispeten daha kolay kirlenmelerdir. Aksine, yağmur suyu akması gibi nokta dışı kontaminasyon kaynaklarının belirlenmesi kaynaklardan gelen kirlenmenin çok uzak mesafelere taşınma ihtimali olabileceğinden ötürü daha zordur [11].

Su kaynaklarının dışkı kaynaklı mikrobiyal kirlenmesi, hem sanayileşmiş hem de gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı için önemli bir tehdittir. Dünya Sağlık Örgütü'ne göre, dünya nüfusunun %9'u güvenli içme suyuna erişememektedir. Bu nedenle içme suyu kalitesinin ve şartlarının sağlığa uygun olarak iyileştirilmesi önemli gerekliliklerden biri haline gelmiştir [12].

2.2. Fekal Su Kirliliği Tespit Yöntemleri

Fekal kirliliğinin kökeninin araştırılması, bununla ilişkili oluşabilecek olan sağlık risklerini çözmek için gerekli olan eylemleri değerlendirmede çok önemli bir nokta teşkil etmektedir. Bu kirliliğin kökeninin genotipik ve fenotipik olarak izlenebileceği kavramı mikrobiyal kaynak takibi olarak adlandırılmıştır [2].

Fekal kaynakların karakterizasyonu, su kirliliğine sebep olan başlıca kirleticileri kontrol etmek için gereklidir. Bu durum, insan ve insan dışı dışkı kaynakları arasında ayırım yapılmasına yardımcı olan çeşitli kimyasal ve mikrobiyal belirteçlerin tanımlanmasına yol açmıştır [13].

Suların insan kaynaklı fekal kontaminasyonu büyük bir sağlık ve çevre tehdidi oluşturduğundan, su kalitesinin dikkatli bir şekilde izlenmesi gerekmektedir. Fekal indikatör bakterilerin miktarını ve varlığını belirlemek amacıyla uygulanan kültürasyona

dayalı çeşitli yöntemler uzun zamandan beri kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler yavaş sonuç vermesinin yanı sıra kaynağı tanımlamak için gerekli olan teşhis bilgileri bazı durumlarda yetersiz kalmaktadır [14].

Bu nedenle, su kaynaklı patojenlerin bulaşmasını önlemek ve araştırmak amacıyla sulardaki potansiyel dışkı girdilerinin izlenmesi için uygulanabilen mikrobiyolojik su kalitesi değerlendirmesi alanında daha hızlı test yöntemlerine ihtiyaç vardır [12].

2.3. Fekal İndikatör Mikroorganizmalar

Sularda gerçekleşen dışkı kaynaklı kirliliği tespit etmek amacıyla indikatör mikroorganizmalardan yararlanılmaktadır. Bu yaklaşım, koliform göstergelerinin konsantrasyonu ile patojenlerden kaynaklanan potansiyel sağlık riskleri arasında ölçülebilir bir ilişki olduğu varsayımına dayanmaktadır [15]. Çizelge 2.1’de fekal indikatör olarak gösterilen mikroorganizmalar ve bunların özellikleri özetlenmiştir [4].

Çizelge 2.1. Fekal indikatör mikroorganizmalar ve özellikleri.

Fekal İndikatör Mikroorganizmalar	Özellikleri
Koliformlar	Gram negatif, spor oluşturmeyen, oksidaz negatif, kokobasil şeklinde, laktozu β -galaktosidaz enzimi ile 24-48 saat içerisinde $36\pm 2^{\circ}\text{C}$ ’de fermente edip asit ve gaz oluşumu sağlayan bakterilerdir.
Termotolerant koliformlar	Laktozdan 24 ± 2 saat içerisinde, $44.5\pm 0.2^{\circ}\text{C}$ ’de asit ve gaz üreten, ayrıca fekal koliformlar olarak bilinen bakterilerdir. <i>E. coli</i>: Triptofandan indol üretebilen ve β -glukuronidaz enzimine sahip olan termofilik koliformlardır. Sıcak kanlı hayvanlardan kaynaklanan dışkı kirliliğini göstermek için en uygun koliform grubudur.

Fekal Streptokoklar	Lancefield grup D antijenine sahip olan <i>Enterococcus</i> ve <i>Streptococcus</i> cinsine ait, safra eskülin agarda ve 45°C'de azid dekstroza ya da Enterococcus agar gibi seçici besiyerlerinde üreyebilen Gram pozitif, katalaz negatif koklardır.
Enterokoklar	pH 9.6, 10°C ve 45°C 'de, %6.5 NaCl içeren ortamlarda üreyebilen tüm fekal Streptokoklardır. Alternatif olarak, Enterokoklar, 44±0.5°C'de aerobik üreme yeteneğine sahip ve belirtilen ortamda talyum asetat, nalidiksik asit ve 2,3,5-trifeniltetrazolyum klorür olduğu takdirde 4-metlumbelliferil-β-D-glukozit hidrolize eden mikroorganizmalar olarak tanımlanabilir.
Sülfid redükleyen <i>Clostridium</i> 'lar (SRC)	Gram-pozitif, spor oluşturan, hareketli olmayan, zorunlu anaerobik ve sülfidi H ₂ S'e redükleyen basillerdir.
<i>Clostridium perfringens</i>	Laktoz, sukroz ve inositolü fermente eden ve gaz oluşturan, nitrat redükleyebilen, jelatin hidrolizi yapan mikroorganizmalardır. Bonde (1963), bütün SRC'lerin dışkı kirliliğinin bir göstergesi olmadığını, dolayısıyla <i>C. perfringens</i> 'in uygun gösterge olduğunu öne sürmüştür.
Kolifajlar	<i>E. coli</i> türlerine hücre duvarı üzerinden saldıran somatik, sferik ve kuyruklu fajları içermektedir.

Bakteriyofajlar	Bakterileri enfekte eden virüslerdir ve çevrede çoğu ortamda bulunmaktadırlar. Su kalitesi kontrolü ve insan enterik virüslerini modellemek için, somatik kolifajlara, <i>Bacteroides fragilis</i> 'i enfekte eden fajlara en çok ilgi duyulmaktadır.
Bifidobakteriler	Zorunlu anaerobik, asit üretmeyen, spor oluşturmeyen, hareketsiz, yüksek derecede pleomorfik olan Gram-pozitif basillerdir. <i>B. asteroides</i> , <i>B. indicum</i> ve <i>B. coryneforme</i> hariç hepsi katalaz negatiftir ve laktozu fermente edebilirler. Sıcakkanlı hayvanların dışkısında en çok sayıda bulunan bakteri gruplarından biridir.
<i>B. fragilis</i> bakteriyofajları	Bağırsakta en bol bulunan bakterilerden birini enfekte eden, esnek kuyruklu Siphoviridae familyasına ait fajlardır. <i>B. fragilis</i> HSP40'ı enfekte eden fajlar insana özgüyken, <i>B. fragilis</i> RYC2056'yı enfekte eden fajlar daha çeşitlidir ve insana özgü değildirler.

Su kirliliği kontrol yönetmeliğine göre mikroorganizmalar için sularda bulunması gereken standart değerler ise Çizelge 2.2'de verilmiştir [16].

Çizelge 2.2 Rekreyasyon amacıyla kullanılan kıyı ve deniz sularının sağlaması gereken standart değerler.

Parametre	Standart
Toplam koliform (EMS/100 mL)	1000
Fekal Streptokoklar (EMS/100 mL)	100
Enterovirus (pfu/10 L)	0
Fekal koliform (EMS/100 mL)	200

Bakteriyel göstergeler, sudaki ve gıdadaki dışkı kirliliği seviyelerini belirlemek için kullanılır; bununla birlikte, virüsler ve protozoalar gibi diğer mikrobiyolojik grupların kontrol edilmesi ve viral kontaminasyonların değerlendirilmesi için alternatif göstergeler gerektirmektedir [17].

İndikatör mikroorganizmalar patojen değildir ancak patojen mikroorganizmaların bulunması muhtemel olan insan kaynaklı atıklarda bol miktarda bulunmaktadır [5]. Bakteriyel sistemleri iyi bir şekilde karakterize edildiği için, *E.coli* üzerindeki çalışmalar son zamanlarda oldukça ilgi kazanmış durumdadır [1].

1980'lerden bu yana viral indikatör organizmalar olarak araştırılan kolifajlar, suda özellikle enterik virüslerin takibi için uygun mikroorganizmalardır [15]. Kanalizasyon suyunun 100 mL'sinde 10.000-100.000 pfu derişiminde bulunmaktadırlar. *E.coli*'yi enfekte eden bakteriyofajlardan olan somatik ve F-spesifik kolifajlar uzun yıllardır fekal ve viral kontaminasyonu belirleyici mikroorganizmalar olarak kullanılmaktadırlar [5]. Son yıllarda çalışmalar, su kaynaklı hastalığın önemli etiyolojik ajanları ve konakçıya özgü oldukları için ilgi çekici olmaya başlayan kolifajlar gibi virüslere odaklanmıştır [18]. Somatik kolifajlar, *E.coli*'yi enfekte eden virüslerdir ve fekal kaynaklı kirlenmenin varlığının çok iyi bir göstergesidir, çünkü sadece dışkı bakterilerini enfekte edebilmektedirler. Bu nedenle, kolifajların tespiti sudaki hem bakteriyel hem de viral kontaminasyon seviyelerinin bir göstergesini vermektedir [19].

İnsan enterik virüsleri, genel su kaynaklarına kontamine su atıklarından girmektedirler. Virüsler kanalizasyon sularında yaygın olarak bulunabilmektedir, çünkü enfekte olmuş

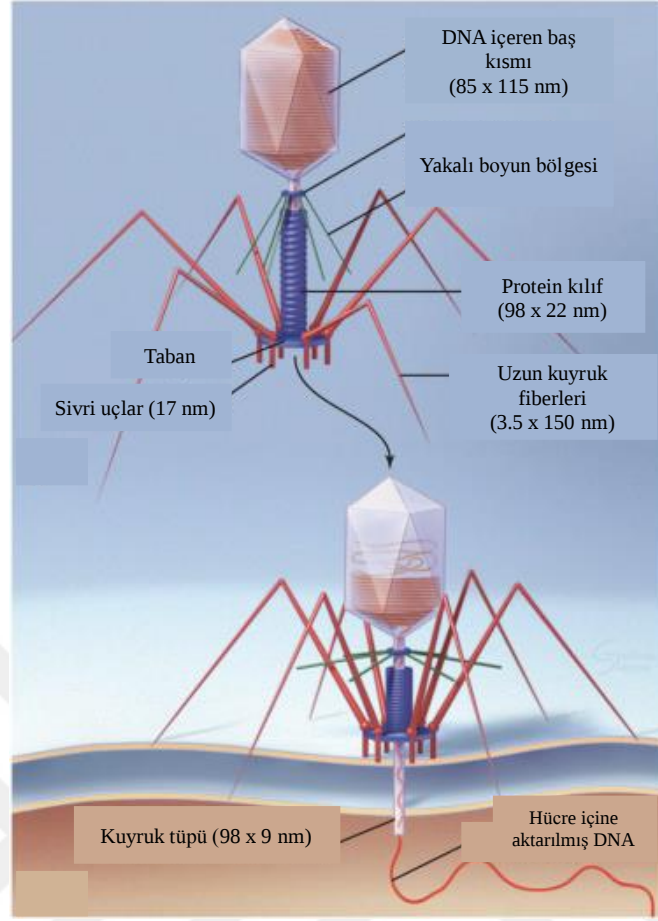
kişiler virüsleri büyük miktarlarda dışarı atmaktadırlar. Bu virüslerle enfekte olan insanlarda, dışkı gramı başına 10^5 ila 10^{11} virüs bulunabilmektedir [20].

Bunların yanı sıra, biyoteknolojik ve biyofarmasötik proseslerde, bakteriyofajların hızlı ve hassas tespiti önemlidir. Genetik materyalin bakteriyofaj aracılı transferi, antibiyotik direncinin yayılmasında önem teşkil etmektedir. Çünkü bakteriyofajların metagenom çalışmaları popülasyonda antibiyotik direnç genlerinin varlığını ortaya çıkarmıştır [21].

2.3.1. T4 Bakteriyofajı ve Yapısı

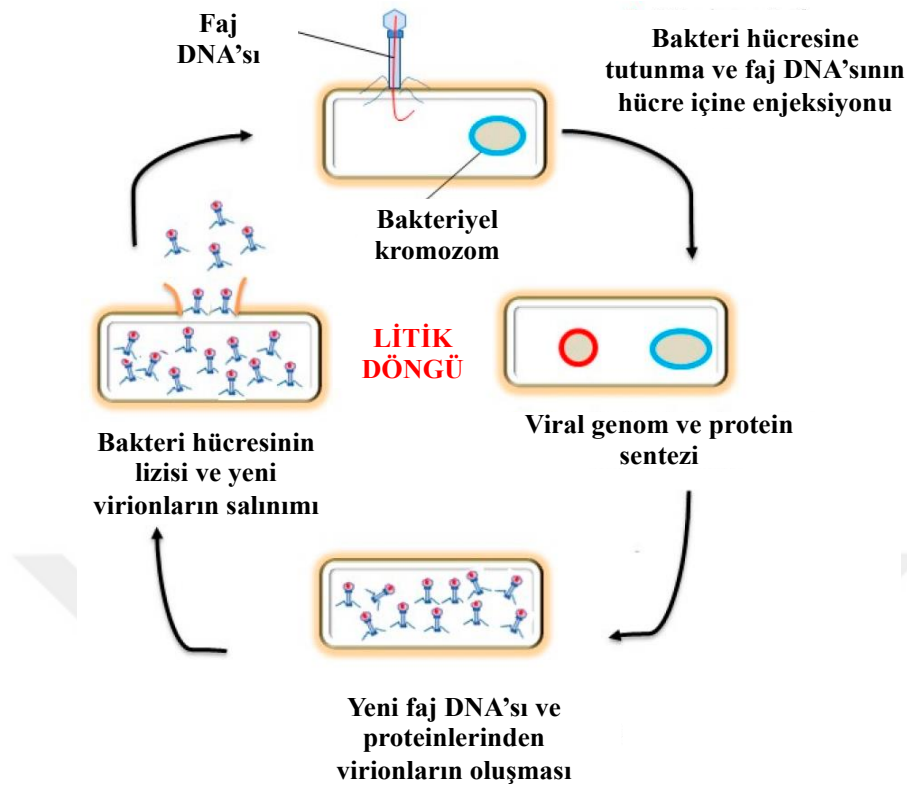
Bakteriyofajlar veya fajlar bakterileri enfekte eden virüslerdir. En az bir nükleik asit molekülü olan genom, kapsid denilen bir protein kılıf ile çevrilidir. Birçok bakteriyofaj ayrıca kuyruklar ve sivri uçlar gibi ek yapılar da içermektedir [12]. Genel olarak, bakteriyofajlar spesifik olarak konak bakteri reseptörüne bağlanma yeteneği sergiler. Bu nedenle, spesifik bir tür zarar görürken diğer bakteri türleri bu fajdan etkilenmemektedir. Konakçı bakteriye bağlandıktan sonra, faj hücre içindeki genetik malzemesini enjekte eder ve replikasyon için konak hücreyi kullanır [22]

Bakteriyofaj T4, 1944' te Delbruck ve arkadaşları tarafından faj çalışmaları için model olması önerilen 19 *E.coli* fajından biridir [23]. T4 bakteriyofajının ayrıntılı yapısı Şekil 2.1'de gösterilmektedir. Olgun faj, genomu içine alan 115 nm uzunluğunda ve 85 nm genişliğinde bir kafa yapısına sahiptir. Başın bir ucunda bulunan özel bir tepe noktasına 92 nm uzunluğunda ve 24 nm çapında kasılmalı kuyruk eklenmiştir. Kasılma kuyruğunun uzak ucuna 27 nm yüksekliğinde ve 52 nm çapında altıgen bir taban plakası bulunmaktadır. Altıgen taban plakasının çevresine altı adet 150 nm uzunluğunda uzun kuyruk fiberleri bağlanmıştır [23].



Şekil 2.1. T4 bakteriyofajının yapısı [24].

Şekil 2.2’de bir T4 bakteriyofajının litik döngüsü özetlenmektedir. Şekilde de görüldüğü gibi Myoviridae familyasının bir üyesi olan T4 bakteriyofajı serbest durumdayken, uzun kuyruk fiberleri, kuyruğa, boyuna ve baş alanlarına karşı yukarı doğru katlanır, ancak, enfeksiyon için uygun koşullar oluştuğunda, bir uzun kuyruk fiberi, konak hücre reseptör bölgesine bağlanmak üzere boyun bölgesinden tekrar açılır. Üç veya daha fazla kuyruk fiberinin konakçıya bağlanması durumunda, karşılaşılan hücrenin uygun bir replikasyon konakçısı olma durumu çok muhtemeldir. Taban plakası daha sonra konformasyonunu altıgendan yıldıza değiştirir ve kısa kuyruk lifleri uzayarak, karboksi terminal uçlarını konakçının lipopolisakkarit tabakasının çekirdek bölgesine sıkıca bağlanmak için serbest bırakır. Dış kuyruk kılıfı büzülerek iç kuyruk tüpünü bakteri dış zarından ve periplazmadan geçirir ve iç tüpün ucunun bakteri iç zarıyla etkileşime girmesine izin verir. Bakteriyofaj DNA’sı daha sonra bakteriyel sitoplazmaya enjekte edilir, periplazmik nükleazlardan korunur ve yeni faj partiküllerinin sentezini yönlendirmek için kullanılır [25].



Şekil 2.2. T4 bakteriyofajının litik yaşam döngüsü [26].

Olgun bir virüs, yalnızca taban plakasını ve kuyruğunu değil, baş, kapsid, boyun gibi diğer yapısal bileşenleri de içeren 40'tan fazla polipeptitten oluşmaktadır. Bakteriyofajın çift sarmallı DNA'sı, esas olarak bir ana kapsid proteini, pentamerik verteks proteini, bir bağlayıcı protein ve iki yardımcı protein içeren bir protein kabuğu olan kapsid içinde kapsülendir. T4 bakteriyofajının sahip olduğu iki ana proteinden olan Soc proteini (small outer capsid protein) C-terminali ve Hoc proteini (highly immunogenic outer capsid protein) N-terminali olan negatif yüklü bağlanma bölgelerine sahiptir [27].

2.4. Bakteriyofaj Tayininde Kullanılan Yöntemler

Bakteriyofajların tespiti ve miktar tayini için yöntemler, 1917'de Felix d'Herelle tarafından keşfedilmesinden bu yana kullanılmaktadır [28]. Çift agar katmanında üreyen konakçı bakteri ve oluşan lizis plaklarının varlığına dayanan bu yöntemler, 1959'da Mark Adams tarafından ayrıntılı olarak tarif edilmiş [29] ve şimdiye kadar virüs miktarını ölçmek için kullanılmıştır [30]. Bu, algılanacak olan bakteriyofajı ve konakçı suşunu içeren yarı katı bir agar tabakasının önceden hazırlanmış agar plakları üzerinde

çalışılmasına dayanan bir yöntemdir. Uygun bir inkübasyon süresinden sonra görüntülenen lizis bölgelerinin miktarının belirlenmesi, orijinal numunede bulunan bakteriyofajların sayısını göstermektedir [19].

Şu anda, virüsleri ve virion parçacıklarını incelemek için çok sayıda mevcut araştırma yöntemleri bulunmaktadır. Bunların teşhisi için kullanılan yöntemler aşağıdaki gruplara ayrılabilir:

- Virüs partiküllerinin test numunelerinde tespit edilmesi (derişimlerinin belirlenmesi, büyüklükleri ve diğer fiziksel-kimyasal özelliklerinin belirlenmesi) veya virüs enfektivitesinin belirlenmesi (virolojik çalışma);
- Viral antijenlerin test numunelerinde doğrudan tespit edilmesi (immüno-gösterge);
- Viral nükleik asitlerin test örneklerinde moleküler yöntemler ile tespiti [31].

Bakteriyofaj tespiti için en yaygın kullanılan biyolojik analiz, zahmetli ve zaman alıcı çift tabaka agar yöntemidir [21]. Tipik olarak kullanılan diğer teknikler arasında, daha hızlı ve çoğu durumda hassas olan, ancak pahalı ekipman gerektiren ve sınırlı uygulanabilirliği olan polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ve türevleri [32,33] ve enzim bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) [34] bulunmaktadır [35]. Atomik Kuvvet Mikroskobu (AFM) [36], interferometri [37], elektrokimyasal yöntemler [38] ve immonolojik testler [39] gibi bakteriyofajlar da dahil olmak üzere virüsleri tespit etmek için yeni yöntemler geliştirilmeye devam etmektedir. Floresan tekniği, elektrokimyasal ışıltama ve immünosorbent deneyleri gibi etiketleme yöntemleri zaman zaman yanlış pozitifler veya yüksek oranda yanlış negatifler ile sonuçlanmaktadır [36].

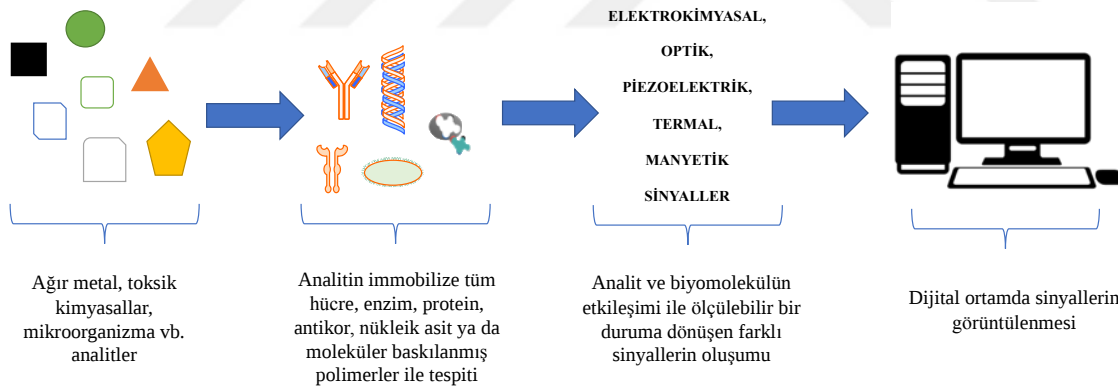
Bu bağlamda, sadece tespit için değil, aynı zamanda kısa sürede otomatik olarak doğru sonuçlar verecek virüs partiküllerinin tanımlanması için yeni yöntemlerin geliştirilmesi çözülmesi gereken bir sorundur [40].

Biyosensörleri kullanarak bakteriyofajların hızlı tespit yöntemleri son yıllarda ilgi çekmektedir [31]. Son zamanlarda, düşük maliyetli üretim kabiliyetleri, minyatürleştirme olanakları, gerçek zamanlı ölçümler ve antikorlar, nükleik asitler, peptitler, tüm hücreler gibi farklı biyo-tanım elementlerinin geniş mevcudiyeti nedeniyle, biyosensörlerin geliştirilmesine odaklanmış birçok çalışma yapılmıştır [35].

2.5. Biyosensörler

“Sensör” kelimesinin kökeni “bir şey tanımlamak” anlamına gelen Latince “sentire” kelimesinden gelmektedir [41]. Biyosensörler, genellikle belirli elementleri tespit etmek veya tanımak için kullanılan analitik araçlardır. İlk biyosensör 1962'de Clark [42] tarafından geliştirildiğinden ve sahip olduğu potansiyel fark edildiğinden beri, biyosensörler ile çalışmalar pek çok durumda ve farklı alanlarda yaygınlaşmıştır [43]. “Biyosensör” terimi Cammann tarafından belirlenmiş [44] ve tanımı IUPAC tarafından tanıtılmıştır [45].

Biyosensörler, biyolojik tanıma elemanını fiziksel bir dönüştürücü ile birleştirip, ölçülebilir bir sinyal oluşturan analitik cihazlardır (Şekil 2.3). Kofaktörler, enzimler, antikorlar, mikroorganizmalar, organeller, dokular ya da yüksek yapıli organizmalardan elde edilen hücreler biyolojik tanıma elemanları olabilirler. Biyosensör sistemlerinde, tanıma elemanı hedef moleküle karşı bir cevap oluşturur ve bir dönüştürücü bu cevabı ölçülebilir bir sinyal haline getirir. Bu sinyaller ise elektrokimyasal, optik, piezoelektrik, termal ve manyetik şekilde ölçülmektedir [6].



Şekil 2.3. Tipik bir biyosensörün şematik anlatımı.

Biyosensörlerde kullanılan tespit teknikleri, etiketsiz ve etiket tabanlı teknikler olarak sınıflandırılabilir. Etiket tabanlı teknikler, diğer malzemelerin arka planındaki belirli bir analiti tespit etmek için bazı etiketleyici maddeleri kullanır. Floresans, kemilüminesans ve radyoaktif maddeler, biyosensörlerde belirli bir hedefi tespit etmek için kullanılan üç popüler etiket tabanlı tekniktir [46].

Etiketsiz teknik, ligandın veya reseptörün etiketlenmesini gerektirmeyen ve herhangi bir kompleksin minimal test yöntemleri ile taranmasına izin verebilecek, yeni tekniklerin farkındalığını artıran bir diğer yöntemdir. Etiketsiz deneyler, biyolojik olarak aktif moleküler etkileşimler ve hücrel tepkiler için tarama yapabilmekte, seçicilik, afinite ve diğer birçok durum hakkında, aynı zamanda bağlayıcı kinetik ve termodinamik hakkında ayrıntılı bilgi verebilmektedir [46].

Biyosensörler, olağanüstü performans, kullanıcı dostu çalışma, hızlı cevap, yüksek hassasiyet ve özgüllük, taşınabilirlik, nispeten kompakt bir boyut ve gerçek zamanlı analiz gibi birçok özellik sunmaktadır [47]. Bunlara ek olarak biyosensörler, pH ve sıcaklık gibi fiziksel parametrelerden etkilenmemeli ve yeniden kullanılabilir olmalıdır [45].

2.5.1. Biyosensörlerin Sınıflandırılması

Biyosensörler, transdüksiyon konseptine göre şu şekilde sınıflandırılabilirler;

- Optik (fiber optik ve yüzey plazmon rezonans)
- Elektrokimyasal (empedans ve amperometrik)
- Piezoelektrik (kuvars kristal mikroterazi)
- Termal (termistör ve piroelektrik)
- İyon duyarlı (alan etkili transistör ve iyon duyarlı alan etkili transistörler)
- Rezonans (akustik dalga dönüştürücü)

Biyosensörlerin antikor, nükleik asit, aptamer veya enzim kullanıp kullanmadığı, yani tanıma bileşenlerine göre sınıflandırılması ise şu şekilde olmaktadır:

- İmmünosensörler (antikorlar ve antijen)
- Aptasensörler
- Genosensörler
- Enzimatik biyosensörler [48].

2.5.1.1. Optik Biyosensörler

Geleneksel optikler, kırınım sınırı nedeniyle nanometre-ölçekli yapıları çözme yetenekleriyle sınırlıdır. Bunun nedeni, alt-dalga boyu niteliği taşıyan, gözden kaybolan dalgaların, farklı bir geçirgenlik ortamından geçerken görüntü oluşturmadan

önce bozulmalarıdır. Bu sınırlamayı engellemek için, araştırmacılar alt-dalga boyu görüntüleme metotlarını geliştirmek adına çalışmaktadırlar. Plazmonik alanındaki gelişmeler, kaybolan zararı telafi ederek ve kırınım sınırının altındaki görüntüyü geri yükleyerek alt dalga boyu özelliklerinin tespitini sağlamaktadır [49].

Optik biyosensörler; analitlerin hassas tespiti için floresan, UV-görünür, Raman, SPR veya kemilüminesans sinyal varyasyonlarına dayanan, kolay, hızlı ve düşük maliyetli bir yaklaşım sunmaktadır. Genel olarak, bir optik biyosensör, bağlanma olayını bildirmek için kullanılan, istenen hedef ve dönüştürücü bileşenle özel olarak etkileşime girebilen bir tanıma ünitesi içermektedir [50].

Optik biyosensörler, analit ve tanıma elemanlarını içeren kompleks oluşturulduğunda, dönüştürücü yüzeyinin optik özelliklerinde bir değişimin ölçülmesi odaklı olarak çalışmaktadırlar. Bu biyosensörler iki gruba ayrılmaktadırlar: Direkt optik biyosensörler; dönüştürücü yüzeyi üzerinde bir kompleksin oluşumuna bağlı olarak sinyal üretirler. İndirekt optik biyosensörler ise çoğunlukla, bağlanma olaylarını tespit etmek ve sinyali yükseltmek adına floroforlar veya kromoforlar gibi çeşitli işaretleyicilerle tasarlanmıştır [47]. Çevresel veya biyomedikal uygulamalar basit, hızlı ve ultra hassas optik biyosensörlerin geliştirilmesini gerektirmektedir [51].

2.5.1.1.1.Yüzey Plazmon Rezonans Biyosensörler

Biyosensörler; kemilüminesans, floresans, ışık absorpsiyonu ve saçılımı, yansıma oranı ve yüzey plazmon rezonansı içeren ve iki işaret tabanlı ve işaretsiz olarak iki sınıfa ayrılabilen, çeşitli optik algılama yöntemlerini kullanmaktadırlar [52]. İlk olarak 1990'lı yılların başında tanıtıldığından bu yana, SPR'nin protein-protein, protein-DNA, enzim-substrat veya inhibitör, reseptör-ilaç, lipid membran-protein, protein-polisakkarit, hücre veya virüs-protein, dahil olmak üzere birçok bağ tipindeki makromoleküllere bağlanması sırasında özgüllüğü, afinitesi ve kinetik parametreleri belirlemek için en güçlü teknolojilerden biri olduğu kanıtlanmıştır [53].

SPR biyosensörler, ortamın kırılma indisindeki değişikliklerini, algılama yüzeylerinde ölçebilen optik refraktometrelerdir [54]. Bu optik sistemin ana bileşenleri, bir uyarma ışık kaynağı, bir prizma ve prizma veya cam üzerine kaplanmış metalik bir filminden (~ 50 nm) oluşmaktadır. Bir polarizasyon ışığı, optik olarak daha yoğun bir ortamdan (camdan) optik olarak daha ince bir ortama (gaz veya su) yansıtıldığında, ışık açısı kritik bir değeri aşan toplam yansıma meydana gelir. Gelen ışık, dalga boyunun yaklaşık yarısı kadar

derinliği ile daha ince ortama nşfuz eden daha sonra ortaya çıkan bir dalga şretir ve daha sonra yoğun ortama geri dşner. Cam katman ve su katmanı arasında ince bir metalik film bulunduğunda, metal yşzeydeki serbest elektronlar metal ışık yşzeyine paralel olarak yayılan yşzey plazmon dalgasını oluşturmak için gelen ışık tarafından uyarılabilmektedirler. Meydana gelen dalga, toplam yansıma koşulunu değiştirip zayıflatılmış bir toplam yansıma meydana getirdiğinde, yşzey plazmon dalgası ile birleşir ve yşzey plazmon rezonansı şretilmiş olur. Sonuç olarak, yansıtılan ışık enerjisi, gelen enerjinin yşzey plazmonuna aktarılmasından dolayı çarpıcı biçimde azalır [55].

SPR biyosensşrler, ELISA ya da floresans temelli diğer ticari analiz yşntemlerine gşre aşağıdaki avantajlara sahiptir;

- Olşmler sırasında herhangi bir işaretleyiciye gerek duyulmaz.
- Olşmler, kırılma indisindeki değişimlere gşre yapıldığı için analit tayini doğrudan yapılır.
- Analitin saçılma bantı ya da işaretleyici gibi herhangi bir şzelliğe sahip olmasına gerek yoktur. Çok basamaklı tayin protokollerine gerek kalınmadan doğrudan olşm yapılır.
- Olşmler eş zamanlı yapılır. Kullanıcı bşylece kinetik ve termodinamik veriyi aynı anda elde edebilir.
- Çok amaçlı bir yşntemdir. Geniş molekşl ağrılıklarında ve bağlanma afinitesinde analit tayinine imkan vermektedir [56].

Genel olarak bir SPR analizi şu şekildedir: Tespit edilecek olan analite gşre uygun bir ligand fiziksel ya da kimyasal olarak sensşr yşzeyine tutturulur. Analit ise, bir şzelti içerisinde hazırlanan bu yşzeyden geçirilir. Analit ve ligand bir kompleks oluşturmak şzere etkileşime girdiğinde, sistem tarafından algılanabilecek bir cevap oluşur [56].

Biyosensşr yşzeyinde, tanıma elementi olarak kullanılabilecek olan malzemelerin sentezlenmesi için kullanılan yşntemlerden birisi de molekşler baskılama yşntemidir.

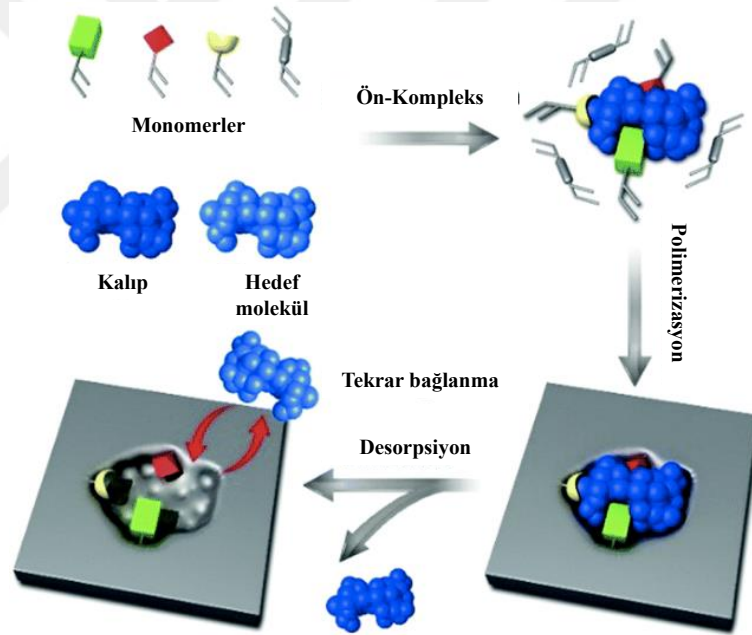
2.6. Molekşler Baskılama Yşntemi

Molekşler baskılama yşntemi, oldukça spesifik polimerik malzemelerin yaratılması için geliştirilen çok boyutlu yaklaşımlardan biridir [57]. Molekşler baskılama, molekşler bir kalıp kullanarak makromolekşler bir matriksteki tanıma alanlarını yaratan bir

teknolojidir. Başka bir ifadeyle, hem hedefin şekil görüntüsü hem de hedefte olanlarla etkileşime girecek fonksiyonel grupların hizalanması, polimerik malzemelerin kendi oluşumu sırasında hedefin tanınması veya ayrılması için makromoleküler matriks içinde saklanır [58].

Moleküler baskılama yönteminde özet olarak aşağıdaki basamaklar izlenir;

1. Polimerin işlevsel grubuna kovalent veya kovalent olmayan şekilde bağlanmış, kalıp veya hedef molekülü içeren bir polimer üretilir.
2. Kalıp molekül polimerden çıkarılır, böylece yeniden bağlanma için hedefe özel bir boşluk bırakılmış olur.
3. Moleküler baskılanmış polimer hedef analiti içeren örneklerle muamele edilir ve kompleks bir örneğin içerisinde, hedef molekül seçici bir şekilde oluşturulan boşluğa bağlanır [59].



Şekil 2.4. Moleküler baskılama yöntemi [60].

Genellikle moleküler baskılanmış polimerler hazırlamak için hedef analit ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent ve kovalent olmayan etkileşimlere dayanan iki ana yöntem kullanılır. Stokiyometrik olan kovalent baskılama, fonksiyonel monomerin kalıntılarının sadece baskılanmış boşluklarda mevcut olmasını sağlar. Kovalent olmayan baskılama, iyonik etkileşimler, van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve π - π etkileşimlerine

dayanmaktadır. En yaygın olan etkileşim, metakrilik asit grupları ve polar olmayan çözücülerdeki primer aminler arasında sıklıkla meydana gelen hidrojen bağlarıdır [61].

Moleküler baskılanmış polimerler, sentetik moleküler reseptörler yaratmada kullanılan çok yönlü, ölçeklenebilir ve uygun maliyetli bir yaklaşımdır. Aşağıda sıralanan avantajlı özellikleri, moleküler baskılanmış polimerlere artan ilgiye katkıda bulunmaktadır:

- Doğal reseptörlere benzeyen yüksek afinite ve seçicilikleri,
- Doğal biyomoleküller tarafından gösterilenden daha üstün olan gelişmiş kararlılıkları,
- Kolay hazırlanmaları,
- Tahliller ve biyosensörlerdeki pratik uygulamalara adaptasyon kolaylığı sağlayabilmeleri [62].

Genel olarak günümüzde kullanılan ayırma yöntemleri (kromatografi, kapiler elektroforez, katı-faz ekstraksiyonu ve membran ayırma vb.), immünojenik testler, antikor taklitleri, yapay enzimler, biyosensörler, kataliz, organik sentez, ilaç salınımı ve gelişimi gibi alanları kapsayan geniş bir uygulama aralığında kullanımları bulunmaktadır [60]. Moleküler baskılanmış polimerlerin doğal biyomoleküllere kıyasla avantajları Çizelge 2.3'te gösterilmektedir [63].

Çizelge 2.3. Doğal biyomoleküllerin ve moleküler baskılanmış polimerlerin karşılaştırılması.

Doğal Biyomoleküller	Moleküler Baskılanmış Polimerler
Kararlı değildirler.	Zorlu koşullarda bile yüksek kararlılık gösterirler.
Pahalıdırlar.	Uygun maliyetlidir.
Organik çözücüler içerisinde düşük performans gösterirler.	Organik çözücüler içerisinde yüksek performans gösterirler.

Operasyonel sistemlere ihtiyaç duyarlar.	Minimum düzeyde sisteme ihtiyaç duyarlar.
Sınırlı sayıda analit ile çalışılabilir.	Herhangi bir analit ile çalışılabilir.
Diğer teknolojiler ile düşük uyumluluğa sahiptir.	Diğer teknolojiler ile yüksek uyumluluğa sahiptir.

2.6.1.Moleküler Baskılama Teknolojisinde Kullanılan Yaklaşımlar

Polimer ve biyo-nanomalzeme temelli biyosensör platformları, elektriksel, katalitik, mekanik, termal ve fiziksel özellikleri nedeniyle hızlı cevap ve seçicilik ile gelişmiş hassasiyet sunmaktadırlar. Moleküler şekil tanıma malzemeleri ve tasarlanmış morfolojiye sahip polimerik yapılar dahil olmak üzere, polimerik nanomalzemelerin geliştirilmesine yönelik çalışmalar, gıda ve çevresel kirleticilerin algılanması açısından önem arz etmektedir [64].

Son zamanlarda, moleküler baskılama temelli nanoteknolojik malzemelerin geliştirilmesi, nanoyapılı baskılanmış polimerlerin, yığın polimerlerin aksine önemli ölçüde iyileştirilmiş özellikler göstermesiyle nedeniyle araştırmacılar tarafından ilgi çekmektedir [61]. Nanoyapılı polimerler, yığın polimerlere kıyasla daha yüksek yüzey alanı-hacim oranlarına sahiptirler ve çözelti içinde iyi dağıtılabilirler. Ayrıca hedef bağlanma bölgeleri, hedef analit tarafından daha kolay erişilebilir durumdadır [65].

Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken kullanılan yöntemler aşağıda kısaca özetlenmiştir.

2.6.1.1.Yığın Baskılama

Bu klasik moleküler baskılama işleminde, istenen reseptörler çoğunlukla toplu monolitler olarak elde edilir. Bu nedenle, moleküler olarak basılmış bu polimerler, genellikle öğütülür ve yeterli büyüklükteki partiküllere elenir ve daha sonra çeşitli amaçlar için kullanılır [65]. Yığın polimerizasyon, baskılanmış polimerleri elde etmek için kullanılan en yaygın yöntemlerden birisidir. Bu yöntemde; monomer, çapraz bağlayıcı, hedef analit ve radikal başlatıcı, başlangıçta porojen bir çözücü içerisinde çözündürülür [66].

Her ne kadar geleneksel yığın veya mikro boyutlu baskılamış polimerlerin hazırlanması kolay olsa da, yüksek çapraz bağlı yapıları ve düzensiz şekillerinden kaynaklanan çeşitli faktörler, yapay reseptör olarak uygulamalarını sınırlandırmaktadır. Yığın baskılamada karşılaşılabilecek dezavantajlar aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Hedef moleküllerin iç bağlama bölgelerinden çıkarılmasının zorluğu,
- Yeniden bağlama kapasitesinin, yüzey üzerinde/yakınında az sayıda bağlanma bölgesi ile sınırlı olması,
- Hedef moleküllerin, partiküllerin içindeki bağlayıcı bölgelere erişiminin engellenmesinin kolay olması [67].

2.6.1.2.Yüzey Baskılama

Yüzey baskılama yönteminde, bağlanma bölgeleri yığın polimerizasyonda olduğu gibi gözenekler içerisinde değil, ağırlıklı olarak malzeme yüzeyinde oluşturulur. Bu nedenle proteinler için bile erişilebilir olduğundan, biyomakromoleküler hedefler için umut verici bir yaklaşımdır [68].

Mikroorganizmaların büyük boyutlarından dolayı, yüzey baskılama yöntemi polimerlerin hazırlanması sırasında tercih edilmektedir. Bu durum, bu büyük boyuttaki hedef analitlerin baskılı oyuklardan etkili bir şekilde yayılmasını garanti edebilmektedir. Bugüne kadar, mikroorganizma baskılanması için litografik işlem, mikro-temas baskılama yöntemi, Pickering emülsiyonu, kolloidal baskılar gibi birçok tipik yüzey baskı stratejisi geliştirilmiştir [60].

Klasik moleküler baskılama ile aynı şekilde, hedef analitler, monomerler, çapraz bağlayıcılar ve eğer varsa, bir başlatıcı içeren bir çözücüde birleştirilir. Ko-polimerinin çapraz bağlanması sırasında, hedef analit kovalent veya kovalent olmayan etkileşimler yoluyla monomerlerle etkileşir. Hedefin polimerik yüzeyden uzaklaştırılması işleminden sonra, oluşan boşlukları hedefi özel olarak yeniden bağlayabilir [69].

Çapraz reaktivite, spesifik olmayan bağlanma, düşük seçicilik, bu yöntemin ana zorluklarındandır. Bu nedenle, yığın baskılama ve yüzey baskılama kavramlarını birleştiren epitop baskılama, makromoleküllere özellikle proteinlere karşı baskılanmış polimerleri hazırlamak için alternatif bir yöntemdir [70].

2.6.1.2.1.Mikro-temas Baskılama

Mikro-temas baskılama tekniğı, tanıma yüzeyleri ve biyosensörlerin üretimi için iyi tanımlanmış yüzeyler üretmek için kullanılmaktadır [70].

Mikroorganizmalarının yüzeyinin baskılanmasında, mikro-temas baskılama metodu, hücre tanımlaması için yüksek yoğunluklu baskılı oyuklara sahip baskılanmış filmleri hazırlamak için en basit ve etkili yöntemdir. Çözücü içermeyen bir sistemde yüzeydeki nispeten büyük kalıp moleküller (peptitler, proteinler ve hücreler) için mikro-temas baskılama yaklaşımı, kalıp-immobilize edilmiş bir katmanın bir polimer yüzeyine belirli bir düzende konformal olarak damgalanmasını içeren bir yumuşak litografi yöntemidir [60].

Mikro-temas baskılama, polimerizasyondan önce biyosensörün yüzeyine bir hedef damgası yerleştirildikten sonra, ince bir monomer tabakasının polimerizasyonuna dayanmaktadır. İmmobilize edilmiş hedef molekülleri veya hücreleri içeren damga çıkarıldığında, damganın üzerindeki hedeflerin şekli ile eşleşen boşluklara sahip bir polimer yüzeyinin oluşmuş olur [71].

Mikro-temas baskılama tekniğinin genel yöntemi üç adımda açıklanabilir:

1. Kalıp analit, hedefe özel spesifik damga oluşturmak için önceden temizlenmiş bir cam yüzeye bağlanır.
2. Hedef damgası monomer modifiyeli substrat ile etkileştirilir ve polimerizasyon UV ışığı ile başlatılır.
3. Hedef damgası yüzeyden çıkarılır. Böylece, spesifik tanıma bölgeleri yalnızca baskılanmış substratın yüzeyinde elde edilir [70].

2.6.1.3. Epitop Baskılama

Epitop baskılama ilk kez 2000 yılında, Rachkov ve Minoura [72] tarafından bir biyomolekülün epitopunu baskılanmış polimer oluşturmak için şablon olarak kullandıkları zaman ortaya çıkmıştır [73]. Bir proteine karşı antikorlar, belirli ardışık veya konformasyonel epitoplar yoluyla hedeflerini tanıdığından, baskılanmış polimerlerin hazırlanmasında bir epitop yaklaşımının kullanılması önerilmiştir [74]. Epitop baskılamada, proteinin sadece küçük bir kısmı baskılanır ve ortaya çıkan polimer, bu determinant ile tüm proteini tanıyabilmektedir [70]. Bu bakımdan, epitop terimi, genellikle proteinin karakteristiğı olan polipeptit zincirinin terminlerinden birine karşılık

gelen bir peptid dizisi ile ilgilidir [75]. Epitop baskılama yönteminin avantajları aşağıdaki şekilde özetlenebilir:

- Organik çözücüler kullanılabilir.
- Peptitlerin maliyetleri proteinlerden daha düşüktür.
- Çok saf biçimde üretilmektedirler.

Bu avantajlarından ötürü artı seçicilikte elde edilebilmektedirler [76].

2.6.2. Moleküler Baskılama Tekniğinde Önemli Malzemeler

Tipik bir moleküler baskılanmış polimer sentezi protokolü bir şablon, fonksiyonel bir monomer, bir çapraz bağlayıcı, bir polimerizasyon başlatıcısı ve bir çözücü (porojen) içermektedir [61]. Hazırlanan baskılanmış polimerlerin kalitesi ve bunların bağlanma özellikleri, sadece karışımın kombinasyonu yoluyla değil, aynı zamanda, başlatıcı tipi ve miktarı, polimerizasyon sıcaklığı, etkileşim mekanizmaları gibi deneysel koşullar ile de değiştirilebilmektedir [76]. Partiküllerin boyutu, çözücü tipi ve çapraz bağlayıcı, uygulanan monomerler arasındaki oran, sıcaklık, gibi çeşitli parametrelerden de etkilenebilmektedir [77].

2.6.2.1. Fonksiyonel Monomer

Polimer sentezinde önemli bir adım, şablon ile bir fonksiyon monomer veya bir dizi fonksiyonel monomer arasında bir kompleksin oluşturulduğu ön düzenleme aşamasıdır. [78]. Moleküler baskılama sırasında şablon ile etkileşime giren fonksiyonel monomer, polimerin bağlanma bölgelerinde fonksiyonel grupları sağlar. Genel olarak, kovalent olmayan polimerler, bağlayıcı monomerler üzerindeki fonksiyonel grupların, şablonun kimyasal gruplarıyla tamamlayıcılıklarına göre seçildiği genel bir yaklaşım kullanılarak tasarlanmaktadır [74]. Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken kullanılan bazı fonksiyonel monomerler aşağıda listelenmiştir [79,80].

Asidik monomerler; Metakrilik asit, itakonik asit, akrilik asit, 2-(trifluorometil)-akrilik asit, akrilamido-(2-metil)-propan sülfonik asit.

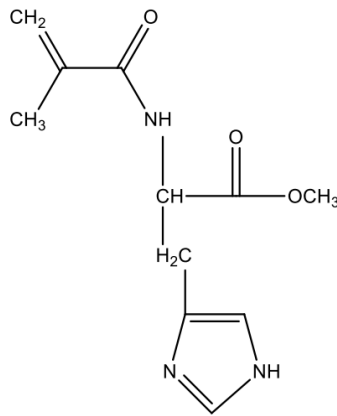
Bazik monomerler; 4-Vinilpiridin, 2-vinilpiridin, 1-vinylimidazol, allilamin, N,N,N,-trimetil aminoetilmetakrilat, N-(2-aminetil)-metakrilamid, N,N-dietil-4-strilamidin, N-vinilpirolidon.

Nötral monomerler; Akrilamid, metakrilamid, 2-hidroksietil metakrilat, akrilonitril, etilstiren, metil metakrilat, stiren.

Genellikle, kalıp molekül ile polimer matriksinde bulunan fonksiyonel gruplar arasında hidrojen bağları, dipol-dipol ve iyonik etkileşimler moleküler tanıma olgusunu yönlendirmektedir [81].

Yeni tasarlanan fonksiyonel monomerler, analitler ile çoklu kovalent olmayan etkileşimler yapabilirler. Bu monomerlerin uygulaması, birden fazla fonksiyonel monomerin kullanımına kıyasla, seçici bir moleküler boşluğun tasarlanması için avantajlı görünmektedir [79]. Kovalent bağlar, hidrojen bağları ve supramoleküler etkileşimlerin yanı sıra metal şelasyonu ve π - π etkileşimi içeren seçici kimyasal tanıma sağlayabilmek için farklı fonksiyonel monomerler eklenmiştir [82]. Yüksek tutunma ve çözünürlük, tek monomer kullanılarak hazırlanan polimerlerden ziyade iki ko-monomerli baskılanmış polimerlerde görülmektedir [83].

Çalışmada kullanılan N-metakriloil-L-histidin metil ester fonksiyonel monomeri aminoasit tabanlı bir monomerdir. Histidin kısmındaki imidazol halkası elektron veren azot atomları içerir. Bu sayede etkileşime girdiği biyomoleküllerin komşu amino asit yan zincirleri arasındaki işbirliği ve lokal konformasyonlar biyomolekül bağlanmasında önemli rol oynar [84]. Fonksiyonel monomerinin kimyasal yapısı Şekil 2.5'te gösterilmektedir.



Şekil 2.5. Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısı.

2.6.2.2. Çapraz Bağlayıcı

Çapraz bağlayıcılar, moleküler baskılanmış polimerlerin fiziksel ve kimyasal kararlılığı için önemlidirler. Çapraz bağlayıcı normal olarak bir veya daha fazla fonksiyonel monomer ile birleştirildiği için, çapraz bağlayıcı maddenin hedefe çok spesifik olmayan bir şekilde bağlanmasının olması önemlidir. Moleküler baskılama çalışmaları için suda çözünür çapraz bağlayıcılar tercih edilmektedir [70].

Baskılı bir polimerde çapraz bağlayıcı üç ana işlevi yerine getirmelidir;

1. Çapraz bağlayıcı, polimer matriksinin morfolojisinin, jel tipi, makro gözenekli veya bir mikrojel tozu olup olmadığının kontrolünde önemlidir.
2. Baskılanmış bağlanma bölgelerinin kararlılığında görevlidir.
3. Polimer matriksine mekanik kararlılık kazandırmalıdır.

Çapraz bağlayıcının, baskılanmış polimerlerin moleküler tanıma davranışı üzerindeki etkisi hakkında araştırmalar devam etmektedir. Makro gözenekli ve yeterli mekanik kararlılığa sahip malzemeler üretebilmek için yüksek çapraz bağlanma oranları tercih edilmektedir [80]. Çapraz bağlayıcı miktarı, tanıma alanlarının sağlamlığını korumak için yeterince yüksek tutulmalıdır. Genellikle %80 oranında fazla miktarda kullanılmaktadır [85]. Moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken kullanılan çapraz bağlayıcılar aşağıda belirtilmiştir [80]:

p-Divinilbenzen, etilen glikol dimetakrilat, tetrametilen dimetakrilat, 1,3-diizopropenil benzen, 2,6-bisakriloylamidopiridin, N,N'-1,3-fenilbis(2-metil-2-propenamit), N,N'-metilen bisakrilamit, N,N'-etilen bisakrilamit, N,N'-tetrametilen bismetakrilamit, 1,4-diakrilolil piperazin, anhidroeritritol dimetakrilat, trimetilpropan trimetakrilat, pentaeritritol tetraakrilat.

2.6.2.3. Çözücü

Çözücü, aynı zamanda bir porojenle aynı anda etki etmekte ve baskılanmış malzemedeki bağlama yerlerine daha iyi erişim için gözenekli bir malzeme oluşturulmasını sağlamaktadır [74]. Porojenik çözücülerin doğası ve seviyesinin, kovalent olmayan etkileşimlerin kuvvetini belirlediği ve moleküler baskılanmış polimerlerin performansını etkileyen polimer morfolojisini etkilediği bilinmektedir [83]. Kullanılacak olan çözücünün sahip olması gereken özellikler aşağıdaki gibi özetlenebilir;

- Kalıp molekül, fonksiyonel monomer çapraz bağlayıcı ve başlatıcı porojenik çözülebilir olmalıdır.
- Porojenik çözücüler, ortaya çıkan polimerin iyi akış özelliklerini sağlamak için büyük gözenekler üretmelidir.
- Yüksek seçicilikte baskılanmış polimerler elde etmek önemli olduğu için, baskı molekülü ile monomer arasındaki kompleks oluşum sırasındaki girişimleri azaltmak için porojenik çözücüler, nispeten düşük polariteye sahip olmalıdırlar [83].

Çözücü, iyi akış özelliklerini sağlamak için elde edilen polimer matriksinde büyük gözenekler yaratmalıdır. Çözücü ayrıca kalıp molekül-monomer kompleksi oluşması sırasında girişimleri en aza indirmek için nispeten kutupsuz olmalıdır. [85].

2.6.2.4. Başlatıcı

Başlatıcılar, monomeri çok sayıda başka monomer ile polimerik bir matrikse bağlayabilen, bir ara bileşik üretmesini sağlayan kimyasal maddelerdir. Başlatıcılar, polimerizasyon tipine ve hedef moleküle göre seçilmelidirler [63]. Prensipte olarak, hedef analitlerin serbest radikal polimerizasyonunu başlatırlar [80]. Başlatıcılar monomerlere kıyasla çok daha düşük derişimlerde, tipik olarak toplam polimerize edilebilir molekül miktarının ağırlıkça %1'i oranında kullanılmaktadırlar [85]. Aşağıda moleküler baskılanmış polimerler hazırlanırken kullanılan başlatıcılar için örnekler verilmiştir;

Azobisisobütironitril, azobisdimetilvaleronitril, dimetilasetal benzil, benzoilperoksit, 4,4-azo (4-siyanovaleik asit) [80].

2.7. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

Adsorpsiyon dengesi, bir adsorpsiyon sürecinin doğru anlaşılması için gerekli olan en önemli noktalardan birisidir. Son zamanlarda, lineer regresyon analizi, adsorpsiyon modellerini tanımlamak için en çok uygulanan araçlardan biri olmuştur. Çünkü adsorbantların dağılımını ölçmekte, adsorpsiyon sistemini analiz etmekte ve adsorpsiyon izoterm modelinin teorik varsayımlarının tutarlılığını doğrulamaktadır [86].

Adsorpsiyon izotermi veya denge modellemesi tipik olarak hedef molekül ve moleküler baskılanmış polimerlerin bağlanma davranışını ve etkinliğini analiz etmek için kullanılır. İzoterm modellerinin denklemlerinden elde edilen R^2 değerleri, adsorpsiyonunun tek ya

da çok katmanlı olduğunu belirtmenin yanı sıra bu bağlanma davranışının fiziksel veya kimyasal hangi yapıda gerçekleştiğini açıklamak için de kullanılmaktadır [87].

Langmuir adsorpsiyon izoterm modeli homojen bağlanma varsayımına dayanırken Freundlich adsorpsiyon izoterm modeli heterojen bağlanma varsayımına dayanmaktadır. Freundlich adsorpsiyon modeli, özellikle düşük derişimlerde uygunluk gösterirken yüksek derişim değerlerinde bazı sapmalar gösterebilmektedir. Böyle durumlarda Langmuir-Freundlich ikili modeli kullanılmaktadır [88].

Scatchard analizi, moleküler baskılanmış polimerlerin yeniden bağlama deneylerinde bağlanma davranışının homojen ya da heterojen olduğunu değerlendiren yaygın bir modeldir [89]. Tipik olarak kalıp molekül ve fonksiyonel monomer arasındaki kovalent olmayan etkileşim, yüksek ve düşük afiniteli bağlanma bölgelerine karşılık gelen ve iki birleşme sabiti ile hesaplanan polimerdeki bağlanma yerlerinin heterojen eğilimlerini gösteren iki düz çizgili bir Scatchard grafiğı vermektedir. Scatchard grafiğinde gözlenen eğrilerin doğrusallıktan sapmaması, söz konusu adsorpsiyon işleminin uygun adsorpsiyon modeline yakınlık gösteren bir özelliğı sahip olduğunu gösterir [81].

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

Tez kapsamında deneysel çalışmalar şu şekilde özetlenebilir;

- Fonksiyonel monomerin sentezi ve karakterizasyonu,
- Uygun monomer ve bakteriyofaj oranının belirlenmesi,
- Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin sentezlenmesi ve karakterizasyonu,
- Nanopartikül temelli SPR biyosensörlerin hazırlanması ve karakterizasyonu,
- Nanopartikül temelli SPR biyosensörler ile kinetik, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik çalışmaları ve gerçek örnek analizi,
- Nanofilm temelli SPR biyosensörlerin hazırlanması için SPR altın yüzeylerin ve cam slaytların modifikasyonu,
- Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmlerin sentezi,
- Modifiye edilmiş, edilmemiş, baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin karakterizasyonu,
- Nanofilm temelli SPR biyosensörler ile kinetik, tekrar kullanılabilirlik, seçicilik çalışmaları ve gerçek örnek analizi.

3.1. Kimyasal Maddeler, Mikroorganizmalar ve Sarf Malzemeler

T4 bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküller ve nanofilm hazırlanırken kullanılan T4 bakteriyofajı ve konak hücresi *E.coli* ATCC 11303, seçicilik çalışmalarında kullanılan T2 bakteriyofajı, MS2 bakteriyofajı ve konak hücresi *E.coli* ATCC 15597 ATCC (Amerika) firmasından temin edilmiştir. Mikroorganizmaların üretiminde kullanılan LB besiyeri ve bakteriyolojik agar Pronadisa'dan (İspanya), nanopartikül ve nanofilm sentezlenmesinde kullanılan tuzlu fosfat tamponu (PBS) Fisher Scientific'ten (New Jersey, Amerika), poli vinil alkol, sodyum dodesil sülfat, sodyum bikarbonat (NaHCO_3), 2-hidroksi etil metakrilat, etilen glikol dimetakrilat, sodyum bisülfat (NaHSO_3) ve amonyum persülfat ($(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$) Sigma-Aldrich Corporation'tan (Amerika) temin edilmiştir.

3.2. T4 Bakteriyofaj Süspansiyonunun Hazırlanması

Bakteriyofaj üretimi için öncelikle konak mikroorganizma olan *E.coli* ATCC 11303 LB (Luria-Bertani) sıvı besiyerine inoküle edilerek 37°C’de 18 saat statik koşullarda inkübasyona bırakılmıştır.

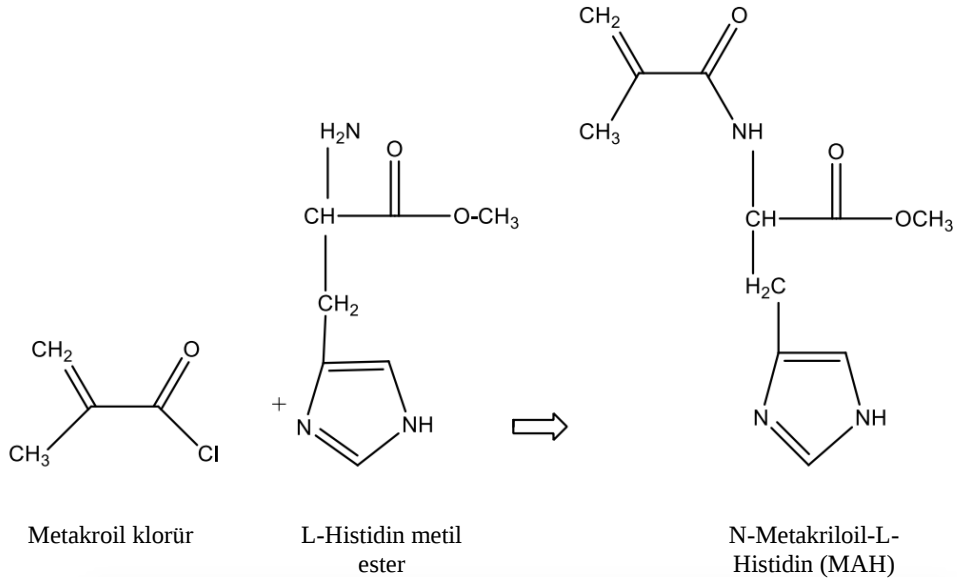
-80°C’de saklanan T4 (ATCC 11303-B4) bakteriyofaj stoğuna, plak sayılabilecek uygun derişimi bulmak amacıyla steril LB besiyeri kullanılarak seri sulandırma yapılmıştır. Bakteriyofaj üretimi için çift tabakalı dökme plak yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla %0.5 oranında agar içeren LB besiyerine 50 µL *E.coli* kültürü ve 50 µL T4 faj süspansiyonu eklenmiş ve seri bir şekilde önceden hazırlanan LB agar bulunduran petrilere dökülmüştür. Hazırlanan petrilere 37°C’de 18 saat inkübasyona bırakılmış ve sonrasında oluşan plaklar sayılmıştır. Bakteriyofajları agar yüzeyinden toplamak amacıyla SM tamponu [NaCl: 100 mM, MgSO₄.7H₂O: 8 mM, Tris-Cl (1 M, pH 7.5): 50 mM, Jelatin (%2): %0.01] kullanılmıştır.

5 mL SM tamponu bakteriyofaj üretimi gerçekleşmiş olan petrilere eklendikten sonra 1 saat boyunca 75 rpm çalkalama hızı ile orbital çalkalayıcıda döndürülmüştür. Sonrasında agarın üzerine eklenmiş olan tampon toplanıp son derişimi 0.5 M olacak şekilde NaCl eklenmiştir. Hazırlanan bu karışım 30 dakika boyunca oda sıcaklığında bekletildikten sonra 8000 rpm’de 20 dakika santrifüjlenmiştir. Süpernatant 0.22 µm’lik şırınga filtreden geçirilip üzerine %10’luk poli etilen glikol (PEG 6000) çözeltisi eklenmiştir. Tekrar 10000 rpm’de 30 dk boyunca santrifüjlendikten sonra pelet SM tamponu ile süspanse edilmiştir.

3.3. Fonksiyonel Monomerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Fonksiyonel monomerinsentezi için şu yöntem uygulanmıştır:

L-histidin metil ester ve hidrokinon, diklorometan içerisinde çözüldükten sonra çözelti 0°C’ye soğutulmuştur. Trietilamin ve metakroil klorür bu çözeltiye ilave edilmiş ve karışımı 120 dakika süresince 25°C’de karıştırıldıktan sonra, reaksiyona girmeyenler NaOH çözeltisi (%10) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Kalan karışım etanolde çözülüp fonksiyonel monomer polimerizasyon için hazır hale getirilmiştir [90].



Şekil 3.1.Fonksiyonel monomerin sentezi.

Fonksiyonel monomerin karakterizasyonu için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumu, FTIR spektrofotometresi (FTIR 8000, Shimadzu, Japonya) cihazı ile elde edilmiştir. Fonksiyonel monomer, KBr ile homojen olarak karıştırılarak tablet haline getirilmiş ve analiz gerçekleştirilmiştir. Ayrıca, fonksiyonel monomerin proton (H) NMR spektrumu, CDCl₃ içerisinde NMR cihazı (Bruker AV, Amerika) kullanılarak elde edilmiştir. Kimyasal kaymalar (δ) ppm cinsinden raporlanmıştır.

3.4. Uygun Ön-Kompleks Oranının Belirlenmesi

Uygun oranının belirlenmesi amacıyla kalıp bakteriyofaj süspansiyonun derişimi sabit tutularak (6x10⁸ pfu/mL) farklı derişimlerde fonksiyonel monomer süspansiyonları hazırlanmıştır. Hazırlanan fonksiyonel monomer ve bakteriyofaj karışımları, ön-kompleks oluşturma amacıyla rotatorda 1 saat süre ile 20 rpm hızda karıştırılmıştır [91]. Hazırlanan oranlar Çizelge 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Ön-kompleks hazırlama oranları.

Oran	Monomer	Bakteriyofaj
0.25:1.00	7.5 µL	30 µL
0.50:1.00	15 µL	30 µL
1.00:1.00	30 µL	30 µL
2.00:1.00	60 µL	30 µL
3.00:1.00	90 µL	30 µL

3.5. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

3.5.1. Nanopartiküllerin Sentezi ve Karakterizasyonu

Faj baskılanmış nanopartiküller sentezlenmeden önce 60 µL fonksiyonel monomer ve 30 µL T4 bakteriyofaj kalıp molekülün süspansiyonu ön-kompleks oluşturmak üzere 20 rpm’de 1 saat boyunca rotatörde karıştırılmıştır. Miniemülsiyon polimerizasyon, ikili sıvı faz karışımı ile gerçekleştirilmiştir [92]:

Birinci sıvı faz

Poli vinil alkol	0.05 g
Sodyum dodesil sülfat	0.05 g
Ultra saf su	50 mL

İkinci sıvı faz

Poli vinil alkol	0.1 g
Sodyum dodesil sülfat	15 mg
Sodyum bikarbonat	12.5 mg
Ultra saf su	5 mL

Her iki faz manyetik karıştırıcıda karıştırılıp ultrasonik banyoda sonike edilmiştir.

Üçüncü faz

2-Hidroksietilmetakrilat	0.5 mL
Etilen glikol dimetakrilat	1 mL
Ön-kompleks	90 µL

İkinci ve üçüncü fazlar (ön-kompleks hariç) 30.000 rpm hızında 15 dakika süre ile homojenize edilmiştir (Ika Labortechnik, Almanya). Sonrasında, birinci faz ve ardından homojenize edilen karışım cam polimerizasyon reaktörüne aktarılmıştır. Ön-kompleks eklendikten sonra başlatıcı çifti amonyum per sülfat (100 mg), sodyum bisüfit (50 mg) eklenerek polimerizasyon başlatılmış ve 40°C’de, 500 rpm’de 24 saat süresince devam ettirilmiştir. Polimerizasyon sonrasında, sulu fazın uçurulması amacıyla polimer karışımı 50°C’de 6 saat boyunca etüvde bekletilmiştir. Baskılanmamış nanopartiküller aynı yöntem kullanılarak sadece bakteriyofaj olmadan hazırlanmıştır.

Hazırlanan nanopartiküller, reaksiyona girmeyen monomer, yüzey aktif madde ve başlatıcıdan uzaklaştırılmak amacıyla; 1 kez etanol, 2 kez etanol:su ve 2 kez su kullanılarak santrifüjlenmiştir.

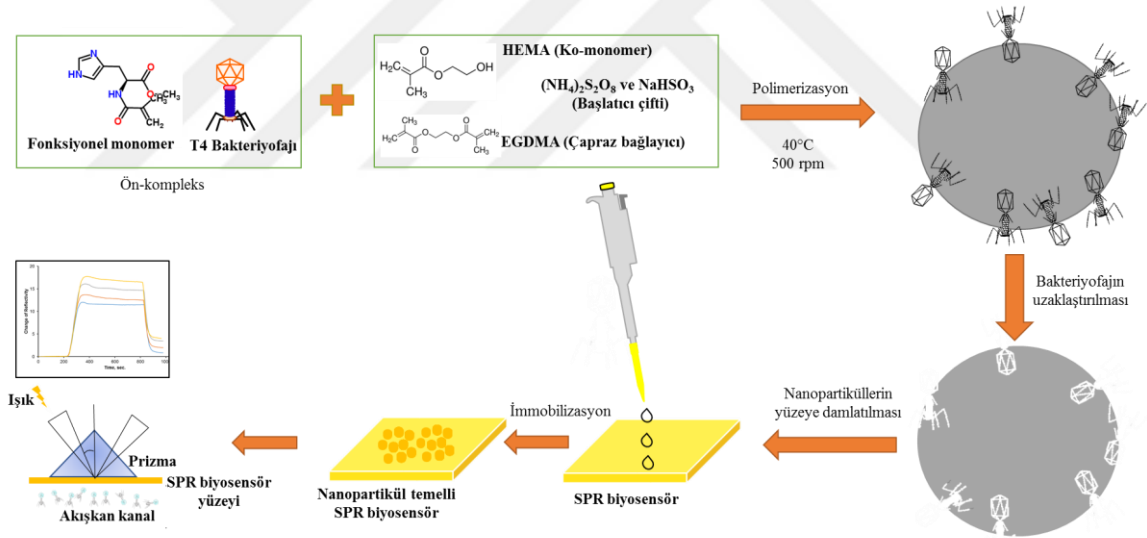
Sentezlenen nanopartiküllerin boyutları, Nano Zetasizer (Malvern Instruments, İngiltere) kullanılarak ölçülmüştür. Boyut analizi için, hazırlanan nanopartikül çözeltisi örnek yuvasına yerleştirildikten sonra, ışık saçılması 90°’lik geliş açısı ile ölçülmüştür. Ölçümler, üç kere tekrarlanmış ve sonuçlar uygun yazılım ile incelenerek standart sapma değerleri ile birlikte verilmiştir.

Hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yüzey morfolojisi taramalı elektron mikroskobu (SEM, Quanta 400F Field Emission, Amerika) ve geçirimli elektron mikroskobu (TEM, FEI/Tecnai G2 Spirit Biotwin, Amerika) ile detaylı bir şekilde analiz edilmiştir.

Bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin için Fourier dönüşümlü kızılötesi spektrumu, FTIR spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. FTIR spektrofotometresi kullanılarak elde edilmiştir. FTIR spektrumu ölçümü için nanopartiküller fonksiyonel monomer için kullanılan yöntem izlenerek hazırlanmıştır.

3.5.2. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması ve Yüzeylerin Karakterizasyonu

SPR biyosensör yüzeyine bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin immobilize edilmesinden önce kalıp mikroorganizmanın polimerik yapıdan uzaklaştırılması amacıyla desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu bağlamda 2.5 mM Glisin:HCl (pH 2.5) çözeltisi bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküller ile 1 saat boyunca rotatörde karıştırıldıktan sonra 30 dakika boyunca 14.500 rpm'de santrifüjlenmiştir. Üst faz ayırdıktan sonra pelet 1000 µL suda dağıtılıp tekrar rotatörde karıştırılıp santrifüjlenmiştir. En son elde edilen pelet 100 µL suda dağıtılmış ve immobilizasyon için hazır hale getirilmiştir. 10 µL nanopartikül çözeltisi SPR biyosensör yüzeyine damlatıldıktan sonra immobilizasyonun gerçekleşmesi amacıyla 45 dakika UV ışık altında sonrasında ise gece boyunca 40°C'de bekletilmiştir. Aynı yöntem ile bakteriyofaj baskılanmamış nanopartiküller kullanılarak bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensör hazırlanmıştır.



Şekil 3.2. Bakteriyofaj baskılanması ve SPR biyosensör uygulamasının şematik gösterimi.

Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin su ile yaptığı temas açısı ölçülmüştür (Krüss DSA 100, Almanya). Temas açısı ölçümlerinde damla yöntemi takip edilmiştir. Yüzey üzerine bir damla su damlatılarak açılar ölçülmüştür. Ölçümlerde yüzeylerin farklı bölgelerine su damlatıldıktan sonra beş ayrı fotoğraf çekilmiş, temas açıları belirlenmiş ve ölçümlerin ortalama değeri alınmıştır.

Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin yüzeylerindeki polimer kalınlıkları Nanofilm EP3-Nulling Elipsometre (Almanya) cihazı kullanılarak yapılmıştır. Kalınlık analizi belli dalga boyu (532 nm) ve geliş açısı (62°) ile yapılmıştır. SPR biyosensörler, lazer ışık kaynağı altına yerleştirilmiş, yüzey kalınlıkları için SF10 cam, titanyum ve altın katmanı veri olarak öngörülmüştür.

Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yüzey karakterizasyonu için atomik kuvvet mikroskobu (AFM, Veeco MultiMode V, Amerika) kullanılmıştır. Atomik boyutlara kadar sivriltilmiş bir iğne ucu kullanılarak, yüzeyin yüksek çözünürlük ile birlikte üç boyutlu görüntülenmesini sağlamıştır. Nanopartiküller 10 milimetrelik bir çap içerisine yerleştirilerek hava ortamında ve yarı degen modda görüntülenmiştir. Örnekler 1 $\mu\text{m/s}$ tarama hızında ve 1x1 μm^2 'lik bir alanın görüntüsü olarak alınmıştır.

Yüzey plazmon sensogramları yüzey plazmon rezonans sistemi SPRImager®II (GWC Technologies, Amerika) ile alınmıştır. Belli yüzey alanına sahip (25 mm x 12.5 mm) 50 nm kalınlığında altın kaplanmış olan SPR çipleri kullanılmıştır. Plazmon eğrilerinin alınması sırasında SPRview yazılımı kullanılmıştır. Görüntü alınması sırasında ışığın SPR biyosensöre varma açısı değiştirilerek ışığın yüzde kırılma değerleri alınmıştır.

3.5.3. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün hazırlanması işlemleri ve karakterizasyon analizlerinin ardından kinetik analizler ile devam edilmiştir. Kinetik analizler için, belli derişim aralığındaki (1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL) T4 bakteriyofaj çözeltileri kullanılmıştır. Örnekler, SM tamponuyla 5 mL hacimde hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Desorpsiyon çözeltisi olarak 2.5 mM Glisin:HCl tamponu (pH 2.5) kullanılmıştır [21]. SPR sisteminde; kamera ve ayna sistemi, bir lazer kaynağı, peristaltik pompa ve bilgisayar bulunmaktadır (Şekil 3.3).



Şekil 3.3. SPR biyosensörün altın yüzeyi (A) ve SPRImager®II sistemi (B).

Kinetik analizlere başlamadan önce biyosensör yüzeyinden 1 saat süresince deiyonize su geçirilmiştir. Yüzey PBS tamponu (pH 7.4) ile muamele edilirken yüzey plazmon eğrileri kaydedilmiş ve kırılma açısı tespit edilmiştir. Eğriler alınıp uygun rezonans açısı ayarlandıktan sonra, 180 saniye süre ile PBS tamponu (pH 7.4) etkileştirilmeye devam edilmiştir. Yüzey dengeye geldikten sonra, artan derişimdeki (1×10^5 - 4×10^6 pfu/mL) T4 bakteriyofaj çözeltisi (5 mL, 500 µL/dak. akış hızı) 300 saniye boyunca yüzey ile etkileştirilmiştir. Kırılma değerleri gerçek zamanlı gözlenip, sistem denge durumuna geldikten sonra, 240 saniye boyunca desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Desorpsiyon işleminden sonra, yüzey deiyonize su ve PBS tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır. Her T4 bakteriyofaj örneği için öncesinde adsorpsiyon-desorpsiyon-yıkama basamakları tekrarlanmıştır. Kinetik analizler, kontrol amaçlı baskılanmamış SPR biyosensör kullanılarak da tekrarlanmıştır.

3.5.4. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörü ile T4 bakteriyofajı arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla üç farklı (Scatchard, Langmuir, Freundlich) adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır [93] .

3.5.5 Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörünün tekrarlanabilirliğini incelenmek amacıyla 4×10^6 pfu/mL derişiminde hazırlanmış T4 bakteriyofaj örneği SPR sistemine verilmiştir. Sistem 120 saniye boyunca dengeye getirildikten sonra, 180 saniye boyunca örnek sistemden geçirilmiş ve yine 120 saniye boyunca da 2.5 mM Glisin:HCl çözeltisi (pH 2.5) verilerek desorpsiyon gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler aynı örnek ile peşpeşe beş kez tekrarlanmıştır.

3.5.6. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin baskılama seçiciliğini göstermek için, T4 bakteriyofajı ile aynı derişimlerde (1×10^6 pfu/mL) T2 ve MS2 bakteriyofajları ile etkileşimleri incelenmiştir. Kullanılan iki bakteriyofaj da *E.coli*'yi enfekte eden bakteriyofajlardandır. T2 bakteriyofajının konağı T4 ile aynı olup *E.coli* ATCC 11303 iken, MS2 bakteriyofajının konağı *E.coli* ATCC 15597'dir. Hazırlanan

örnek çözeltilerinin T4 bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile etkileştirilmesinden sonra sensogramlar elde edilmiş ve seçicilik katsayıları hesaplanmıştır.

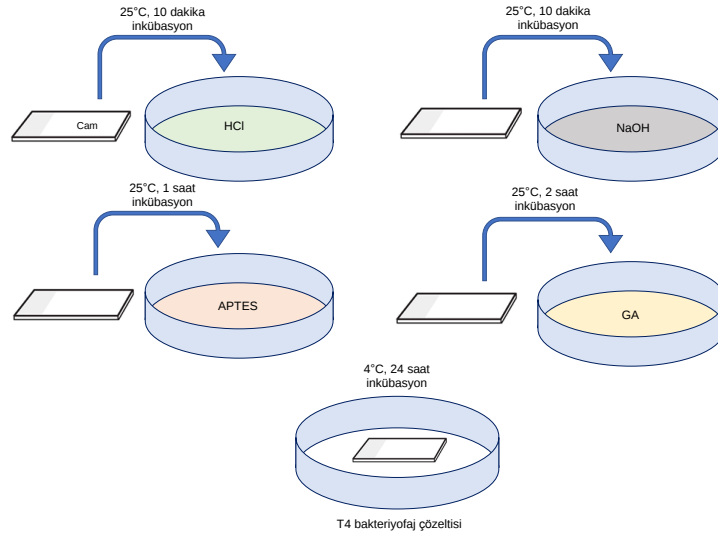
3.5.7. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi

Gerçek örneklerle yapılacak olan çalışmalar için mikroorganizmalar üremesi için uygun bir ortam olabileceği ve önemli bir kirlilik kaynağı olduğu için deniz suyu ve çeşme suyu seçilmiştir. Denizler, evsel ve endüstriyel atıklar ile fekal kaynaklar sonucu kirlenme potansiyeli olan kompleks ortamlardır. Örnekler sisteme verilmeden önce SM tamponu ile 100 kat seyreltilmiş, son derişim 1×10^7 pfu/mL olarak ayarlandıktan sonra sisteme verilmiştir.

3.6. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması

3.6.1. Cam ve SPR Yüzeylerinin Modifikasyonu

Kalınlığı 1 mm olan 2.5 cm x 7.5 cm boyutlarındaki camların temizlenmesi şu şekilde gerçekleştirilmiştir: Camlar petri kabında sıvı hacimleri 20 mL olacak şekilde etanol ile 10 dakika 60 rpm’de çalkalamaya bırakılmış, saf su ile yıkanmış ve ardından 80°C’de etüvde kurutulmuştur. Hazırlanan 1 M hidroklorik asit (HCl) çözeltisi ile aynı şekilde 10 dakika boyunca muamele edilmiş ve ardından üç defa saf su ile yıkanmıştır. Aynı işlem hazırlanan 1 M sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi ile tekrarlanmıştır. Son olarak camlar etanol ile yıkanıp kurutularak modifiye edilmeye hazır duruma getirilmiştir. Kurutulan camlar etanol ile hazırlanmış %10’luk 3-aminopropil-trietoksisilan (APTES) çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında 1 saat 60 rpm’de çalkalamaya bırakılmış ve böylelikle amino gruplarının cam yüzeyine takılması sağlanmıştır. Bu süre sonunda camlar etanol ve saf su ile üçer kez yıkanarak kurutulmuştur. APTES ile modifiye edilmiş camlar PBS tamponu (pH 7.4) ile hazırlanmış %5’luk gluteraldehit (GA) çözeltisine daldırılarak oda sıcaklığında 1 saat 60 rpm’de çalkalamaya bırakılmış ve böylelikle amino grupları aktifleştirilmiştir. Ardından camlar PBS tamponu (pH 7.4) ile üç kez yıkanmıştır. Daha sonra saf su ile yıkanarak kurutulmuştur (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. Cam yüzey modifikasyonu.

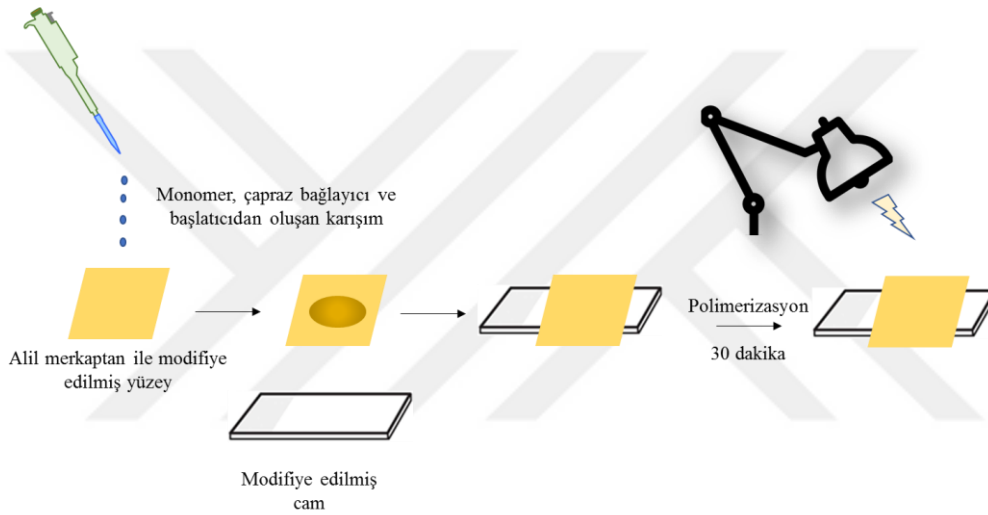
Bakteriyofaj baskılanmamış ve baskılanmamış SPR biyosensörünün hazırlanmasında GWC SPRimager II sistemine uygun 2.5 cm x 2.5 cm boyutlarındaki altın kaplı çip (SPRchip™) kullanılmıştır. Bu çipler SF10 cam üzerine 2 nm titanyum ve 42.5 nm altın kaplama içermekte ve firmadan hazır olarak temin edilmiştir. Altın kaplı çip yüzeyleri alil merkaptan kullanılarak 24 saat modifiye edilmiş ve böylelikle polimerizasyonun altın yüzeyinde gerçekleşmesi için gerekli tiyol gruplarının oluşturulup kuvvetli bir şekilde tutunması sağlanmıştır. Sonrasında zincir-zincir etkileşimleri ile yoğun ve düzenli bir tabaka oluşturulmuştur. Bu düzenlenmede kuyruk kısmında yer alan doymamış grup dışa doğru yönelmiştir.

3.6.2. Nanofilin Temelli SPR Biyosensörlerin Hazırlanması ve Karakterizasyonu

Bakteriyofaj kalıbının hazırlanması için bakteriyofajlar cam yüzeyine immobilize edilmiştir. Hazırlanan modifiye camlara 200 µL T4 bakteriyofaj çözeltisi (1×10^6 pfu/mL) damlatılmış ve 18 saat süre ile +4°C’de bekletilmiştir. Elde edilen bakteriyofaj kalıbı olarak kullanılan cam yüzeyler PBS tamponu (pH 7.4) ile yıkanarak immobilize olmayan bakteriyofajlar uzaklaştırılmış ve mikro-temas baskılama temelli bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin hazırlanmasında bakteriyofaj kalıbı olarak kullanılmıştır. Baskılanmamış nanofilmin hazırlanmasında ise APTES ve GA ile modifiye edilen cam slaytlar PBS tamponu (pH 7.4) içerisinde bekletilmiş ve kurutulduktan sonra kullanılmıştır.

Alil merkaptan ile modifiye edilmiş altın yüzeyinde baskılanmış ve baskılanmamış nanofilmin hazırlanması için ilk olarak fonksiyonel N-metakriloil-(L)-histidin metil ester

Etilen glikol dimetakrilat çapraz bağlayıcısı (1:4) 2 saat süreyle oda koşullarında karıştırılarak stok monomer karışımı hazırlanmıştır. Daha sonra bu karışım içerisine 1 mg azobisisobütironitril (AIBN) başlatıcısı eklenerek polimerizasyon karışımı hazırlanmış ve reaksiyon karışımından 10 µL alınarak daha önceden alillenmiş çip yüzeyine damlatılarak cam üzerinde hazırlanan bakteriyofaj kalıbını etkileşmesi ve baskılanması gerçekleştirilmiştir. Polimerizasyon hazırlanan sistem UV ışığı (100 W, 356 nm) altında 30 dakika bekletilmesi suretiyle gerçekleştirilmiştir (Şekil 3.5). Polimerizasyon sonrasında hazırlanan camlar çip yüzeyinden dikkatli bir şekilde ayrıldıktan sonra baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensör önce etanol sonra saf su ile yıkanarak etüvde kurutulmuştur.



Şekil 3.5. SPR biyosensör yüzeyinde nanofilmin hazırlanması.

Modifiye edilmiş, edilmemiş, baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin yüzeylerinin ıslanabilirlik özelliklerinin incelenmesi amacıyla bu yüzeylerin su ile yaptıkları temas açısı analizleri ve nanofilmlerin kalınlık incelemeleri elipsometre analizleri gerçekleştirilmiştir. Bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin yüzey karakterizasyonu için ise atomik kuvvet mikroskobu kullanılmıştır.

3.6.3. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün hazırlanması işlemleri ve karakterizasyon analizlerini takiben kinetik analizlere geçilmiştir. Bunun için, farklı derişimlerdeki (1×10^5 - 4×10^6 pfu/mL) T4 bakteriyofaj çözeltileri kullanılmıştır. Desorpsiyon çözeltisi olarak da yine 2.5 mM Glisin:HCl (pH 2.5) çözeltisi kullanılmıştır.

3.6.4. Adsorpsiyon İzoterm Modelleri

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörü ile T4 bakteriyofajı arasındaki etkileşimi incelemek amacıyla üç farklı (Scatchard, Langmuir, Freundlich) adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır.

3.6.5. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörünün tekrar kullanılabilirliğini incelenmek amacıyla 4×10^6 pfu/mL derişiminde hazırlanmış T4 bakteriyofaj örneği SPR sistemine verilmiştir. Sistem uygun rezonans frekansına ayarlandıktan sonra PBS tamponuyla (pH 7.4) dengeye getirilmiştir. Dengeye gelen sisteme T4 bakteriyofaj süspansiyonu 120 saniye boyunca verilmiştir. 180 saniye boyunca örnekler sistemden geçtikten sonra 120 saniye boyunca 2.5 mM Glisin:HCl çözeltisi (pH 2.5) verilerek desorpsiyon işlemi gerçekleştirilmiştir. Bu işlemler sistemde beş kez tekrarlanmıştır.

3.6.6. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Baskılama Seçiciliğinin İncelenmesi

Hazırlanan baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin baskılama seçiciliğini göstermek için, T4 bakteriyofajı ile aynı derişimlerde (1×10^6 pfu/mL) T2 ve MS2 bakteriyofajları ile etkileşimleri incelenmiştir. Kullanılan iki bakteriyofaj da *E.coli*'yi enfekte eden bakteriyofajlardır. Hazırlanan örnek çözeltilerinin T4 bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile etkileştirilmesinden sonra sensorgramlar elde edilmiş ve seçicilik katsayıları hesaplanmıştır.

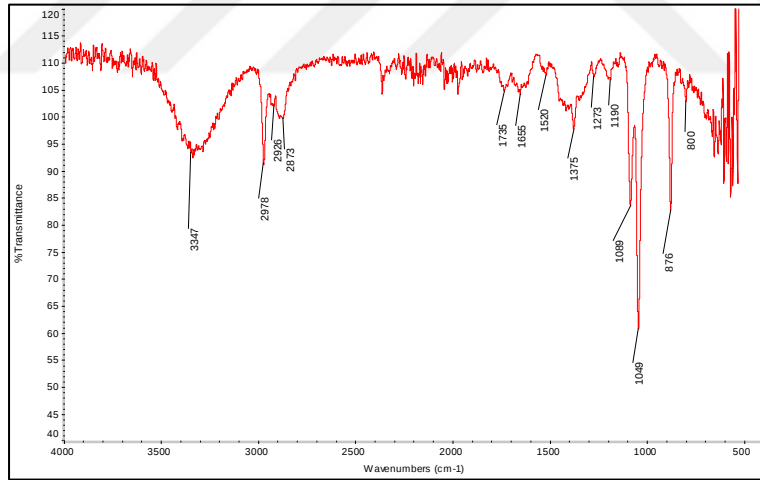
3.6.7. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizi

Gerçek örneklerle yapılacak olan çalışmalar için mikroorganizmalar üremesi için uygun bir ortam olabileceği ve önemli bir kirlilik kaynağı olduğu için deniz suyu ve çeşme suyu seçilmiştir. Örnekler sisteme verilmeden önce SM tamponu ile 100 kat seyreltilmiş, son derişim 1×10^7 pfu/mL olarak ayarlandıktan sonra sisteme verilmiştir.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Fonksiyonel Monomerinin Karakterizasyonu

Şekil 4.1’de fonksiyonel monomere ait FTIR spektrumu görülmektedir. FTIR spektrumunda $1600-1700\text{ cm}^{-1}$ aralığı amid I, $1480-1580\text{ cm}^{-1}$ aralığı amid II, $1735-1765\text{ cm}^{-1}$ aralığı karbonil, $3250-3550\text{ cm}^{-1}$ aralığı hidroksil titreşim bantlarına eşdeğerdir. Elde edilen sonuçlar yorumlandığında, fonksiyonel monomere ait olan 1655 cm^{-1} amid I ve 1520 cm^{-1} amid II bantları, 1735 cm^{-1} dalga boyunda ester bandı ve 3347 cm^{-1} ’de hidroksil bandı görülmüştür. Fonksiyonel monomerin kimyasal yapısının incelenmesinde ayrıca $^1\text{H-NMR}$ kullanılmıştır. $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda fonksiyonel monomere ait pikler incelenmiştir. Bunlar: $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): 1.99 (t; 3H, $J=7.08\text{ Hz}$, CH_3), 1.42 (m; 2H, CH_2), 3.56 (t; 3H, $-\text{OCH}_3$), 4.82-4.87 (m; 1H, methin), 5.26 (s; 1H, vinil H), 5.58 (s; 1H, vinil), 6.86 (δ ; 1H, $J=7.4\text{ Hz}$, NH), 7.82 (δ ; 1H, $J=8.4\text{ Hz}$, NH), 6.86-7.52 (m; 5H, aromatik). FTIR ve $^1\text{H-NMR}$ sonuçları literatürle karşılaştırıldığında, elde edilen piklerin fonksiyonel monomerinin fonksiyonel gruplarına uygunluk gösterdiği ve doğru bir şekilde sentezlendiği görülmektedir [94].

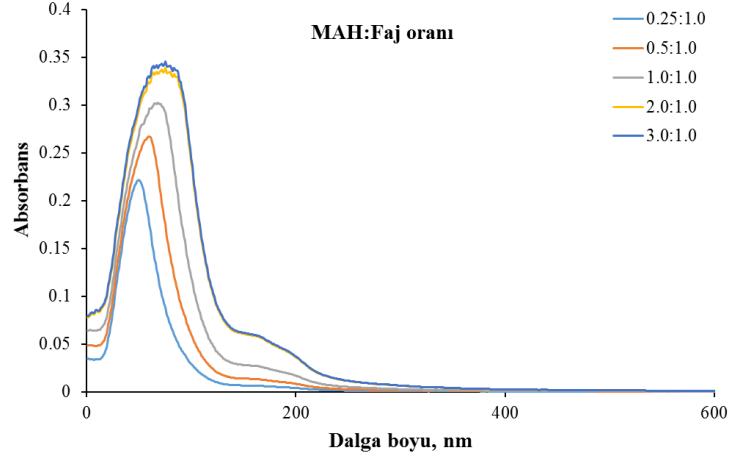


Şekil 4.1. Fonksiyonel monomerin FTIR spektrumu.

4.2. Uygun Ön-Kompleks Oranının Belirlenmesi

Fonksiyonel monomer ve kalıp molekül oranını belirlemek için fonksiyonel monomer ve kalıp bakteriyofajdan ön-kompleks oluşturulmuş ve UV-görünür bölge spektrofotometre ölçümleri yapılmıştır. Şekil 4.2’de gösterilen ön-komplekslerin spektrofotometrik ölçümü incelendiğinde 2.0:1.0 oranının spektrumdaki optimum oran olduğu ve

fonksiyonel monomerden gelen kaymaların sona erdiği ve absorbandsında değişiklik olmadığı gözlenmiş ve polimerleşme bu oran kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

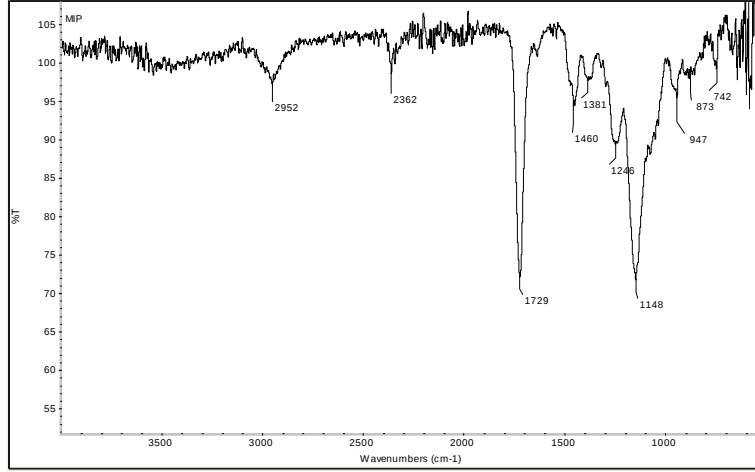


Şekil 4.2. Ön-kompleksin spektrofotometrik ölçümü.

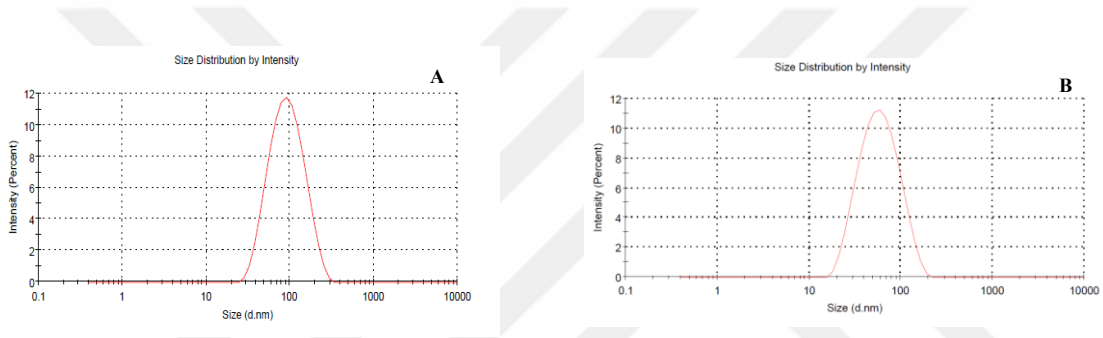
4.3. Nanopartiküllerin Karakterizasyonu

Karakterizasyon için en son santrifüjlerden sonraki alt faz kullanılmıştır. Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyonu zeta boyut, FTIR, SEM ve TEM analizleri ile yapılmıştır. Elde edilen FTIR spektrum sonuçlarına göre Şekil 4.3'te görüldüğü gibi ester bandının şiddetlenmesi ve 1735 cm^{-1} 'den 1723 cm^{-1} 'e kayması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermektedir [95].

Şekil 4.4'te görüldüğü gibi bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin ortalama boyutu $0.196\text{ }\mu\text{m}$ çok dağılımlılık belirteci ile birlikte 83.11 nm olarak ölçülürken, baskılanmamış nanopartiküllerin ortalama boyutu $0.189\text{ }\mu\text{m}$ çok dağılımlılık belirteci ile birlikte 51.89 nm olarak ölçülmüştür.

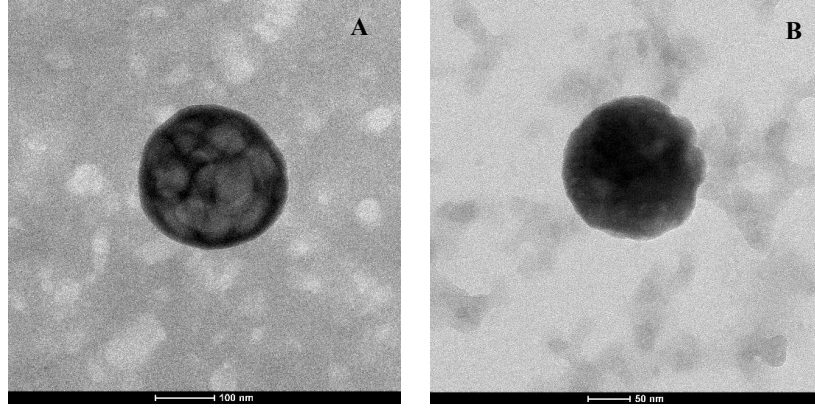


Şekil 4.3. Bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin FTIR spektrumu.

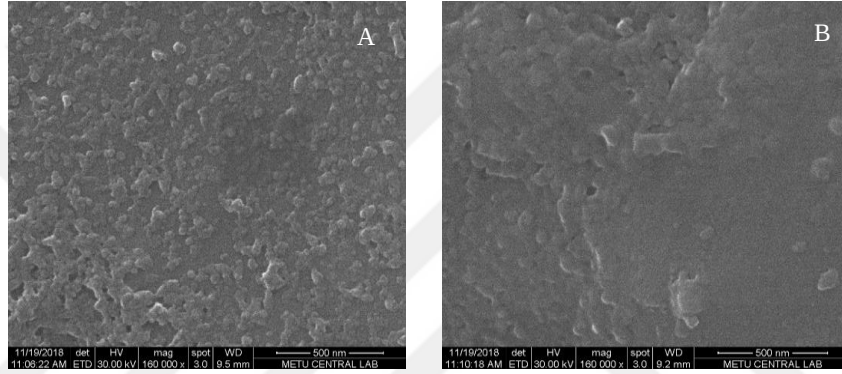


Şekil 4.4. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin boyut analizi.

Şekil 4.5 ve 4.6’da görüldüğü gibi bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yüzey morfolojisi TEM ve SEM analizleriyle gerçekleştirilmiştir. Analizlerden elde edilen sonuçlardan da görüldüğü gibi bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin homojen, küresel ve eş boyutlu olduğu görülmüştür.

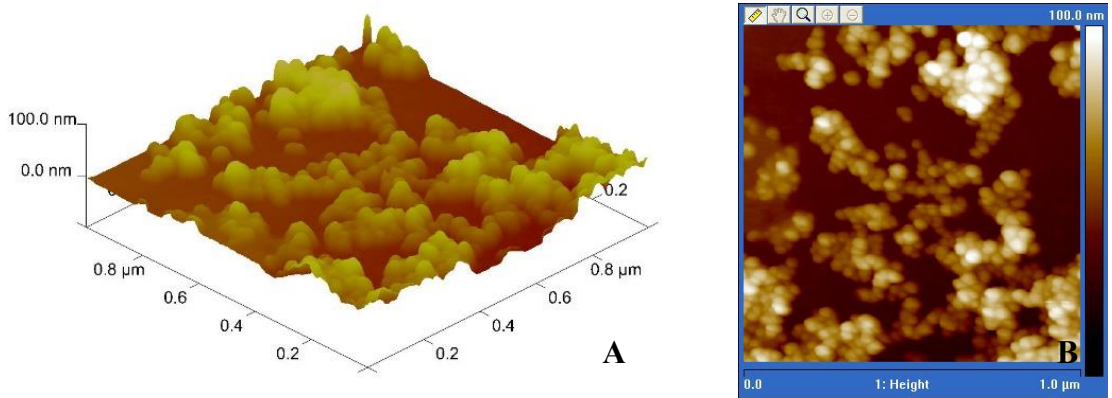


Şekil 4.5. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin TEM görüntüleri.

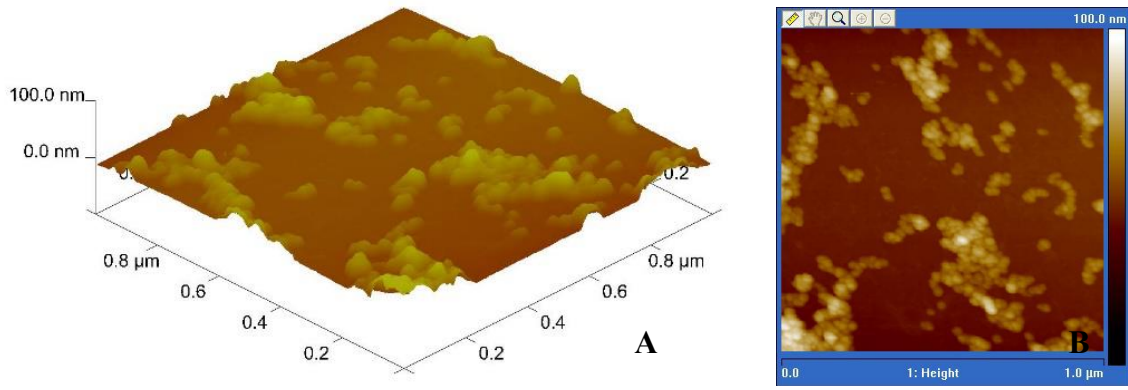


Şekil 4.6. Bakteriyofaj baskılanmış (A) ve baskılanmamış (B) nanopartiküllerin SEM görüntüleri.

Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yüzeyleri atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiş yüzey derinlikleri, 29.2 nm ve 23.8 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7 ve 4.8). Ayrıca, bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin ortalama pürüzlülüğü sırasıyla 5.54 nm ve 4.58 nm olarak bulunmuştur.



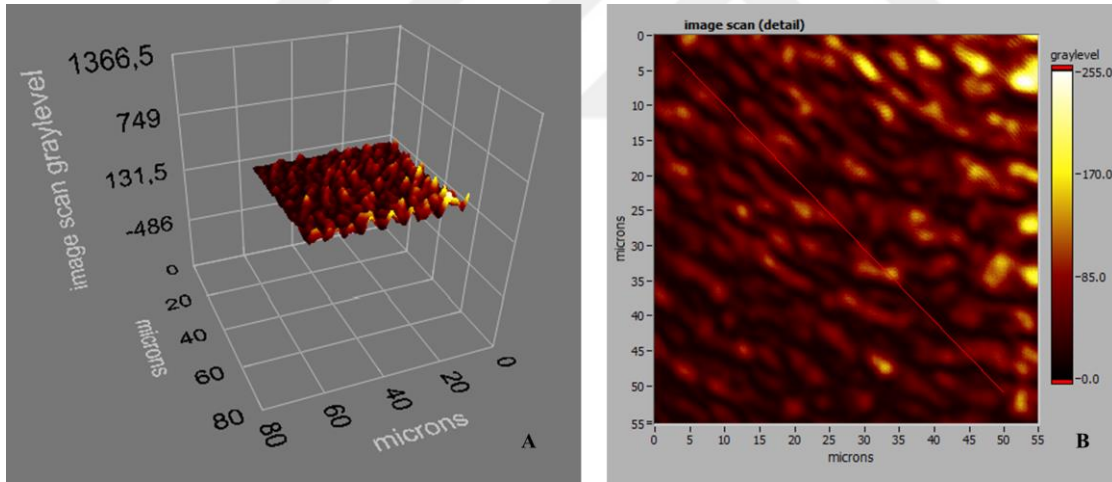
Şekil 4.7. Bakteriyofaj baskılanmış nanopartiküllerin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).



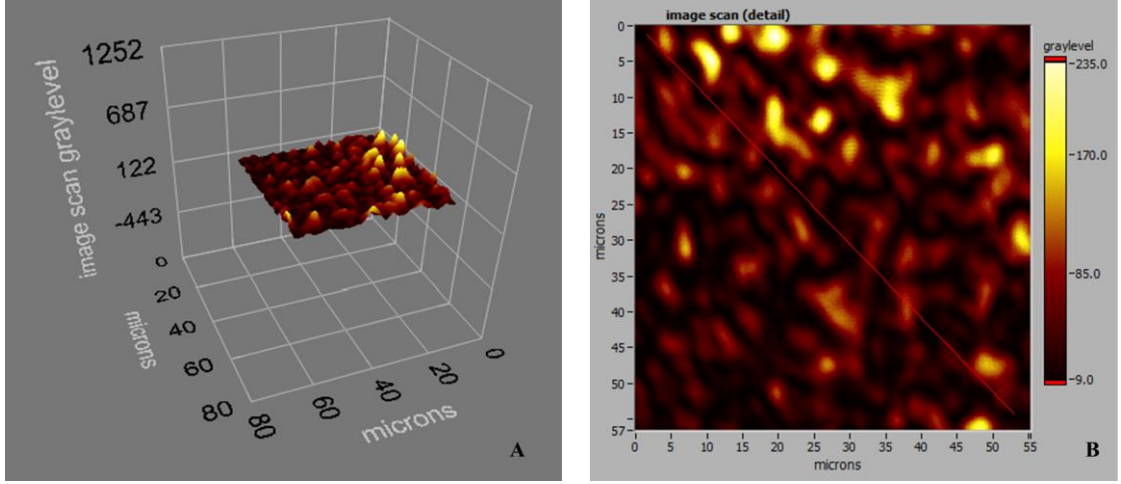
Şekil 4.8. Bakteriyofaj baskılanmamış nanopartiküllerin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).

4.4. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu

Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin yüzey kalınlık değerleri elipsometre cihazı ile incelenmiştir. Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin kalınlık değerleri sırasıyla 82.8 ± 2.7 nm ve 82.6 ± 3.4 nm olarak hesaplanmıştır (Şekil 4.9 ve 4.10).

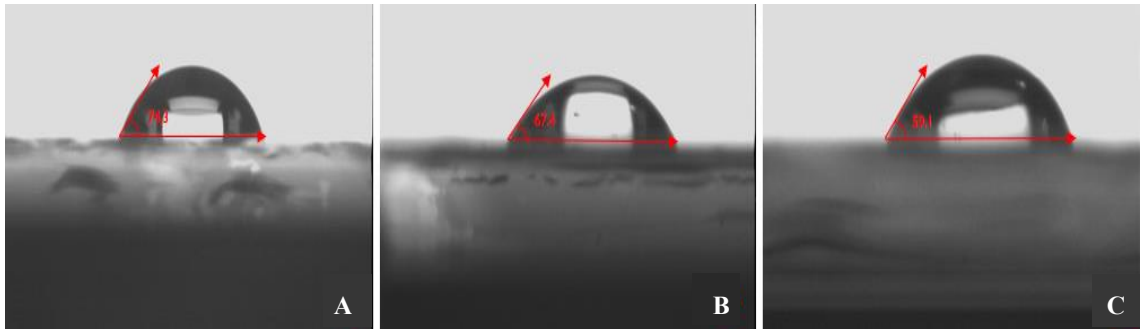


Şekil 4.9. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).



Şekil 4.10. Bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensörlerin elipsometre görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).

Şekil 4.11’de görüldüğü üzere modifiye edilmemiş SPR biyosensör yüzeyinin su temas açısı değeri 74.3° iken bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensör yüzeyinde 67.4° ’ye düşmüş ve bakteriyofaj baskılandıktan sonra da 70.4° ’e düşmüştür. Yüzeyin temas açısı değerinin azalması, yüzeyin hidrofilik karakterinin arttığının göstergesidir. Baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin hazırlanması sırasında fonksiyonel monomer olarak kullanılan fonksiyonel monomer histidin temelli bir malzeme olup oldukça hidrofilik karaktere sahiptir. Bu nedenle, yüzeye hidrofilik karakterde bir polimerin tutturulmuş olması, yüzeyin hidrofilik özelliğini arttırmış ve böylece temas açısı değerinin düşmesine neden olmuştur.

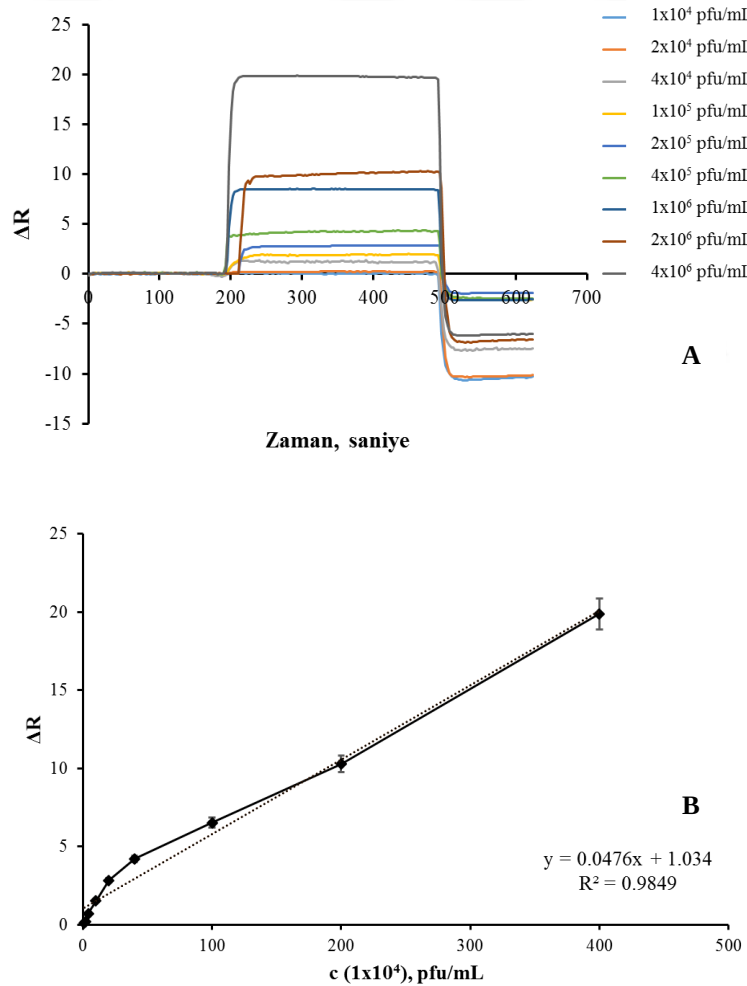


Şekil 4.11. Modifiye edilmemiş (A), bakteriyofaj baskılanmış (B) ve baskılanmamış (C) SPR biyosensörlerin temas açısı ölçümleri.

4.5. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler

Çalışma kapsamında bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler hazırlanmıştır. SPR sinyali ile bakteriyofaj arasındaki etkileşimin değerlendirilmesi

amacıyla bakteriyofaj süspansiyonları (1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL) hazırlanmıştır. Çözeltiler aynı hızda peristaltik pompa kullanılarak SPR biyosensör ile etkileştirilmiştir. Şekil 4.12A’da ise hazırlanan bakteriyofaj çözeltilerinin sisteme verilmesi ile elde edilmiş olan sensorgramlar görülmektedir. Elde edilen sensorgramlar, örneklerin SPR biyosensör ile etkileştirilmesinin ardından elde edilen % kırılmaya (ΔR) karşılık zamanı göstermektedir. Şekil incelendiğinde, bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör yüzeyine artan faj derişimi ile birlikte ΔR kırılma değeri artmaktadır. Şekil 4.12B’de gösterildiği gibi 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL derişim aralığında elde edilen doğrunun denklemi $y=0.0476x-1.034$ ve doğrusallığı $R^2=0.9849$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör, 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL aralığında %98 doğrulukta ölçüm yapabildiği görülmüştür.



Şekil 4.12. Farklı derişimlerdeki bakteriyofaj çözeltileri ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değerleri (A) ve SPR biyosensöre ait derişim ile kırılma değerleri arasındaki ilişki (B).

Şekil 4.13'te nanopartikül temelli SPR biyosensörü ile bakteriyofaj arasındaki denge ve bağlanma kinetik analizleri için elde edilen grafikler verilmiştir. Ayrıca, nanopartikül temelli SPR biyosensörü ile bakteriyofaj arasındaki etkileşimi belirlemek için üç farklı (Scatchard, Langmuir ve Freundlich) adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır. Bu grafiklere ait denklemlerden elde edilen matematiksel katsayılar (ΔR_{maks} , k_a , k_d , K_A ve K_D) Çizelge 4.1'de verilmiştir.

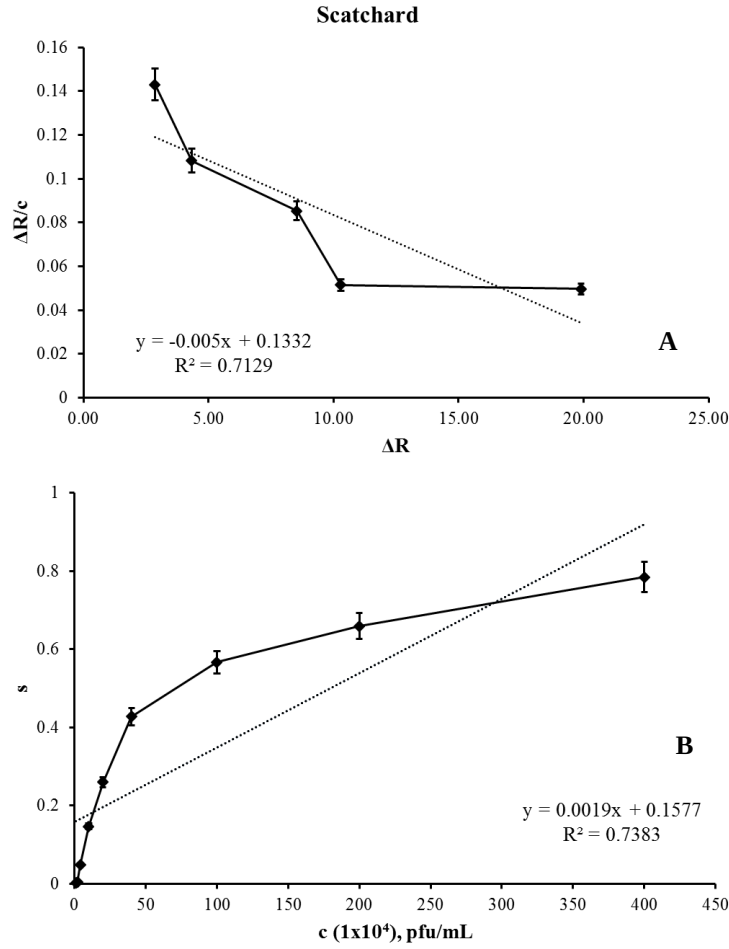
Scatchard : $\Delta R_{denge} / [C] = K_A(\Delta R_{maks} - \Delta R_{denge})$

Langmuir : $\Delta R = \{\Delta R_{maks}[C]/K_D + [C]\}$

Freundlich : $\Delta R = \Delta R_{maks}[C]^{1/n}$

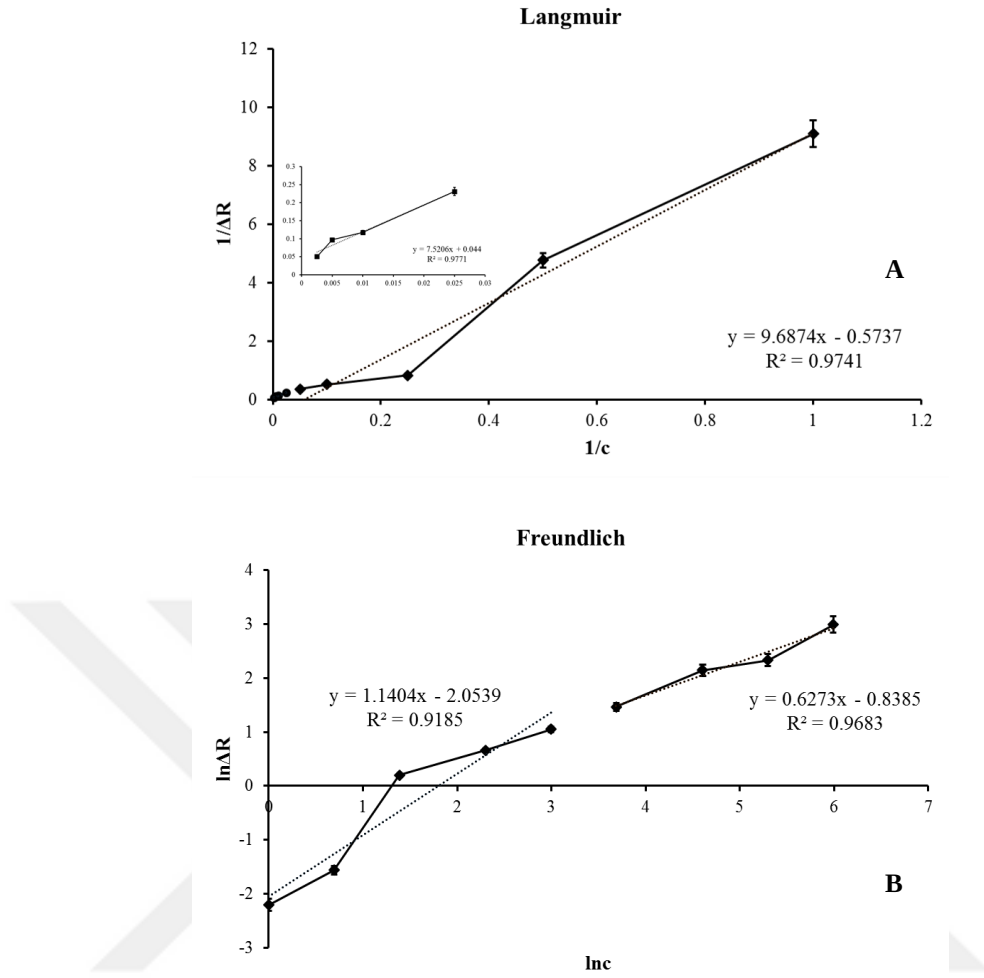
Çizelge 4.1. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitleri.

Scatchard		Bağlanma	
ΔR_{maks}	26.64	$k_a, \text{pfu/mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.002
$K_A, \text{mL/pfu}$	0.005	k_d, s^{-1}	0.158
$K_D, \text{pfu/mL}$	200	$K_A, \text{mL/pfu}$	0.012
R^2	0.71	$K_D, \text{pfu/mL}$	83.0
		R^2	0.74



Şekil 4.13. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Scatchard (A) ve bağlanma (B) kinetik yaklaşımları.

Şekil 4.14 incelendiğinde deneysel olarak elde edilen verilerin Langmuir modeli ile uyumlu olduğu görülmektedir ($R^2=0.9771$). Bu sonuç, hazırlanan nanopartikül temelli SPR biyosensör yüzeyindeki bakteriyofaj bağlanma özelliğinin homojen, eş enerjili, tek tabakalı ve minimum dış etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her iki adsorpsiyon izoterm modelinden elde edilen sonuçlar detaylarıyla Çizelge 4.2’de verilmiştir. Yapılan hesaplamalar sonucunda bağlanma sabitinin (K_A) hem bağlanma kinetik analizinde hem de Scatchard ve Langmuir adsorpsiyon izoterm modellerinde birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca deneysel olarak elde edilen maksimum kırılma değerinin ($\Delta R=19.89$) hesaplanan maksimum kırılma değerlerine ($\Delta R_{\text{maks}}=26.64$ ve $\Delta R_{\text{maks}}=22.73$) yakın olması da yapılan deneylerin teorik matematiksel hesaplamalarla uyuştuğunu göstermiştir.



Şekil 4.14. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon izoterm modelleri. Langmuir (A) ve Freundlich (B).

Çizelge 4.2. Nanopartikül temelli SPR biyosensörü için Langmuir ve Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich	
ΔR_{maks}	22.73	ΔR_{maks}	2.31
K_D , pfu/mL	170.9	$1/n$	0.63
K_A , mL/pfu	0.006	R^2	0.92
R^2	0.98		

T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör ile miktar tayin edebilecek en düşük sınır değeri 6×10^3 pfu/mL olarak hesaplanmıştır.

4.6. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi

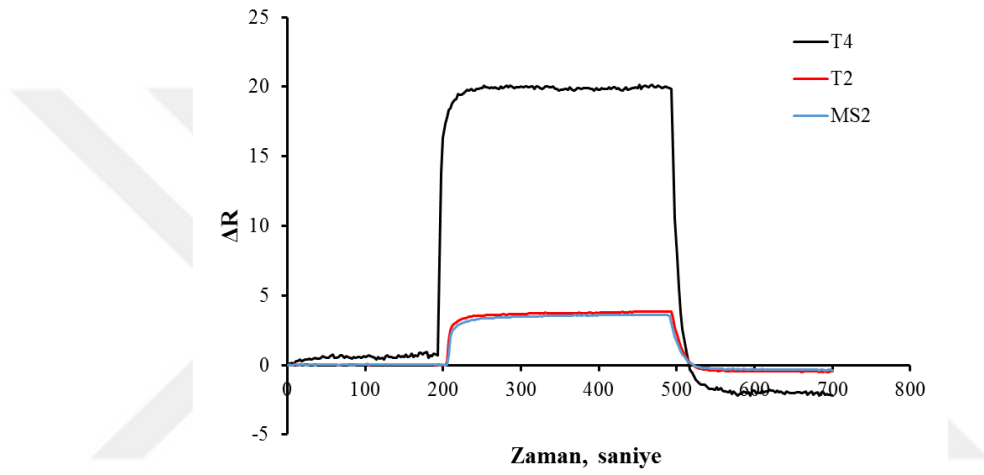
Baskılama seçiciliğini göstermek için baskılanmamış SPR biyosensör hazırlanmış ve iki biyosensör arasında kıyaslama yapılmıştır. T2 ve MS2 bakteriyofajı yarışmacı ajanları kullanılarak hazırlanan örnekler SPR sistemi ile etkileştirilmiştir. Bu örnekler SM tamponunda 1×10^6 pfu/mL derişimde hazırlanmışlardır. Şekil 4.15'te farklı bakteriyofajlar ile hazırlanmış çözelti ile hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün zamana karşı kırılma değerleri görülmektedir. Şekil 4.16 ve 4.17'de gösterildiği gibi baskılanmamış nanopartiküller ile hazırlanan biyosensör T4 bakteriyofaj baskılanarak hazırlanan biyosensöre göre düşük sinyaller vermiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde baskılanmamış SPR biyosensörün anlamlı sinyaller vermediği görülmektedir. Yapılan hesaplamalara göre T4 bakteriyofajına göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları verilmiştir. T4 bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler karşılaştırıldığında T4 bakteriyofaj sinyalinin 19.89'dan 0.68'e düştüğü görülmüştür. Baskılanmış bir polimerin seçiciliği, seçicilik faktörü aracılığıyla yorumlanmaktadır. Hesaplanan seçicilik katsayıları T2 bakteriyofajı için 5.21, MS2 bakteriyofajı için 5.51'dir. 1'in üzerindeki bağıl seçicilik değerleri, moleküler baskılanmış sistemler için kabul edilebilirdir ve bu değerler, baskılama işleminin etkin olduğunu göstermektedir [96].

Küçük miktarda diğer rekabetçi ajanların adsorpsiyonu spesifik olmayan etkileşimlerle açıklanabilmektedir. Ayrıca, seçicilik katsayılarının hesaplanması, baskılanmış polimerlerin hedefe özgün olduğunu ve baskılanmamış olan değerlere bakıldığında yaklaşık yüksek oranda bir fark olduğunu göstermektedir [97] (Çizelge 4.3) .

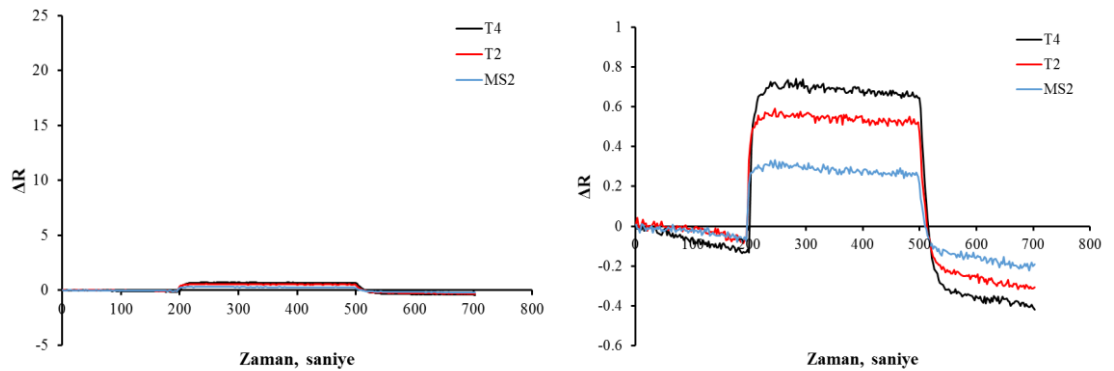
T4 bakteriyofajında Soc ve Hoc adı verilen, kapsid yüzeyini oluşturan iki ana protein bulunmaktadır. T4 bakteriyofajının kapsidi, bitişik halde bulunan gp23 heksamerik kapsomerler arasındaki ara yüzlerde, kapsid yüzeyine bağlanan 870 kopya Soc içerir ve bu yapı moleküler tutkal benzeri bir görev yapar. Birçok T4 benzeri bakteriyofaj, kapsidi kararlı hale getiren homolog Soc benzeri moleküllere sahiptir [98].

Baskılanmış polimerler hazırlanırken çalışmada kullanılan fonksiyonel monomer histidin temelli bir monomerdur. Histidinin moleküler etkileşimlerdeki çok yönlülüğü, kendine özgü moleküler yapısından kaynaklanmaktadır [99]. Beş üyeli aromatik heterosiklik

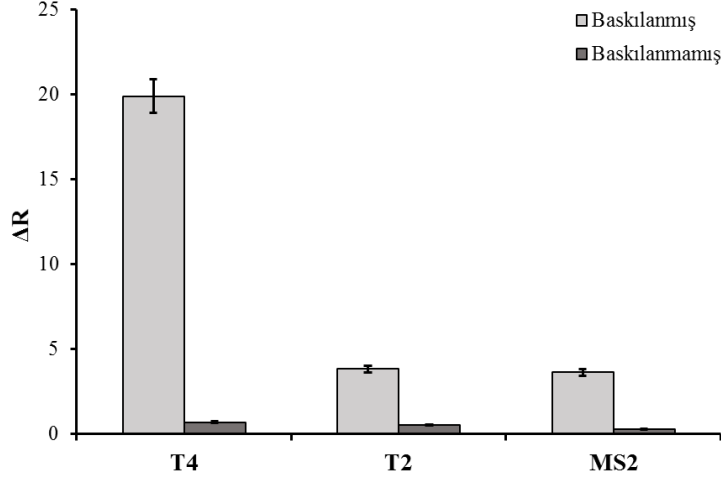
imidazol halkası, histidin aminoasitinin yan zincirinde bulunmaktadır [100]. İmidazol, $pK_a=6.5$ civarında asidik iyonlaşma sabitine sahip iyonize edilebilir bir grup; metalik katyonların koordine edici bir ligand (örneğin, Ca^{2+} ve Zn^{2+}); ya da bir hidrojen bağ donörü ve alıcısı olarak görev yapabilmektedir [99]. Fonksiyonel monomer ve T4 bakteriyofaj arasındaki etkileşim histidin ve bakteriyofajın sahip olduğu proteinler arasında gerçekleşmiştir. Bakteriyofajın yüzeyinde yer alan proteinler sayesinde fonksiyonel monomer ile elektrostatik ve van der Waals gibi kovalent olmayan etkileşimler meydana gelmiş ve baskılama işleminden sonra nanopartikül üzerinde bakteriyofaja özgü moleküler kavite oluşturulmuştur.



Şekil 4.15. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofajı baskılanmış SPR biyosensörün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.



Şekil 4.16. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofajı baskılanmamış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.



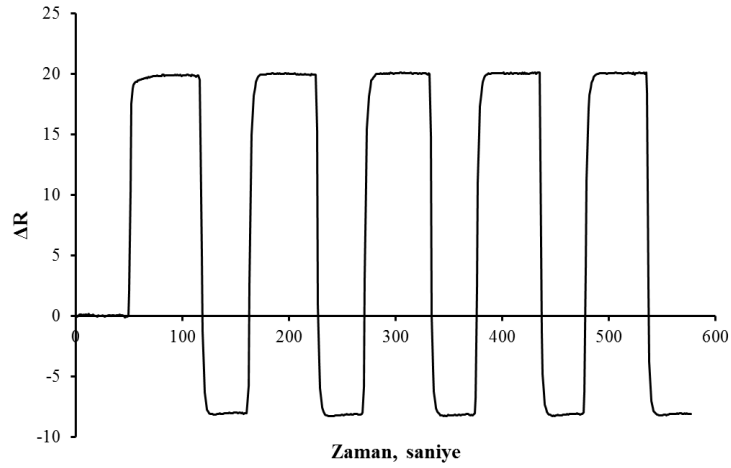
Şekil 4.17. T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile yarışmacı ajanların verdiği zamana karşı kırılma değerleri.

Çizelge 4.3. T4 bakteriyofajına göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k') katsayıları.

	Baskılanmış	k	Baskılanmamış	k	k'
T4	19.89		0.68		
T2	3.82	5.21	0.53	1.28	4.07
MS2	3.61	5.51	0.26	2.62	2.11

4.7. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Tekrarlanabilirliğinin İncelenmesi

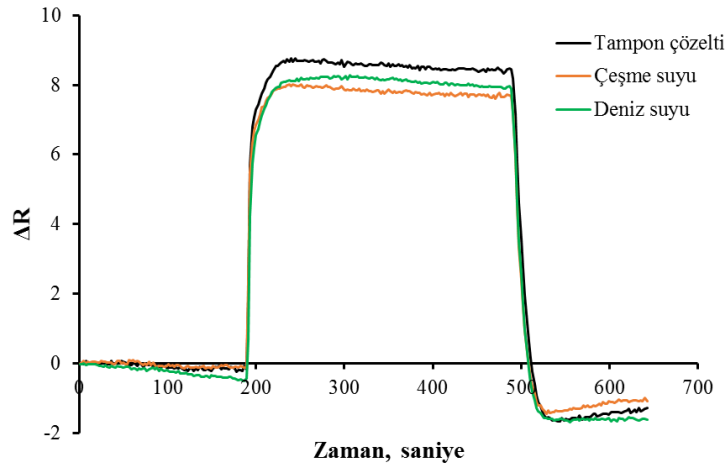
Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün tekrarlanabilirliğini incelemek için 4×10^6 pfu/mL derişiminde bakteriyofaj örnekleri SPR sistemi ile ard arda beş kez etkileştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.18'de verilmiştir. Elde edilen verilere göre, hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün, herhangi bir performans kaybı olmadan tekrar tekrar kullanılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 4.18. Nanopartikül temelli SPR biyosensörün tekrarlanabilirliği.

4.8. Nanopartikül Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri

Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün farklı ortamlarda gerçek zamanlı kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla gerçek örnek analizi yapılmıştır. Şekil 4.19’da deniz suyu ve çeşme suyu artan T4 bakteriyofaj derişimi ile zamana karşı ΔR değerleri görülmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan biyosensör T4 bakteriyofaj örneklerini 91-96% geri kazanım ile tespit edebilmektedir. Bu sonuçlara ek olarak, desorpsiyon ajanı uygulandıktan sonra deniz suyu bulunan diğer bileşenlerle gerçekleşen spesifik olmayan etkileşimler sonucu ΔR değerlerinde negatif yönde bir değişim gözlenmiştir.

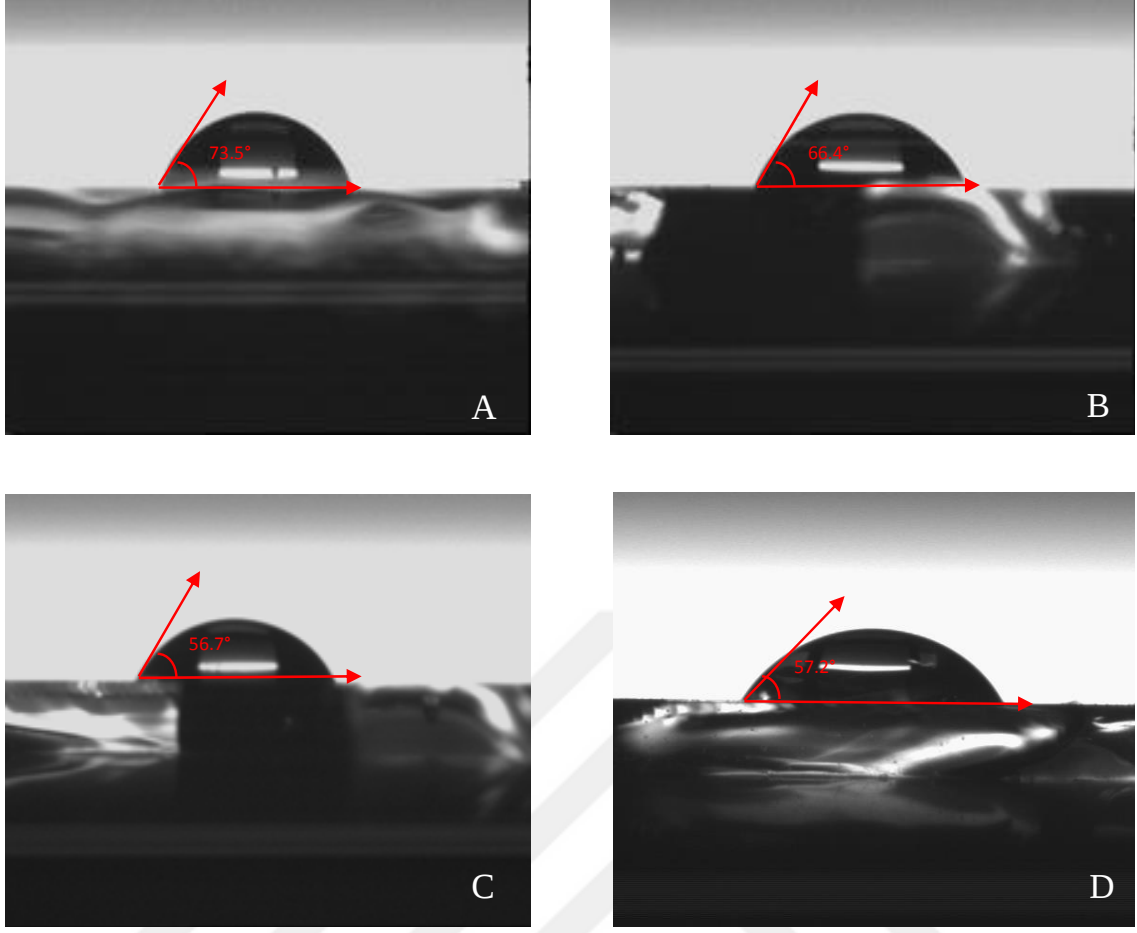


Şekil 4.19. Gerçek örneklerden T4 bakteriyofaj tayini için hazırlanan SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı kırılma değerleri.

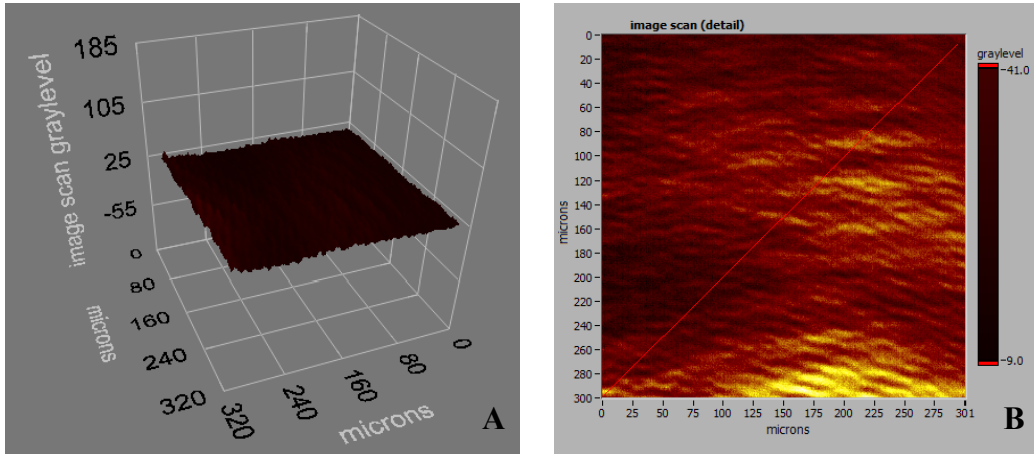
4.9. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerin Karakterizasyonu

Modifiye edilmemiş, edilmiş, baskılanmamış ve baskılanmış SPR biyosensörlerin temas açısı değerleri sırası ile 73.5° ve 66.4° , 56.7° ve 57.2° bulunmuştur. Yüzey modifikasyonu sırasında kullanılan alil merkaptanda bulunan tiyol gruplarından dolayı temas açısı değerinde düşme gözlenmiştir. Baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin hazırlanması sırasında kullanılan fonksiyonel monomer histidin temelli bir malzeme olup oldukça hidrofilik karaktere sahiptir. Bu nedenle, yüzeye hidrofilik karakterde bir polimerin tutturulması, yüzeyin hidrofilik özelliğini arttırmış ve temas açısı değerini düşürmüştür (Şekil 4.20). Ayrıca Şekil 4.21, 4.22 ve 4.23'te yapılan elipsometre ölçümlerinde alillenmiş, baskılanmamış ve T4 bakteriyofajı baskılanmış SPR biyosensör çip yüzeylerinin elipsometre görüntülerine bağlı olarak ortalama kalınlık değerleri 73.6 ± 4.5 , 84.1 ± 4.1 ve 98.9 ± 1.1 nm olarak hesaplanmıştır.

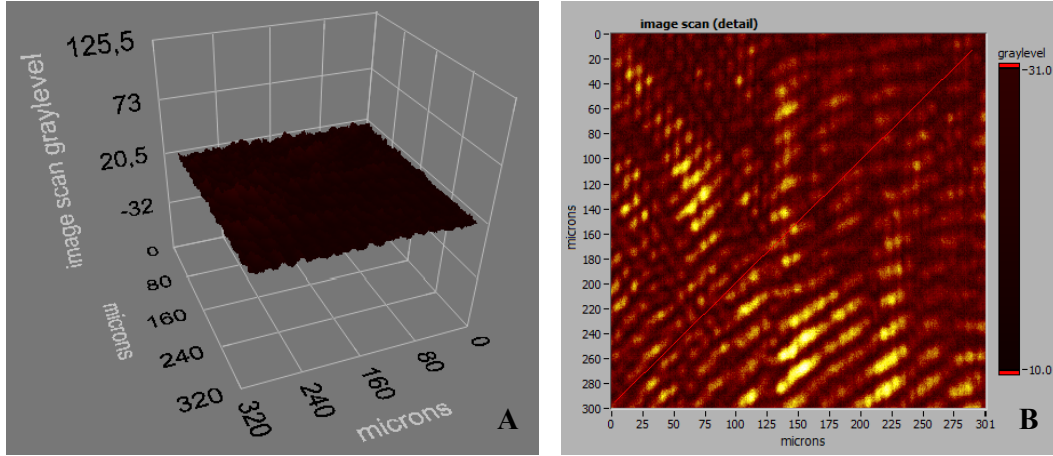
Bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin yüzeyi atomik kuvvet mikroskobu ile karakterize edilmiş ve yüzey derinliği 126 nm olarak belirlenmiştir (Şekil 4.24). Ayrıca, bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin ortalama pürüzlülüğü 3.73 nm olarak bulunmuştur.



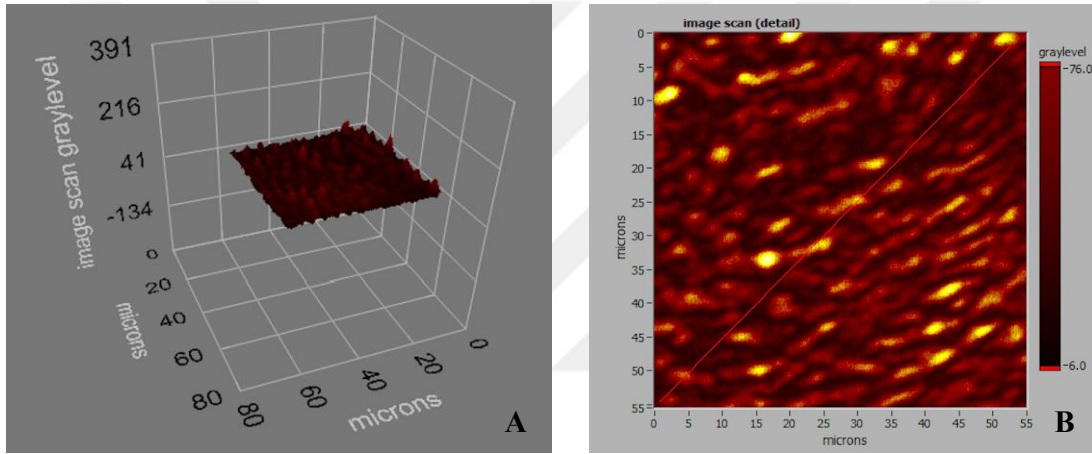
Şekil 4.20. Modifiye edilmemiş (A), edilmiş (B) ve baskılanmamış (C) ve baskılanmış (D) SPR biyosensörlerin temas açısı görüntüleri.



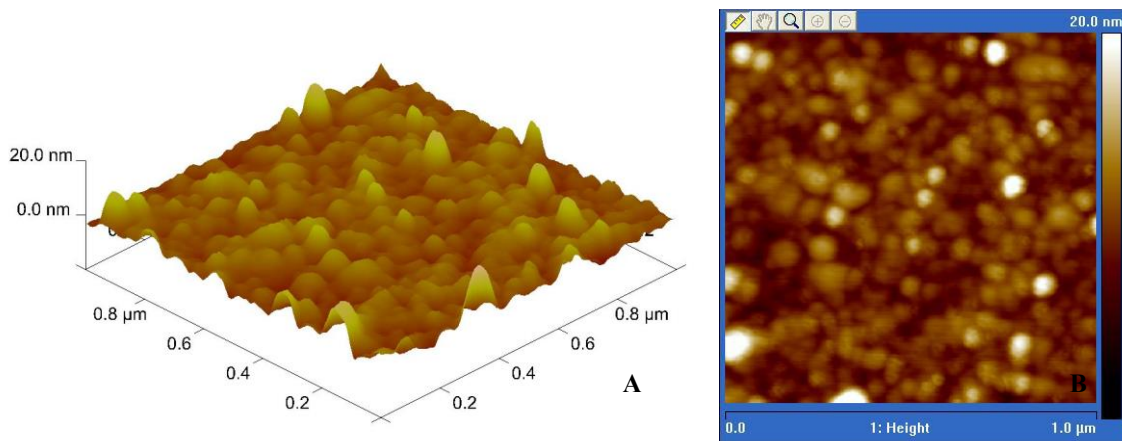
Şekil 4.21. Modifiye edilmiş SPR biyosensörün yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).



Şekil 4.22. Baskılanmamış SPR biyosensör yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).



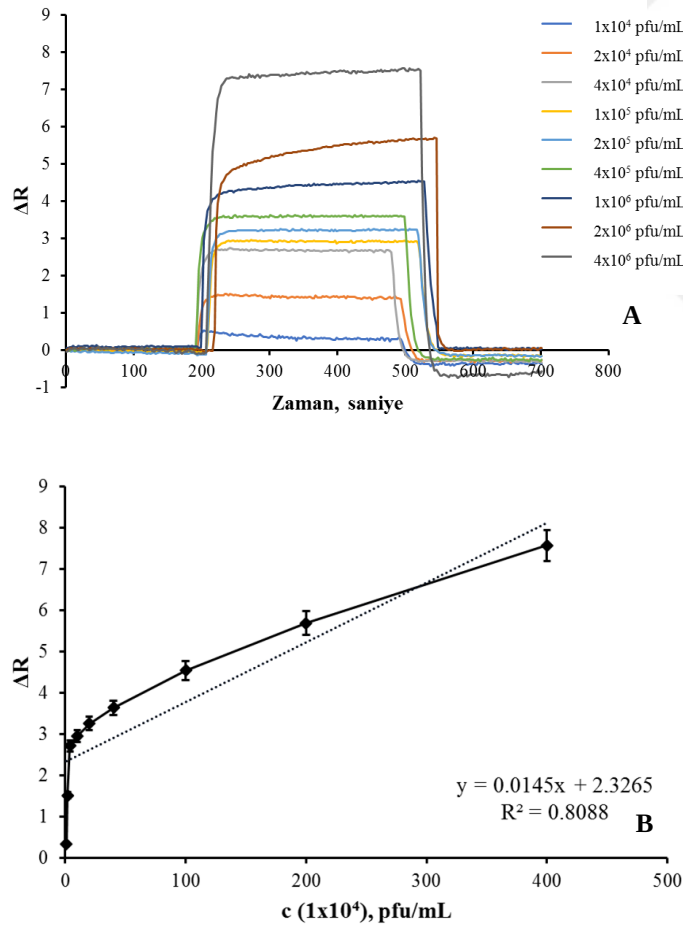
Şekil 4.23. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör yüzeyinin elipsometre görüntüleri (A:3 boyutlu, B: 2 boyutlu).



Şekil 4.24. Bakteriyofaj baskılanmış nanofilmin AFM görüntüleri (A: 3 boyutlu, B: 2 boyutlu).

4.10. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörler ile Kinetik Analizler

SPR sinyali ile faj arasındaki ilişkinin değerlendirilebilmesi amacıyla farklı derişimlerde (1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL) bakteriyofaj süspansiyonları hazırlanmıştır. Şekil 4.25A'da hazırlanan bakteriyofaj çözeltilerinin sisteme verilmesi ile elde edilmiş olan sensorgramlar görülmektedir. Elde edilen sensorgramlar, örneklerin SPR biyosensöre uygulanması ile elde edilen % kırılmaya (ΔR) karşılık zamanı göstermektedir. Şekilde de görüldüğü gibi SPR biyosensör yüzeyine artan faj derişimi ile birlikte ΔR kırılma değeri artmaktadır. Şekil 4.25B'de gösterildiği gibi 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL derişim aralığında elde edilen doğrunun denklemi $y = 0.0145x + 2.3265$ ve doğrusallığı $R^2 = 0.8088$ olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre, hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör, 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL aralığında %81 doğrulukta ölçüm yapabilmektedir.



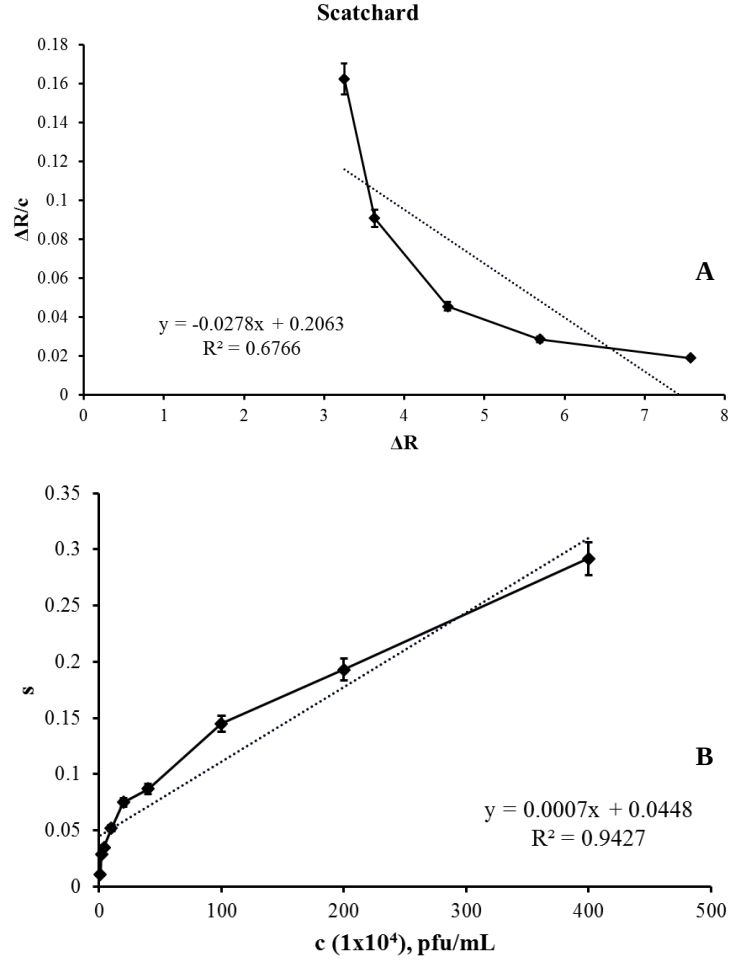
Şekil 4.25. Farklı derişimlerdeki bakteriyofaj çözeltileri ve SPR biyosensör arasındaki etkileşimlerin zamana göre kırılma değerleri (A) ve bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensöre ait derişim ile kırılma değerleri arasındaki ilişki (B).

Şekil 4.26’da bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörü ile bakteriyofaj arasındaki denge ve bağlanma kinetik analizi için çizilen doğrular verilmiştir. Ayrıca, bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörü ile bakteriyofaj arasındaki etkileşim modelini belirlemek amacıyla üç farklı (Scatchard, Langmuir ve Freundlich) adsorpsiyon izoterm modeli uygulanmıştır.

Çizelge 4.4. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için kinetik hız sabitleri.

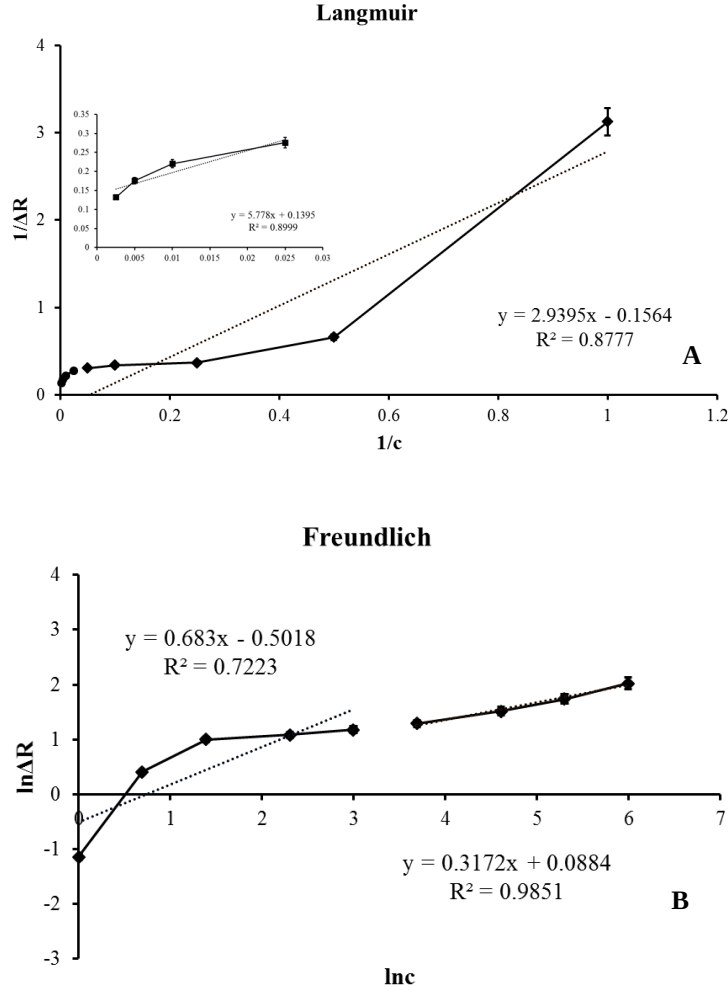
Scatchard		Bağlanma	
ΔR_{maks}	7.42	$k_a, \text{pfu/mL}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$	0.001
$K_A, \text{mL/pfu}$	0.03	k_d, s^{-1}	0.045
$K_D, \text{pfu/mL}$	36.0	$K_A, \text{mL/pfu}$	0.02
R^2	0.68	$K_D, \text{pfu/mL}$	64.0
		R^2	0.94

Yapılan hesaplamalar sonucunda bağlanma sabitinin (K_A) hem bağlanma kinetik analizinde hem de Scatchard ve Langmuir adsorpsiyon izoterm modellerinde birbirine yakın olduğu gözlenmiştir. Ayrıca deneysel olarak elde edilen maksimum kırılma değerinin ($\Delta R=7.57$) hesaplanan maksimum kırılma değerlerine ($\Delta R_{maks}=7.42$ ve $\Delta R_{maks}=7.17$) yakın olması da yapılan deneylerin teorik matematiksel hesaplamalarla uyuştuğunu göstermiştir.



Şekil 4.26. Kinetik hız sabitlerinin belirlenmesi. Scatchard (A) ve bağlanma (B) kinetik yaklaşımları.

Şekil 4.27 incelendiğinde deneysel olarak elde edilen verilerin Langmuir modeli ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu sonuç, hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör yüzeyindeki bakteriyofaj bağlanma özelliklerinin homojen dağılımlı, tek tabakalı, eş enerjili ve minimum yanıl etkileşimli olduğunu göstermektedir. Her iki adsorpsiyon izoterm modelinden elde edilen sonuçlar detaylarıyla Çizelge 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.27. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için adsorpsiyon izoterm modelleri. Langmuir (A) ve Freundlich (B).

Çizelge 4.5. Nanofilm temelli SPR biyosensörü için Langmuir ve Freundlich parametreleri.

Langmuir		Freundlich	
ΔR_{maks}	7.17	ΔR_{maks}	1.09
K_D , pfu/mL	41.4	$1/n$	0.32
K_A , mL/pfu	0.03	R^2	0.72
R^2	0.90		

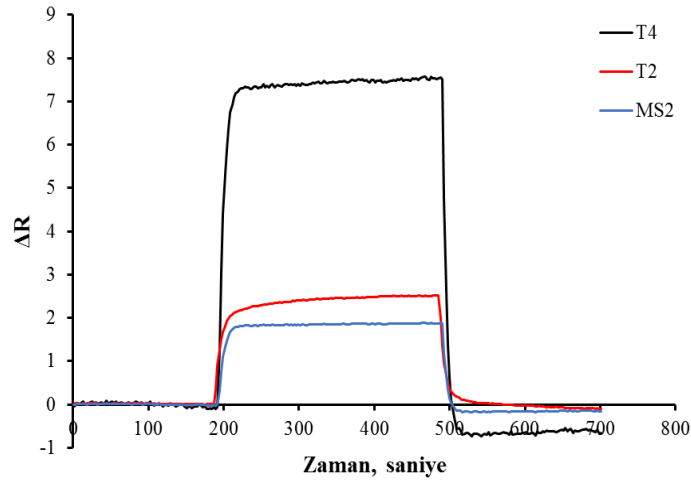
T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensör ile miktar tayin edebilecek sınır değeri hesaplanmıştır. Tayin limiti, 8×10^3 pfu/mL olarak bulunmuştur.

4.11. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörlerinin Seçiciliğinin İncelenmesi

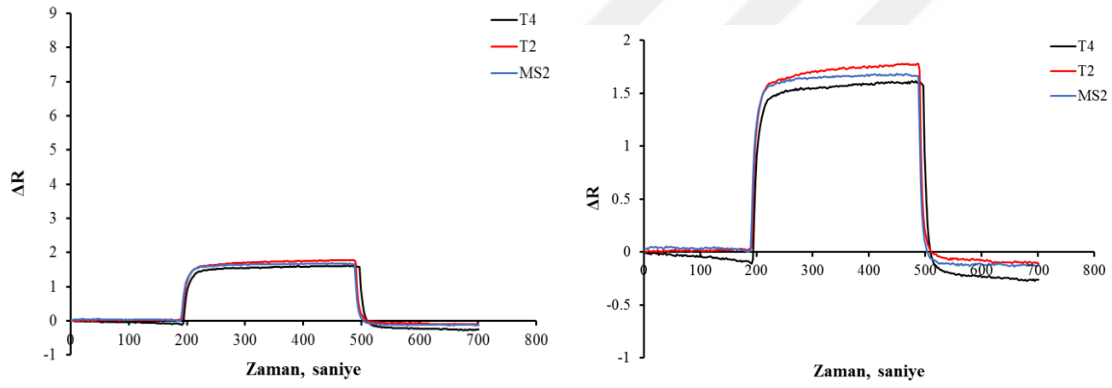
Baskılama seçiciliğini göstermek için baskılanmamış SPR biyosensör hazırlanmış ve iki sensör arasında kıyaslama yapılmıştır. T2 ve MS2 bakteriyofajı yarışmacı ajanları kullanılarak oluşturulan çözeltiler 1×10^6 pfu/mL derişimde hazırlanarak SPR sistemine verilmiştir. Şekil 4.28’de farklı fajlar ile hazırlanmış çözeltiler ile hazırlanan bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün zamana karşı ΔR sensorgramı görölmektedir. Şekil 4.29 ve 4.30’da gösterildiğı gibi baskılanmamış nanofilm kullanılarak hazırlanan biyosensör T4 bakteriyofaj baskılanarak hazırlanan biyosensöre göre düşük sinyaller vermiştir. Elde edilen sonuçlar incelendiğinde baskılanmamış SPR biyosensörün 3 farklı bakteriyofaj için de birbirine yakın ve anlamlı olmayan sinyaller verdiğı görölmektedir. Yapılan hesaplamalara göre T4 bakteriyofajına göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik ve bağıl seçicilik katsayıları Çizelge 4.6’da verilmiştir. T4 bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler karşılaştırıldığında T4 bakteriyofaj sinyalinin 7.57’den 1.61’e düştüğü görölmüştür. Hesaplanan seçicilik katsayıları T2 bakteriyofajı için 3.02, MS2 bakteriyofajı için 4.03’tür.

Çizelge 4.6. T4 bakteriyofaja göre T2 ve MS2 bakteriyofajları için seçicilik (k) ve bağıl seçicilik (k’) katsayıları.

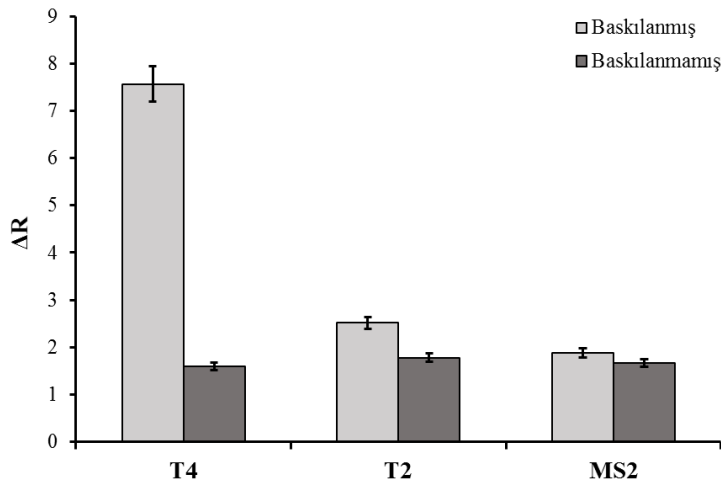
	Baskılanmış	k	Baskılanmamış	k	k’
T4	7.57		1.61		
T2	2.51	3.02	1.77	0.91	3.32
MS2	1.88	4.03	1.67	0.96	4.21



Şekil 4.28. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.



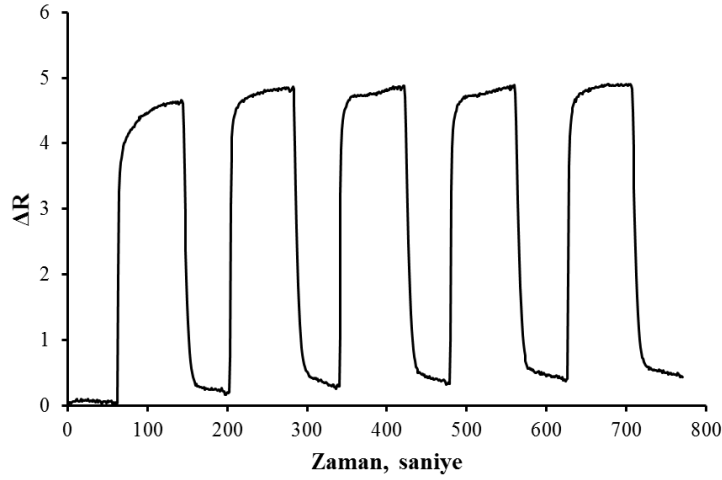
Şekil 4.29. Farklı yarışmacı ajanlar kullanılarak T4 bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensörünün verdiği zamana karşı kırılma değerleri.



Şekil 4.30. T4 bakteriyofajı baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörler ile yarışmacı ajanların verdiği zamana karşı kırılma değerleri.

4.12. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Tekrar Kullanılabilirliğinin İncelenmesi

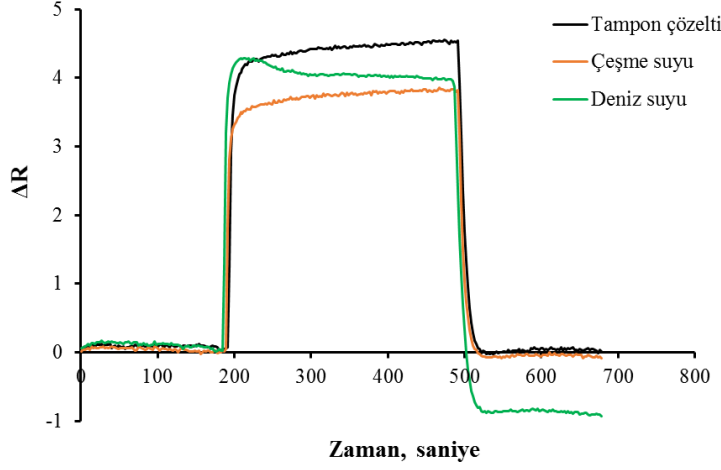
Bakteriyofaj baskılanmış nanofilm kullanılarak hazırlanan SPR biyosensörün tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla 4×10^6 pfu/mL derişiminde faj içeren çözeltiler SPR sistemi ile tekrarlı (beş kez) bir şekilde etkileştirilmiş ve sonuçlar Şekil 4.31’de verilmiştir. Bu sonuçlara göre hazırlanan SPR biyosensörün herhangi bir performans kaybı olmadan tekrar tekrar kullanılabilceğı gösterilmiştir.



Şekil 4.31. Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün tekrarlanabilirliği.

4.13. Nanofilm Temelli SPR Biyosensörün Gerçek Örnek Analizleri

Bakteriyofaj baskılanmış SPR biyosensörün farklı ortamlarda gerçek zamanlı kullanılabilirliğini araştırmak amacıyla gerçek örnek analizi yapılmıştır. Şekil 4.32’de deniz suyunda ve çeşme suyunda artan T4 bakteriyofaj derişimi ile zamana karşı artan ΔR değerleri görölmektedir. Elde edilen sonuçlara göre, hazırlanan sensör farklı derişimde olan T4 bakteriyofaj örneklerini 85-90% geri kazanım ile tespit edebilmektedir. Bu sonuçlara ek olarak, desorpsiyon ajanı uygulandıktan sonra deniz suyunda bulunan diğer bileşenlerle gerçekleşen spesifik olmayan etkileşimler sonucu ΔR değerlerinde negatif yönde bir derişim gözlenmiştir.



Şekil 4.32. Gerçek örneklerden T4 bakteriyofaj tayini için hazırlanan SPR biyosensörünün kullanımını gösteren zamana karşı kırılma değerleri.

Çizelge 4.7’de literatürde yer alan bakteriyofaj tespitine yönelik çalışmaların bir karşılaştırılması verilmiştir. Bu çalışmalar ayrıntılı incelendiğinde Altıntaş [20] ve çalışma arkadaşlarının moleküler baskılanmış polimer nanopartikülleri ile yüzey plazmon rezonans biyosensör kullanarak MS2 bakteriyofajını tespit ettiği görülmektedir. MS2 bakteriyofajı silika mikrokürelere bağlandıktan sonra baskılanmış polimerlerin hazırlanması sırasında şablon olarak kullanılmıştır. Yüksek afinitede bağlanma bölgesine sahip nanopartiküllerin boyutu 200-230 nm aralığında ölçülmüş ve bu nanopartiküller kullanılarak hazırlanan biyosensörde tayin limiti 5×10^6 pfu/mL olarak verilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre bu tez kapsamında sentezlenen nanopartiküllerin boyutu bu çalışmaya göre oldukça küçüktür (83 nm) olarak rapor edilmiştir. SPR biyosensörün tayin limiti 6×10^3 pfu/mL olarak hesaplanmıştır.

Nanopartiküller, büyük yüzey hacim oranlarından dolayı biyomoleküler tanımayı artırır ve böylece yüzeye immobilize olan biyomoleküllerin miktarını da artmış olur. Bunların sonucunda da bağlanma olaylarının sayısı maksimuma çıkmaktadır. Sonuç olarak, nanopartiküller, optik veya elektrokimyasal dönüştürücülerin yüksek hassasiyetiyle birleştiğinde, ultra hassas algılamanın temelini belirleyen muazzam bir sinyal iyileştirmesi sağlarlar [101].

Bir diğer yüzey plazmon rezonans biyosensör kullanılarak yapılan çalışmada Garcia Aljaro vd [19]. SPR altın biyosensör yüzeyi avidin-biotin ile modifiye edildikten sonra konak hücre olan *E.coli* WG5’i yüzeye immobilize edilmiştir. Somatik kolifajların tespiti

için kullanılan biyosensör 10^2 pfu/mL tayin limiti ile tespit yapabilmektedir. Yapılan bu çalışmada bakteriyofajları tayin etmek için minimum 120 dakika inkübasyon süresi gerektiğini belirtmişlerdir. Bir kıyaslama yapıldığında moleküler baskılanmış polimerler kullanıldığında herhangi bir inkübasyona ya da etiketlemeye ihtiyaç duyulmadığı görülmektedir.

Bir biyosensör hazırlanırken kullanılan malzeme bileşeni etkin bir biyosensörün en önemli yapılarındandır. Çünkü tanıma seçiciliği ve özgüllüğünü, tespit limitlerini ve elde edilen sonuçların genel kalitesini ve sağlamlığını tanımlamaktadır. Polimer temelli reseptörler, seri üretimleri, kolay hazırlanmaları, gelişmiş raf ömürleri, maliyet olanakları ve performanstaki değişimi potansiyel olarak en aza indirme olasılıkları nedeniyle dikkat çekmektedir [102].

Ertürk vd. [21], *E.coli* bakteriyofajı tespit etmek için kapasitif bir biyosensör hazırlamışlardır. Bu bağlamda bu tez çalışmasına benzer olarak mikro-temas baskılama yöntemi kullanılmıştır. Kullanılan kapasitif biyosensörün altın elektroduna, hazırlanan bakteriyofaj damgası kullanılarak mikro-temas baskılama yapılmıştır. 1×10^1 - 1×10^5 pfu/mL aralığında derişim taraması yapılmış ve tayin limiti 10 pfu/mL olarak rapor edilmiştir. Çalışmamızda benzer olarak mikro-temas yöntemine dayalı SPR biyosensör hazırlanmış ve tayin limiti 8×10^3 pfu/mL olarak bulunmuştur.

Mikro-temas baskılama tekniği, farklı kompozisyonlarla moleküler baskılanmış polimerlerin hızlı ve paralel sentezine izin vermektedir. Çok pahalı olabilen veya sadece sınırlı miktarlarda bulunabilen kalıp moleküller için bir avantaj olan tek tabakalı bir tanıma yüzeyi oluşturulur ve az miktarda hedef analitin kullanılması yeterlidir. Birkaç mikrolitre monomer ile hazırlanan polimerizasyon çözeltisini kullanarak aynı anda düzinelerce örnek polimerize edilebilmektedir. Bu teknik kullanarak, proteinleri içeren makro boyuttaki kalıp moleküllerde ortaya çıkan potansiyel çözünürlük problemlerinden de kaçınılmış olur [103]. Mikro-temas baskılamanın bu avantajları göz önüne alındığında mikroorganizmalar gibi büyük boyuttaki analitlere uygun polimerler hazırlamak için uygun olduğu görülmektedir.

Bunların yanı sıra bakteriyofaj tayini için farklı biyosensör tipleri farklı malzemeler kullanılarak da hazırlanabilmektedir. Guliy [31] ve çalışma arkadaşları *Azospirillum lipoferum* SR65 bakteriyofajı FA1-SR65 için elektroakustik bir biyosensör hazırlamıştır. Tanıma elementi olarak antifaj antikorları kullanılmıştır. Tayin limiti 10^6 pfu/mL olarak

rapor edilmiştir. Reta [104] ve arkadaşları ise tanıma elementi olarak antikorları kullanarak hazırladıkları elektrokimyasal bir biyosensör ile MS2 bakteriyofajını 6 pfu/mL tayin limiti ile, Janczuk-Richter vd. [35] yine tanıma elementi olarak antikorları kullanarak T7 bakteriyofajını 5×10^3 pfu/mL tayin limiti ile tespit edebilmişlerdir.

Antikorlar biyosensör yüzeylerinde uzun yıllardır tanıma elementi olarak kullanılmaktadırlar. Ancak pahalı olmaları, kararlılıklarının düşük olmaları gibi dezavantajları araştırmacıları yeni bir tanıma elementi arayışına itmiştir [105]. Bu bağlamda moleküler baskılanmış polimerler maliyetlerinin düşük olması, hazırlanmalarının kolay olması ve kararlılıklarının yüksek olması sebebiyle biyosensör yüzeylerinde kullanılmak için iyi bir alternatiftir.



Çizelge 4.7. Nanopartikül ve nanofilm temelli SPR biyosensörlerin literatürdeki diğer çalışmalar ile kıyaslanması.

Sensör tipi	Bakteriyofaj	Tayin aralığı	Tayin limiti	Seçicilik	Gerçek örnek	Kaynak
Yüzey plazmon rezonans	MS2 bakteriyofaj	0.33-27 pmol	5×10^6 pfu/mL	QB bakteriyofaj, vankomisin	Belirtilmemiş	[20]
Kapasitif	<i>E.coli</i> bakteriyofajı	1.0×10^1 - 1.0×10^5 pfu/mL	10 pfu/mL	<i>Propionibacterium acnes</i> bakteriyofajı	Nehir suyu	[21]
Elektroakustik	Bakteriyofaj FAI-SR65	10^6 - 10^9 pfu/mL	10^6 pfu/mL	Bakteriyofaj M13K07	Belirtilmemiş	[31]
Elektrokimyasal	MS2 bakteriyofaj	1 - 10^{10} pfu/mL	6 pfu/mL	Belirtilmemiş	Depo suyu	[104]
İmmünosensör	T7 bakteriyofaj	5×10^3 - 5×10^9 pfu/mL	5×10^3 pfu/mL.	MS2 bakteriyofaj	Belirtilmemiş	[35]
Yüzey plazmon rezonans	Ø X174 bakteriyofaj	10^3 - 10^8 pfu/mL	10^2 pfu/mL	Belirtilmemiş	Kentsel atıksu	[19]
Yüzey plazmon rezonans	T4 bakteriyofaj	1×10^4-4×10^6 pfu/mL	6×10^3 ve 8×10^3 pfu/mL	MS2 ve T2 bakteriyofajları	Deniz ve çeşme suyu	Bu çalışma

5. YORUM

- Kalıp bakteriyofaj olan T4 bakteriyofajı çift tabaka agar yöntemiyle konak mikroorganizma *E.coli* ATCC 11303 ile 37°C’de 24 saat boyunca statik koşullarda üretilmiş ve üretilen agar yüzeyinden bakteriyofajlar toplanarak bakteriyofaj solüsyonu hazırlanmıştır.
- Fonksiyonel monomer, metakroil klorür ve L-histidin metil ester kullanılarak sentezlenmiş ve karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir. FTIR analizi sonucunda; monomere ait karakteristik 1655 cm⁻¹ amid I ve 1520 cm⁻¹ amid II gerilme titreşim bantları, 1735 cm⁻¹’de ester bandı ve 3347 cm⁻¹’de geniş hidroksil bandı, NMR analizi sonucunda da yine karakteristik pikler görüntülenmiş ve literatürdeki sonuçlara uygunluk gösterdiği rapor edilmiştir.
- Kalıp bakteriyofaj ve fonksiyonel monomer oranı 2.0:1.0 şeklinde belirlenen ön-kompleks hazırlanmış, ko-monomer olarak HEMA, çapraz bağlayıcı olarak EGDMA kullanılarak mini-emülsiyon polimerizasyon yöntemi ile T4 bakteriyofajı baskılanmış nanopartiküller sentezlenmiştir. Kalıp bakteriyofaj olmadan aynı yöntem ile baskılanmamış nanopartiküller hazırlanmıştır.
- Hazırlanan nanopartiküllerin karakterizasyon çalışmaları zeta boyut analizi, FTIR, SEM, TEM ve AFM kullanılarak yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre baskılanmış nanopartiküller 0.196 çok dağılımlılık belirteci ile birlikte 83.11 nm, baskılanmamış nanopartiküller 0.189 çok dağılımlılık belirteci ile birlikte 51.89 nm boyutlarında sentezlenmiştir. Elde edilen FTIR spektrum sonuçlarına göre ester bandının şiddetlenmesi ve 1735 cm⁻¹’den 1723 cm⁻¹’e kayması polimerleşmenin gerçekleştiğini göstermiştir. TEM ve SEM analizleri ile bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin homojen, küresel ve eş boyutlu olduğu görülmüştür. Bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış nanopartiküllerin yüzeyleri AFM ile analiz edildiğinde, yüzey derinlikleri sırasıyla 29.2 nm ve 23.8 nm olarak belirlenmiş, ayrıca, ortalama pürüzlülükleri sırasıyla 5.54 nm ve 4.58 nm olarak bulunmuştur.
- Hazırlanan nanopartiküllerden 2.5 mM Glisin:HCl (pH 2.5) çözeltisi kullanılarak kalıp fajın desorpsiyonu gerçekleştirildikten sonra nanopartikül çözeltisi biyosensör yüzeyine damlatılmış ve UV polimerizasyon ile immobilizasyonu sağlanmıştır. Biyosensör yüzeyinin karakterizasyonu amacıyla su temas açısı ve

elipsometre analizleri yapılmıştır. Elde edilen su temas açısı sonuçlarına göre modifiye edilmemiş SPR biyosensör yüzeyinin su temas açısı değerinin 74.3° iken bakteriyofaj baskılanmamış SPR biyosensör yüzeyinde 67.4° 'ye düştüğü ve bakteriyofaj baskılandıktan sonra da 70.4° 'e düştüğü görülmektedir. Fonksiyonel monomerin sahip olduğu histidin aminoasitinin hidrofilik karakterinden dolayı yüzeyin hidrofilik özelliğinin arttığı sonuçlar ile doğrulanmıştır. Elipsometre sonuçlara göre ise bakteriyofaj baskılanmış ve baskılanmamış SPR biyosensörlerin ortalama kalınlık değerleri sırasıyla 82.8 ± 2.7 nm ve 82.6 ± 3.4 nm olarak hesaplanmıştır.

- Hazırlanan nanopartikül temelli biyosensörler ile kinetik, seçicilik, tekrarlanabilirlik ve gerçek örnek analizleri yapılmıştır. Hazırlanan biyosensörün 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL derişim aralığında %98 doğrulukta ölçüm yapabildiği rapor edilmiştir. Tayin limiti, 6×10^3 pfu/mL olarak hesaplanmıştır. Seçicilik çalışmaları için T2 ve MS2 bakteriyofajları kullanılmış, hesaplanan seçicilik katsayıları T2 bakteriyofajı için 5.21, MS2 bakteriyofajı için 5.51'dir. Biyosensörün tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla 4×10^6 pfu/mL derişiminde bakteriyofaj içeren çözeltiler SPR sistemi ile tekrarlı bir şekilde etkileştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre herhangi bir performans kaybı olmadan biyosensörün tekrar tekrar kullanılabilceği gösterilmiştir. Gerçek örnek analizleri için fekal kaynaklı mikroorganizma bulunma olasılığı yüksek olan deniz suyu ve çeşme suyu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan biyosensörün T4 bakteriyofajını kompleks ortamlarda dahi %91-96 geri kazanım değeri ile tespit edebildiğini göstermektedir.
- Farklı bir yöntem olarak mikro-temas baskılama ile baskılanmış nanofilmler hazırlanmış ve biyosensör yüzeyinde kullanılarak T4 bakteriyofajı tayini için kullanılmıştır. SPR biyosensör çip yüzeyi allil merkaptan ile modifiye edilmiştir. Böylelikle yüzeyde polimerizasyonun gerçekleşmesi için gerekli olan tiyol grupları oluşturulmuştur. Cam yüzeyler ise sırasıyla HCl, NaOH, APTES ve GA çözeltilerinde bekletilerek modifiye edilmiş ve yüzeyde amino gruplarının aktifleştirilmesi sağlanmıştır. Modifiye edilmiş olan camla T4 bakteriyofaj çözeltileri damlatılıp, immobilize edildikten sonra baskılanmış nanofilmlerin hazırlanmasında kalıp olarak kullanılmıştır. Fonksiyonel monomer olarak MAH, çapraz bağlayıcı olarak EGDMA ve başlatıcı olarak ise AIBN eklendikten sonra

cam yüzey ve SPR çip arasında polimerizasyon gerçekleştirilmiştir. Cam yüzey, çipten ayrıldıktan sonra hazırlanan nanofilm SPR biyosensör sisteminde kullanılmıştır.

- SPR biyosensör yüzeyinin karakterizasyonu temas açısı, elipsometri ve AFM analizleri ile gerçekleştirilmiştir. Modifiye edilmemiş, edilmiş, baskılanmamış ve baskılanmış SPR biyosensörlerin temas açısı değerleri sırası ile 73.5° ve 66.4° , 56.7° ve 57.2° bulunmuştur. Yüzey modifikasyonu sırasında kullanılan alil merkaptanda bulunan tiyol gruplarından dolayı temas açısı değerinde düşme gözlenmiştir. Ayrıca polimerizasyon sırasında kullanılan fonksiyonel monomer, histidin temelli bir malzemedir ve oldukça hidrofilik bir karaktere sahiptir. Bu faktörler, yüzeyin temas açısı değerinde düşme gözlenmesine neden olmaktadır. Elipsometre ölçümlerinde ise alillenmiş, baskılanmamış ve T4 bakteriyofajı baskılanmış SPR biyosensör yüzeylerinin elipsometre görüntülerine bağlı olarak ortalama kalınlık değerleri 73.6 ± 4.5 , 84.1 ± 4.1 ve 98.9 ± 1.1 nm olarak hesaplanmıştır.
- Hazırlanan nanofilm temelli SPR biyosensörler daha sonra kinetik, seçicilik, tekrar kullanılabilirlik ve gerçek örnek analizleri için kullanılmıştır. Hazırlanan biyosensörün 1×10^4 - 4×10^6 pfu/mL derişim aralığında %88 doğrulukta ölçüm yapabildiği rapor edilmiştir. Tayin limiti, 8×10^3 pfu/mL olarak hesaplanmıştır. Seçicilik çalışmaları için T2 ve MS2 bakteriyofajları kullanılmış, seçicilik katsayıları T2 bakteriyofajı için 3.02, MS2 bakteriyofajı için 4.03 olarak 1'in üzerinde hesaplanmıştır. Biyosensörün tekrarlanabilirliğini incelemek amacıyla 4×10^6 pfu/mL derişiminde faj içeren çözeltiler SPR sistemi ile tekrarlı bir şekilde etkileştirilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre herhangi bir performans kaybı olmadan biyosensörün tekrar tekrar kullanılabileceği gösterilmiştir. Gerçek örnek analizleri için fekal kaynaklı mikroorganizma bulunma olasılığı yüksek olan deniz suyu ve çeşme suyu kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, hazırlanan biyosensörün T4 bakteriyofajını kompleks ortamlarda dahi tespit edebildiğini göstermektedir.
- İki farklı yöntemle hazırlanan SPR biyosensörler karşılaştırıldığında her ikisinin de düşük tayin limitleri ile yüksek doğrulukta ölçüm yapabildiği görülmektedir. Ancak, nanopartikül temelli hazırlanan biyosensör, nanofilm temelli biyosensöre göre daha hassas şekilde sonuç vermektedir. Bunun sebebi yüzeye immobilize edilmiş nanopartiküllerin sahip oldukları geniş yüzey alanından dolayı, daha fazla

sayıda bakteriyofajı bağlama yeteneğine sahip olmaları şeklinde açıklanabilmektedir.

- Yer kürenin %75 gibi yüksek bir oranı su olmasına rağmen, temiz su kaynakları giderek azalmaktadır. Bunun sebeplerinden birisi de sulara kanalizasyon sularının karışmasıdır. Suların fekal kaynaklar ile kontaminasyonu, salgın hastalıkları artırarak insan sağlığını etkilemekle birlikte suyun kalitesini de düşürmektedir. Bu yüzden, içme suyunda ya da yüzey sularında patojen mikroorganizma tespiti geliştirmekte olan ülkeler öncelikli olmak üzere fazla önem arz etmektedir.
- Sulara ya da gıdalarda patojen mikroorganizmaların tespiti için sensörler son zamanlarda sıklıkla kullanılmaktadır. Ancak daha önce yapılan çalışmalarda genellikle koliform mikroorganizmalar, özellikle de *E.coli* üzerine sensör geliştirildiği görülmektedir. Moleküler baskılama yöntemine dayalı bakteriyofaj tespiti için sensör geliştirilmesine dayalı literatürde az sayıda çalışma bulunmaktadır.
- Yapılan çalışmanın yüzey sularında ya da içme sularında fekal indikatör mikroorganizma tespitine bir alternatif olacağı ve böylelikle hızlı tespit ile bu sorunun önüne geçilmesine katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

- [1] E. Rochelle-Newall, T.M.H. Nguyen, T.P.Q. Le, O. Sengtaheuanghoung, O. Ribolzi, *Frontiers in Microbiology*, 6 **(2015)** 308.
- [2] S. Park, S. Lee, M. Kim, *KSCE Journal of Civil Engineering*, 19 **(2015)** 2017–2023.
- [3] S.K. Arya, A. Singh, R. Naidoo, P. Wu, M.T. McDermott, S. Evoy, *Analyst*, 136 **(2011)** 486–92.
- [4] N. Ashbolt, W. Grabow, M. Snozzi, *Water Quality: Guidelines, Standards and Health*, **(2001)** 289–316.
- [5] R.T. Noble, D.F. Moore, M.K. Leecaster, C.D. McGee, S.B. Weisberg, *Water Research*, 37 **(2003)** 1637–1643.
- [6] L. Su, W. Jia, C. Hou, Y. Lei, *Biosensors and Bioelectronics*, 26 **(2011)** 1788–1799.
- [7] J. Homola, *Chemical Reviews*, 108 **(2008)** 462–493.
- [8] Y. Saylan, S. Akgönüllü, D. Çimen, A. Derazshamshir, N. Bereli, F. Yılmaz, A. Denizli, *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 241 **(2017)** 446–454.
- [9] M. Kara, L. Uzun, S. Kolayli, A. Denizli, *The Journal of Applied Polymer Science*, 129 **(2013)** 2273–2279.
- [10] A.B. Boehm, K.E. Graham, W.C. Jennings, *Environmental Science & Technology*, 52 **(2018)** 9634–9645.
- [11] T. Unno, C. Staley, C.M. Brown, D. Han, M.J. Sadowsky, H.G. Hur, *Environmental Microbiology*, 20 **(2018)** 3132–3140.
- [12] J. Jofre, F. Lucena, A.R. Blanch, M. Muniesa, *Water (Switzerland)*, 8 **(2016)** 1–21.
- [13] M.L. Devane, L. Weaver, S.K. Singh, B.J. Gilpin, *The Journal of Environmental Management*, 222 **(2018)** 293–303.
- [14] Y.S. Jiang, T.E. Riedel, J.A. Popoola, B.R. Morrow, S. Cai, A.D. Ellington, S. Bhadra, *Water Research*, 131 **(2018)** 186–195.
- [15] J.D. Plummer, S.C. Long, A.J. Charest, D.O. Roop, *Journal - American Water Works Association*, 106 **(2014)** 87–88.

- [16] Su Kirliliği Kontrolü Yönetmeliği Taslağı-Resmi Gazete, [http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/12/Su Kirliliği ekleri.htm](http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2004/12/Su_Kirliligi_ekleri.htm) **(Erişim tarihi: 23 Temmuz 2019)**.
- [17] D. Toribio-Avedillo, J.M. Díaz, J. Jofre, A.R. Blanch, M. Muniesa, Science of the Total Environment, 655 **(2019)** 263–272.
- [18] M.D. Napier, C. Poole, J.R. Stewart, D.J. Weber, S.T. Glassmeyer, D.W. Kolpin, E.T. Furlong, A.P. Dufour, T.J. Wade, Environmental Science & Technology, 52 **(2018)** 7513–7523.
- [19] C. García-Aljaro, X. Muñoz-Berbel, A.T.A. Jenkins, A.R. Blanch, F.X. Muñoz, Applied and Environmental Microbiology, 74 **(2008)** 4054–4058.
- [20] Z. Altintas, M. Gittens, A. Guerreiro, K.-A. Thompson, J. Walker, S. Piletsky, I.E. Tothill, Analytical Chemistry, 87 **(2015)** 6801–7.
- [21] G. Ertürk, R. Lood, Sensors Actuators B: Chemical. 258 **(2017)** 535–543.
- [22] Z. Hosseinidoust, T.G.M. Van De Ven, N. Tufenkji, Bacterial capture efficiency and antimicrobial activity of phage-functionalized model surfaces, Langmuir. 27 **(2011)** 5472–5480.
- [23] M.L. Yap, M.G. Rossmann, Structure and function of bacteriophage T4, Future Microbiology, 9 **(2014)** 1319–1327.
- [24] Macromolecular Assembly in Cell Biology, T.D. Pollard, W. C. Earnshaw, J. Lippincott-Schwartz, G. T. Johnson (Eds), Elsevier, Chapter 5, **2017**.
- [25] P. Hyman, M. van Raaij, Biophysical Reviews, 10 **(2018)** 463–471.
- [26] E. Stone, K. Campbell, I. Grant, O. McAuliffe, Viruses, 11 **(2019)** 567.
- [27] V.B. Rao, L.W. Black, Virology Journal, 7 **(2010)** 1–14.
- [28] Institut Pasteur, Research in Microbiology, 158 **(2007)** 553–554.
- [29] M.H. Adams, Bacteriophages., New York (& London): Inter-science Publishers., **1959**.
- [30] D. Rajnovic, X. Muñoz-Berbel, J. Mas, Fast phage detection and quantification: PLoS One. 14 **(2019)** 1–14.

- [31] I. Guliy, B.D. Zaitsev, I.A. Borodina, Shikhabudinov, S. Staroverov, L.A. Dykman, A.S. Fomin, *Talanta*. 178 **(2018)** 743–750.
- [32] P. Szymczak, F.K. Vogensen, T. Janzen, *The International Dairy Journal*, 91 **(2019)** 18–24.
- [33] E. Brinks, N. Wagner, H. Neve, M. Samtlebe, J. Hinrichs, C.M.A.P. Franz, K.J. Heller, *The International Dairy Journal*, 82 **(2018)** 1–3.
- [34] M.S. Khan, T. Pande, T.G.M. van de Ven, *Colloids Surfaces B Biointerfaces*, 132 **(2015)** 264–270.
- [35] M. Janczuk-Richter, M. Dominik, E. Roźniecka, M. Koba, P. Mikulic, W.J. Bock, M. Łoś, M. Śmietana, J. Niedziółka-Jönsson, *Sensors Actuators, B: Chemical*, 250 **(2017)** 32–38.
- [36] C. Qi, Y. Lin, J. Feng, Z.H. Wang, C.F. Zhu, Y.H. Meng, X.Y. Yan, L.J. Wan, G. Jin, *Virus Research*, 140 **(2009)** 79–84.
- [37] A. Mitra, F. Ignatovich, L. Novotny, *Biosensors and Bioelectronics*, 31 **(2012)** 499–504.
- [38] Y. Wei, L.P. Wong, C.S. Toh, *Analytical Chemistry*, 85 **(2013)** 1350–1357.
- [39] K. Dill, D.D. Montgomery, A.L. Ghindilis, K.R. Schwarzkopf, S.R. Ragsdale, A. V. Oleinikov, *Biosensors and Bioelectronics*, 20 **(2004)** 736–742.
- [40] O.I. Guliy, B.D. Zaitsev, A.M. Shikhabudinov, A.A. Teplykh, I.A. Borodina, S.A. Pavliy, O.S. Larionova, A.S. Fomin, S.A. Staroverov, L.A. Dykman, O.V. Ignatov, *Appl. Applied Biochemistry and Microbiology*, 52 **(2016)** 457–463.
- [41] J. Ali, J. Najeeb, M. Asim Ali, M. Farhan Aslam, A. Raza, *Journal of Biosensors and Bioelectronics*, 08 **(2017)** 1–9.
- [42] L.C. Clark, C. Lyons, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 102 **(1962)** 29–45.
- [43] J.W. Lim, D. Ha, J. Lee, S.K. Lee, T. Kim, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3 **(2015)** 1–13.
- [44] K. Cammann, *Fresenius' Zeitschrift für Analytische Chemie*, 287 **(1977)** 1–9.
- [45] P. Mehrotra, *Journal of Oral Biology and Craniofacial Research*, 6 **(2016)** 153–159.

- [46] S. Sang, Y. Wang, Q. Feng, Y. Wei, J. Ji, W. Zhang, *Critical Reviews in Biotechnology*, 36 **(2016)** 465–481.
- [47] Y. Saylan, Ö. Erdem, S. Ünal, A. Denizli, *Biosensors*. 9 **(2019)** 65.
- [48] A. Halilović, E. Merdan, Ž. Kovačević, L.G. Pokvić, Review of Biosensors for Environmental Field Monitoring In 2019 8th Mediterranean Conference on Embedded Computing (MECO) **(2019)** 10–14.
- [49] S. Barizuddin, S. Bok, *Journal of Nanomedicine and Nanotechnology*, 7 **(2016)** 1-10.
- [50] X. Yan, H. Li, X. Su, *Trends in Analytical Chemistry*, 103 **(2018)** 1–20.
- [51] S. Vigneshvar, C.C. Sudhakumari, B. Senthilkumaran, H. Prakash, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 4 **(2016)** 1–9.
- [52] Y. Saylan, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, N. Bereli, H. Yavuz, A. Denizli, Surface Plasmon Resonance Sensors for Medical Diagnosis, in: C.S.S.R. Kumar (Ed.), *Nanotechnol. Charact. Tools Biosensing Med. Diagnosis*, Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, 425–458. **2018**.
- [53] H.H. Nguyen, J. Park, S. Kang, M. Kim, *Sensors (Switzerland)*, 15 **(2015)** 10481–10510.
- [54] S. Zeng, D. Baillargeat, H.P. Ho, K.T. Yong, *Chemical Society Reviews*, 43 **(2014)** 3426–3452.
- [55] P. Zhang, Y.P. Chen, W. Wang, Y. Shen, J.S. Guo, *Trends in Analytical Chemistry*, 85 **(2016)** 153–165.
- [56] G. Ertürk A. Denizli, in *Yüzey Plazmon Rezonans Sensörler*, A. Denizli, G. Ertürk (Eds.), *Kukla Kirtasiye*, Ankara, **2017**.
- [57] M.E. Çorman, C. Armutcu, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, *RSC Advances*, 6 **(2016)** 88777–88787.
- [58] A. Gültekin, A. Ersöz, A. Denizli, R. Say, *Sensors&Actuators, B: Chemica*, 162 **(2012)** 153–158.
- [59] J.J. Belbruno, *Chemical Reviews*, 119 **(2019)** 94–119.
- [60] J. Pan, W. Chen, Y. Ma, G. Pan, *Chemical Society Reviews*, 47 **(2018)** 5574–5587.

- [61] L. Chen, X. Wang, W. Lu, X. Wu, J. Li, *Chemical Society Reviews*, 45 **(2016)** 2137–2211.
- [62] O.S. Ahmad, T.S. Bedwell, C. Esen, A. Garcia-Cruz, S.A. Piletsky, *Trends in Biotechnology*, 37 **(2019)** 294–309.
- [63] Y. Saylan, A. Denizli, *Sensors*, 18 **(2018)** 3016.
- [64] G. Maduraiveeran, W. Jin, *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, 13 **(2017)** 10–23.
- [65] M. Komiyama, T. Mori, K. Ariga, *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 91 **(2018)** 1075–1111.
- [66] L. Figueiredo, G.L. Erny, L. Santos, A. Alves, *Talanta*, 146 **(2016)** 754–765.
- [67] X. Ding, P.A. Heiden, *Macromolecular Materials and Engineering*, 299 **(2014)** 268–282.
- [68] B. Pluhar, U. Ziener, B. Mizaikoff, *Journal of Materials Chemistry B*, 1 **(2013)** 5489–5495.
- [69] K. Eersels, P. Lieberzeit, P. Wagner, *ACS Sensors*, 1 **(2016)** 1171–1187.
- [70] G. Ertürk, B. Mattiasson, *Journal of Chromatography B*, 1021 **(2016)** 30–44.
- [71] N. Idil, M. Hedström, A. Denizli, B. Mattiasson, *Biosensors and Bioelectronics*, 87 **(2017)** 807–815.
- [72] A. Rachkov, N. Minoura, *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1544 **(2001)** 255–266.
- [73] X.T. Ma, X.W. He, W.Y. Li, Y.K. Zhang, *Sensors & Actuators, B: Chemical*, 246 **(2017)** 879–886.
- [74] C. Ayela, M.E. Benito-Pena, A. Biffis, M. Bompert, D. Carboni et al., *Molecular Imprinting*, K.Haupt, (Ed.), Vol. 325, Springer Science & Business Media. **2012**
- [75] S. Li, S. Cao, M.J. Whitcombe, S.A. Piletsky, *Progress in Polymer Science*, 39 **(2014)** 145–163.
- [76] Y. Saylan, S. Akgönüllü, H. Yavuz, S. Ünal, A. Denizli, F. Yilmaz, E. Özgür, A. Derazshamshir, H. Yavuz, A. Denizli, *Sensors (Switzerland)*. 19 **(2017)** 1279.

- [77] J. Wackerlig, P.A. Lieberzeit, *Sensors & Actuators, B:Chemical*, 207 **(2015)** 144–157.
- [78] K. Karim, F. Breton, R. Rouillon, E. V. Piletska, A. Guerreiro, I. Chianella, S.A. Piletsky, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57 **(2005)** 1795–1808.
- [79] T. Takeuchi, T. Hayashi, S. Ichikawa, A. Kaji, M. Masui, H. Matsumoto, R. Sasao, *Chromatography*, 37 **(2016)** 43–64.
- [80] P.A.G. Cormack, A.Z. Elorza, *Molecularly imprinted polymers: Journal of Chromatography B*, 804 **(2004)** 173–182.
- [81] G. Vasapollo, R. Del Sole, L. Mergola, M.R. Lazzoi, A. Scardino, S. Scorrano, G. Mele, *International Journal of Molecular Sciences*, 12 **(2011)** 5908–5945.
- [82] M. Cieplak, W. Kutner, *Trends in Biotechnology*, 34 **(2016)** 922–941.
- [83] H. Yan, K. Ho Row, *International Journal of Molecular Sciences*, 7 **(2006)** 155–178.
- [84] P. Tekiner, I. Perçin, B. Ergün, H. Yavuz, E. Aksöz, *Journal of Molecular Recognition*, 25 **(2012)** 549–554.
- [85] W.J. Cheong, S.H. Yang, F. Ali, *Journal of Separation Science*, 36 **(2013)** 609–628.
- [86] N. Ayawei, A.N. Ebelegi, D. Wankasi, *Journal of Chemistry*, 2017 **(2017)** 1–11.
- [87] C. Phungpanya, A. Chaipuang, T. Machan, K. Watla-iad, C. Thongpoon, O. Suwantong, *Polymers for Advanced Technologies*, 29 **(2018)** 3075–3084.
- [88] G. Ertürk, *Yüzey Plazmon Rezonans Temelli İmmüoglobulin G Sensörünün Hazırlanması, Yüksek Lisans Tezi, Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2010.*
- [89] O.I. Parisi, M. Ruffo, L. Scrivano, R. Malivindi, A. Vassallo, F. Puoci, *Pharmaceuticals*, 11 **(2018)** 92.
- [90] S. Akgöl, D. Türkmen, A. Denizli, *Journal of Applied Polymer Science*, 93 **(2004)** 2669–2677.
- [91] I. Göktürk, E. Tamahkar, F. Yılmaz, A. Denizli, *Journal of Chromatography B*, 1099 **(2018)** 1–9.

- [92] M.E. Çorman, C. Armutcu, L. Uzun, R. Say, A. Denizli, Colloids Surfaces B Biointerfaces, 123 **(2014)** 831–837.
- [93] L. Su, Y. Jin, Y. Huang, R. Zhao, Journal of Separation Science, 40 **(2017)** 2269–2277.
- [94] A. Denizli, M. Alkan, B. Garipcan, S. Özkara, E. Pişkin, Journal of Chromatography B 795 **(2003)** 93–103.
- [95] A. Derazshamshir, G. Baydemir, M. Andac, R. Say, I.Y. Galaev, A. Denizli, Macromolecular Chemistry and Physics, 211 **(2010)** 657–668.
- [96] Ö. Erdem, Y. Saylan, N. Cihangir, A. Denizli, Biosensors and Bioelectronics. 126 **(2019)** 608–614.
- [97] Y. Wang, E.L. Wang, Z.M. Wu, H. Li, Z. Zhu, X.S. Zhu, Y. Dong, Carbohydrate Polymers, 101 **(2014)** 517–523.
- [98] L. Qin, A. Fokine, E. O'Donnell, V.B. Rao, M.G. Rossmann, Journal of Molecular Biology, 395 **(2010)** 728–741..
- [99] S.M. Liao, Q.S. Du, J.Z. Meng, Z.W. Pang, R.B. Huang, Chemistry Central Journal, 7 **(2013)** 1.
- [100] M.A. Trachsel, P. Ottiger, H.M. Frey, C. Pfaffen, A. Bihlmeier, W. Klopfer, S. Leutwyler, The Journal of Physical Chemistry B, 119 **(2015)** 7778–7790.
- [101] N. Sanvicens, C. Pastells, N. Pascual, M.P. Marco, Trends in Analytical Chemistry, 28 **(2009)** 1243–1252.
- [102] L. Uzun, A.P.F. Turner, Biosensors and Bioelectronics. 76 **(2016)** 131–144.
- [103] G. Ertürk, B. Mattiasson, Sensors (Switzerland). 17 **(2017)** 1–17.
- [104] N. Reta, A. Michelmores, C. Saint, B. Prieto-Simón, N.H. Voelcker, Biosensors and Bioelectronics. 80 **(2016)** 47–53.
- [105] M. Kara, L. Uzun, S. Kolayli, A. Denizli, Journal of Applied Polymer Science, 129 **(2013)** 2273–2279.

EKLER

EK 1 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

1. Erdem Ö., Saylan Y., Cihangir N., Denizli A. “Detection of Bacteriophage Using Molecularly Imprinted Plasmonic Sensors” 14th Nanoscience and Nanotechnology Conference. İzmir, Türkiye. 2018 (Poster Sunumu)
2. Erdem Ö., Saylan Y., Cihangir N., Denizli A. “Sularda T4 Bakteriyofajı Tespitine Yönelik Moleküler Baskılama Yöntemine Dayalı Sensör Geliştirilmesi” 12. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, İzmir, Türkiye. 2018 (Sözlü sunum).
3. Erdem Ö., Saylan Y., Cihangir N., Denizli A. “Development of bacteriophage imprinted based surface plasmon resonance sensor for the detection of faecal pollution” The 8th Graduate Student Symposium on Molecular Imprinting, Berlin, Almanya, 2019 (Poster sunumu)
4. Erdem Ö., Saylan Y., Cihangir N., Denizli A. “Fekal Su Kirliliği Tayinine Yönelik Mikro-Temas Baskılama Yöntemine Dayalı Sensör Geliştirilmesi” 13. Ulusal Afinite Teknikleri Kongresi, İzmir, Türkiye. 2019 (Poster sunumu)



**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU**

**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA**

Tarih:20/09/2019

Tez Başlığı / Konusu: Sularda Fekal Kirlilik Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 70 sayfalık kısmına ilişkin, 20/09/2019 tarihinde ~~şahsım~~/tez danışmanım tarafından Turnitin adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 7'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/~~dâhil~~
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orijinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Özgecan ERDEM
Öğrenci No: N14246354
Anabilim Dalı: Biyoloji
Programı: Biyoteknoloji
Statüsü: ☐ Y.Lisans ☒ Doktora ☐ Bütünleşik Dr.

20.09.2019
Özgecan

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Prof. Dr. Nilüfer CİHANGİR)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Özgecan ERDEM
Doğum yeri : Ankara
Doğum tarihi : 17.02.1988
Medeni hali : Bekar
Yazışma adresi : Kızılarpınarı cd. 74/6 Keçiören/Ankara
Telefon : 0537 364 64 17
Elektronik posta adresi : ozgecanerdem@gmail.com
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Biyoloji Bölümü/Biyoteknoloji Anabilim Dalı

İŞ TECRÜBESİ

2013 (4 ay) – Bilim Laboratuvar Cihazları San. Tic. Ltd. Şti. – Satış Sorumlusu
2017 (8 ay) – Biyans Biyolojik Ürünler Ar-Ge Danışmanlık San. Tic. Ltd. Şti. – Ar-Ge Araştırmacısı

TEZDEN ÜRETİLMİŞ PROJELER VE BÜTÇESİ

1. “Sularda Fekal Kirlilik Tayinine Yönelik Sensör Geliştirilmesi” Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi – Kapsamlı Araştırma Projesi - 96496,53 TL.
2. “Sularda Fekal Kirlilik Tayinine Yönelik Biyosensör Geliştirilmesi” Hacettepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi – Lisansüstü Tez Projesi (Doktora) - 29532,30 TL.

ULUSAL HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. **Erdem Ö.**, Cihangir N. “Color removal of some textile dyes from aqueous solutions using *Trametes versicolor*”. Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, **2017**, 45 (4), 499-507.

ULUSLARARASI HAKEMLİ DERGİLERDE YAYINLANAN MAKALELER

1. **Erdem Ö.**, Saylan Y., Cihangir N., Denizli A. “Molecularly imprinted nanoparticles based plasmonic sensors for real-time *Enterococcus faecalis* detection” Biosensors and Bioelectronics, 2019, 126 608-614.
2. **Erdem Ö.**, Saylan Y., Andaç M., Denizli A. “Molecularly imprinted polymers for removal of metal ions: An alternative treatment method” Biomimetics, 2018, 3(4), 38 (Derleme).
3. Saylan Y., **Erdem Ö.**, Cihangir N., Denizli A. “Detecting fingerprints of waterborne bacteria on a sensor” Chemosensors, 2019, 7(3), 33.
4. Saylan Y., **Erdem Ö.**, Ünal S., Denizli A. “An alternative medical diagnosis method: Biosensors for virus detection”. Biosensors, 2019, 9(2), 65 (Derleme).

ULUSLARARASI HAKEMLİ KİTAPLARDA YAYINLANAN BÖLÜMLER

1. **Erdem Ö.**, Saylan Y., Cihangir N. Chapter 4: Microbial Remediation of Environmental Pollutants, Advances in Environmental Technology, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 50th Year Series, 2018, 91-115. ISBN: 978-975-491-484-9.
2. **Erdem Ö.**, Saylan Y., Cihangir N. Chapter 8: Microbial Disinfections Cartridges, Advances in Environmental Technology, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 50th Year Series, 2018, 159-166. ISBN: 978-975-491-484-9.
3. Saylan Y., **Erdem Ö.**, Yılmaz F., Cihangir N., Denizli A. Chapter 3: Sensor Application for Environmental Pollutants, Affinity Sensors, Hacettepe Journal of Biology and Chemistry, 50th Year Series, 2018, 53-77. ISBN: 978-975-491-466-5.