

T.C.

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

BAKTERİYEL KANSER TEŞHİSİNE YÖNELİK
HIZLI TANI KİTİ TASARLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK ŞENER

HAZİRAN 2020

MUĞLA

T.C.
MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK
ANABİLİM DALI

BAKTERİYEL KANSER TEŞHİSİNE YÖNELİK
HIZLI TANI KİTİ TASARLANMASI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BURAK ŞENER

HAZİRAN 2020

MUĞLA

MUĞLA SITKI KOÇMAN ÜNİVERSİTESİ
Fen Bilimleri Enstitüsü

TEZ ONAYI

BURAK ŞENER tarafından hazırlanan **BAKTERİYEL KANSER TEŞHİSİNE YÖNELİK HIZLI TANI KİTİ TASARLANMASI** başlıklı tezinin, 18/06/2020 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı'nda yüksek lisans derecesi için gerekli şartları sağladığı oybirliği/oyçokluğu ile kabul edilmiştir.

TEZ SINAV JURİSİ

Doç. Dr. İbrahim Çağatay KARAASLAN (**Jüri Başkanı**) İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Hacettepe Üniversitesi, Ankara

Prof. Dr. Ömür BAYSAL (**Danışman**) İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Doç. Dr. Ergun KAYA (**Üye**) İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

ANA BİLİM DALI BAŞKANLIĞI ONAYI

Prof. Dr. Ramazan GÜP İmza:

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı Başkanı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Prof. Dr. Ömür BAYSAL İmza:

Danışman, Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı,
Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla

Savunma Tarihi: 18/06/2020

Tez çalışmalarım sırasında elde ettiğim ve sunduğum tüm sonuç, doküman, bilgi ve belgelerin tarafımdan bizzat ve bu tez çalışması kapsamında elde edildiğini; akademik ve bilimsel etik kurallarına uygun olduğunu beyan ederim. Ayrıca, akademik ve bilimsel etik kuralları gereği bu tez çalışması sırasında elde edilmemiş başkalarına ait tüm orijinal bilgi ve sonuçlara atıf yapıldığını da beyan ederim.

Burak şener

18/06/2020

ÖZET
BAKTERİYEL KANSER TEŞHİSİNE YÖNELİK HIZLI TANI KİTİ
TASARLANMASI

Burak ŞENER

Yüksek Lisans Tezi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Ömür BAYSAL

Haziran 2020, 96 sayfa

Bakteriyel patojen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*'in neden olduğu bakteriyel kanser, önemli bir hastalıktır ve enfekte domates tohumlarının yayılması şeklinde görülen bulaşma kabiliyeti nedeniyle mahsul kaybına neden olur. Bu nedenle, hastalık teşhisi, patojen içermeyen bitki yetiştirme ve verim kaybını azaltmak için hızlı ve güvenilir bir yöntem gereklidir.

Bu çalışmada, domateste bulunan *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) için DNA bazlı, hızlı bir teşhis kitinin prototipini geliştirdik. Teşhis kitinin ana prensibi, kemosenör-DNA hibridizasyonuna dayanmaktadır. Bu amaçla, DNA'ya bağlanabilen ve hibridizasyon oluşturabilen BSP-3 (Burak Sentez Ürünü) ve karbazol kemosenörleri sentezlenmiştir. Cmm izolatından ekstrakte edilen DNA denatüre edilmiş ve tek zincirli DNA elde edilmiştir. Tek zincirli DNA'daki timine bağlanmaları için kemosenörlere adenin bazı eklenmiştir, ancak bu adenin ve timin bazlarının oluşturduğu bağlanma zayıf bir bağlanma olacaktır. Bağlanmanın gerçekleşeceği sabit yüzey olarak nitroselüloz membran seçilmiştir. Membran üzerinde oluşturulan DNA- kemosenör hibritine başka bir tek zincirli Cmm DNA'sı eklendiğinde, birbirine tamamen komplementer olan DNA'ların güçlü bağlanma isteği nedeniyle zayıf olan kemosenör-DNA bağlantısı kesilecektir. Farklı bakteri suşunun DNA'sının ortamda olduğu durumda ise kemosenör-DNA bağlantısı kesilmeyecek ve tek zincirli DNA'ya bağlanmayacaktır. Teşhisler, ortamdaki kemosenör varlığına bağlı olarak gerçekleştirilecektir. Kemosenörler sinyal yayan moleküllerdir ve FTIR spektroskopisi sinyallerin tespiti için kullanılmıştır. Tespit edilen sinyaller, IR analiz yazılımları kullanılarak analiz edilmiştir.

Sonuçlar, iki farklı kemosenörün DNA'ya bağlanabildiğini göstermiş ve testler, ortamda Cmm DNA'sı bulunduğunda kemosenör sinyalinin olmadığını kanıtlamıştır. Farklı bakteri türlerinin DNA'ları ortamdayken BSP-3 kemosenörü sinyal vermeye devam etmiştir. Karbazolde ise bu durum görülememiştir. Bu nedenle BSP-3 karbazole göre daha zayıf sinyaller verse de, doğru teşhis oranı daha yüksektir. Her iki kemosenörün de yüksek tanı oranı vardır ancak veriler,

hibridizasyon sıcaklığı ve kemosensör konsantrasyonu üzerinde daha fazla optimizasyon yapılmasının önemli olduğunu göstermektedir.

Ayrıca, kemosensöre adenin yerine üçlü hidrojen bağı yapan sitozin veya guanin eklenmesi ile sekans bazında spesifite seviyesi, teşhis sürecinde daha yüksek doğruluk oranı elde etmede faydalı olacaktır.

Anahtar Kelimeler: DNA, Kemosensör, Cmm, Karbazol, BSP-3



ABSTRACT
RAPID DIAGNOSTIC KIT DESIGN FOR BACTERIAL CANCER
DIAGNOSIS

Burak ŞENER

Master of Science (M.Sc.)

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Molecular Biology and Genetics

Supervisor: Prof. Dr. Ömür BAYSAL

June 2020, 96 pages

As known bacterial canker caused by bacterial pathogen *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* is an important disease and results in crop losses due to its transmission ability through infected tomato seeds and propagation materials. Therefore, a rapid and confident tool is necessary for the disease diagnosis, pathogen-free cultivation and to cut down of yield losses.

In this study, we have developed the prototype of a rapid diagnosis kit based on DNA for *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (Cmm) on tomato. The main principle of the diagnosis kit relies on chemosensor-DNA hybridization. For this purpose, chemosensors BSP-3 (Burak Synthesis Product) and carbazol, which can bind and forming hybridization, has been synthesized. DNA extracted from Cmm isolate was denatured and single-strand DNA was provided. Adenine bases were added to chemosensors for binding with thymine of single strand of DNA, However, this binding would be weak binding within adenine and thymine bases. Nitro-cellulose membran selected for stabile surface of binding has provided splitting up of chemosensor-DNA binding due to willingness of binding strength within complementary DNAs with each other against to DNA chemosensor hybridization on the formed membrane when a single strand DNA is added. In the case of existence the different bacterial strain of DNA, chemosensor-DNA binding will not split up and will not bind to single-strand DNA. Diagnoses will be realized depending on the existence of chemosensor in medium. Chemosensors are molecules emitting signals, and FTIR spectroscopy were used for detection of the signals and analysed using IR analysis software.

The results showed that two different chemosensors can bind to DNA and the assays proved there is no signal of chemosensors when DNA of Cmm is present in the medium. In the case of existence, the different bacterial species BSP-3 chemosensor continued emitting the signal, but there was no signal of carbazol. That reason BSP-3 has higher accuracy ratio for diagnosis capability though it emits less signal compared to carbazol. Both chemosensors have high diagnosis ratio, but the data

shows that further optimisation on hybridization temperature and adjustments of chemosensors concentration is of importance.

Furthermore, the specificity based on sequence level instead of adenine, cytosine and guanine bases with three hydrogen bonds added to chemosensor will be beneficial for obtaining much higher accuracy ratios in the diagnosis process.

Keywords: DNA, Chemosensor, Cmm, Carbazole, BSP-3



Her zaman yanımda olan Annem, Babam ve Ablama



ÖNSÖZ

Bu tezin yazarı, Prof. Dr. Ömür BAYSAL'a çalışmaları sırasında göstermiş olduğu kolaylıklar ve bilimsel bir çalışmanın ve düşünmenin temellerini öğrettiği için teşekkürü bir borç bilir.

Tezin ana hatlarının belirlenmesinde değerli katkılarını esirgemeyen Dr. Ragıp Soner SİLME'ye, laboratuvar çalışmalarının yürütülmesinde emeği geçen Dr. Öğretim Üyesi Said NADEEM ve Dr. Öğretim Görevlisi Özge TOKUL ÖLMEZ'e şükranlarımı sunarım.

Ayrıca çalışmanın tüm aşamalarında sabırla beni destekleyen sevgili arkadaşlarıma, değerli anne ve babama minnettar olduğumu belirtmek isterim.

Bu tez çalışması, 19/082/03/1/2 numaralı Bilimsel Araştırma Projesiyle desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ix
İÇİNDEKİLER	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xvi
SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ve Bakteriyel Kanser Hastalığı.....	1
1.1.1. Cmm'nin domates yetiştiriciliğinde verdiği zararlar.....	3
1.2. Bakteriyel Hızlı Tanı Yöntemleri ve Hızlı Tespitin Önemi.....	3
1.2.1. Pzr temelli moleküler tanı yöntemleri.....	4
1.2.2. Hibridizasyon temelli moleküler tanı yöntemleri.....	5
1.3. DNA-Kemosensör Hibridizasyonu Temelli Moleküler Teşhis	5
1.3.1. Kemosensörlerin sentez reaksiyonları.....	6
1.3.1.1. <i>Williamson eter sentezi</i>	6
1.3.1.2. <i>NMR analizleri</i>	6
1.3.1.3. <i>McMurry reaksiyonu</i>	7
1.3.2. 9H-karbazol kemosensörü.....	7
1.3.3. FTIR (Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizleriyle hibridizasyonların tespiti ve yorumlanması.....	7
1.4. Projenin Amacı	9
2. MALZEME VE YÖNTEM	10
2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler	10
2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar	11
2.3. BSP-3 Kemosensörünün Sentezi	11
2.3.1. <i>Williamson eter sentezi (alkilleme)</i>	12
2.3.2. Kolon kromatografisi.....	12
2.3.3. İnce tabaka kromatografisi (TLC).....	13
2.3.4. <i>McMurry reaksiyonu</i>	14
2.3.5. <i>McMurry reaksiyonu sonrası kolon kromatografisi</i>	16
2.3.6. <i>McMurry reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi ile görüntülenmesi (TLC)</i>	16
2.3.7. Kemosensörün floresan spektroskopisi ile fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi.....	16

2.4. Adenin Bazının Ürüne Bağlanması ve İnce Tabaka Kromatografisi.....	17
2.5. <i>E. coli</i> ve <i>C. michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> Türlerinin DNA'larının BSP-3 Kemosensörü ile Etkileşimleri.....	18
2.5.1. <i>E. coli</i> bakterisinden DNA izolasyonu.....	18
2.5.2. <i>E. coli</i> DNA'sının pH ile denatürasyonu.....	18
2.5.3. <i>E. coli</i> ssDNA'sının nitroselüloze sabitlenmesi, kemosensörle muamele ve FTIR analizleri.....	18
2.5.4. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> DNA'sının sıcaklıkla denatürasyonu.....	19
2.5.5. <i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i> ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve kemosensörle muamele sonrası FTIR analizleri.....	20
2.6. Aynı Bakteri (Cmm) Türlerinin DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 Kemosensörü ile Etkileşimi.....	20
2.6.1. Cmm DNA'sının sıcaklıkla denatürasyonu.....	20
2.6.2. Cmm ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, kemosensörle muamele ve FTIR analizleri.....	20
2.7. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri.....	21
2.7.1. Bakterilerin ekimi ve büyütülmesi.....	21
2.7.2. Cmm'den kitsiz DNA izolasyonu.....	23
2.7.3. Cmm ve Bt kitli DNA izolasyonları.....	23
2.7.4. DNA örneklerinin spektrofotometrede konsantrasyon ve saflık ölçümleri.....	24
2.7.5. DNA örneklerinin sıcaklıkla denatürasyonu.....	24
2.7.6. Örneklerin nitroselüloz membrana sabitlenmesi, kemosensör ile muamele ve FTIR analizleri.....	25
2.8. Karbazol Kemosensörünün Sentezi.....	28
2.8.1. Alkilleme reaksiyonu.....	28
2.8.2. İnce tabaka kromatografisi.....	29
2.8.3. Kolon kromatografisi.....	30
2.8.4. İnce tabaka kromatografisi.....	31
2.9. Karbazol Kemosensörüne Adenin Bazının Eklenmesi.....	32
2.10. ssDNA Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Sabitlenmesi, Karbazol ile Muamele ve FTIR Analizleri	33
2.11. FTIR Sonuçlarının İşlenmesi ve ACD/ Spectrus Processor Programıyla Yorumlanması	36
2.12. Karbazol Kemosensörü ile Gözle Görülebilir Teşhise Yönelik Denemeler..	38

3. SONUÇLAR	41
3.1. BSP-3 Kemosensörünün Sentezi	41
3.1.1. Williamson-eter sentezi	41
3.1.2. Kolon kromatografisi ile saflaştırma ve ince tabaka kromatografisi	42
3.1.3. TLC sonrası seçilen örneklerin ¹ HNMR sonuçları	43
3.1.4. McMurry reaksiyonu ile BSP-2 ürünü sentezi ve ¹ HNMR analizi	44
3.1.5. BSP-2 ürününe ince tabaka kromatografisinde bakılması	46
3.1.6. Kemosensörün floresan spektroskopi ile fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi	47
3.1.7. Adenin bazının kemosensöre bağlanması ve ince tabaka kromatografisi	47
3.2. <i>E. coli</i> Ve <i>C. michiganensis</i> Türlerinin DNA'larının BSP-3 ile Etkileşimleri	48
3.2.1. <i>E. coli</i> DNA izolasyonu yapılarak nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve BSP-3 ile muamele sonrası FTIR analizi	48
3.2.2. <i>C. michiganensis</i> subspecies <i>michiganensis</i> ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve BSP-3 ile muamele sonrası FTIR analizleri	51
3.3. Aynı Bakteri (Cmm-Cmm) Türlerinin DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimi	52
3.4. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri	54
3.4.1. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü	54
3.4.2. Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) ssDNA'larının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, BSP-3 ile muamelesi ve FTIR analizleri	55
3.5. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin ssDNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimi	59
3.5.1. İzole edilen Bt DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü	59
3.5.2. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile etkileşimi ve FTIR analizleri	60
3.6. Cmm kit (+) Ve Bt kit (+) ssDNA Örneklerinin Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimleri ve FTIR Analizleri	63
3.7. Karbazol Kemosensörü Kullanılarak Yapılan Teşhis Çalışmaları	67
3.7.1. Karbazol kemosensörünün sentezi	67
3.7.2. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile etkileşimleri, bunların FTIR analizleri	68
3.7.3. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile etkileşimi ve FTIR analizleri	71

3.7.4. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA örneklerinin birbirleri ve karbazol kemosenörü ile etkileşimleri ve FTIR analizleri.....	73
3.7.5. Karbazol kemosenörü ile çıplak gözle görülebilir teşhis denemeleri.....	74
4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER.....	76
4.1. BSP-3 Kemosenörünün Sentezi.....	76
4.1.1. Williamson eter sentezi.....	76
4.1.2. Kolon kromatografisi ile saflaştırma ve ince tabaka kromatografisi.....	77
4.1.3. McMurry reaksiyonu ile BSP-2 ürünü sentezi ve ¹ HNMR analizi.....	78
4.1.4. Adenin bazının kemosenöre eklenmesi ile BSP-3 sentezi.....	78
4.2. Cmm ssDNA'larının BSP-3 ile Etkileşim Testleri.....	79
4.3. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri.....	80
4.3.1. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü.....	81
4.3.2. Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) ssDNA'larının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, BSP-3 ile muamelesi ve FTIR analizleri.....	81
4.4. <i>Bacillus thuringiensis</i> Türlerinin ssDNA'larının Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimi.....	82
4.5. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA Örneklerinin Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimleri ve FTIR Analizleri.....	83
4.6. Karbazol Kemosenörü Kullanılarak Yapılan Teşhis Çalışmaları.....	84
4.6.1. Karbazol kemosenörünün sentezi.....	84
4.6.2. Cmm ssDNA'larının karbazol ile etkileşim testleri.....	85
4.6.3. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosenörü ile etkileşimi ve FTIR analizleri.....	85
4.6.4. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA örneklerinin birbirleri ve karbazol kemosenörü ile etkileşimleri ve FTIR analizleri.....	86
4.6.5. Karbazol kemosenörü ile çıplak gözle görülebilirliği testi.....	86
4.7. Tanı Kitinin Literatürdeki Diğer Tanı Kitleriyle Karşılaştırılması.....	86
4.8. Geliştirilen Tanı Kitine Yapılabilecek Farklı Yaklaşımlar.....	87
KAYNAKLAR.....	89
EKLER.....	94
Ek A. Karbazol- Cmm ssDNA Etkileşimlerinin Ham FTIR Görüntüsü.....	94
Ek B. BSP-3 – Cmm ssDNA'larının Etkileşimlerinin Ham FTIR Görüntüsü.....	95
ÖZGEÇMİŞ.....	96

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Fonksiyonel gruplar ve ait oldukları orta-IR dalga boyları.....	9
Çizelge 2.1. Kimyasal malzemeler.....	10
Çizelge 2.2. Cmm ve Bt DNA'larının uğradığı işlemler.....	27
Çizelge 2.3. Cmm ve Bt DNA'larının uğradığı işlemler.....	34
Çizelge 3.1. İzole edilen Cmm DNA'larının konsantrasyon ve saflık ölçümü sonuçları.....	55
Çizelge 3.2. İzole edilen Bt DNA'larının konsantrasyon ve saflık ölçümü sonuçları.....	59



ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Cmm ile enfekte olmuş bir domates meyvesi	2
Şekil 1.2. Karbazol molekülünün yapısı	7
Şekil 1.3. Orta-IR spektrum bölgeleri	8
Şekil 2.1. BSP-3 kemosensör sentezi aşamaları.....	11
Şekil 2.2. Saf BSP-1 ürününün görünümü	13
Şekil 2.3. Kolon kromatografisi sonucu ayrılan örneklerin TLC görüntüleri.....	14
Şekil 2.4. McMurry tepkimesinin düzeni.....	15
Şekil 2.5. Buchner hunisi ile ayırma işlemi	16
Şekil 2.6. Kullanılan floresan spektroskopisi.....	17
Şekil 2.7. Adenin bazının BSP-2 ürününe eklenmesi	17
Şekil 2.8. Kullanılan FTIR cihazı	19
Şekil 2.9. İnkübasyon sonrası nutrient agarda gelişen Cmm kolonileri görünümü ...	22
Şekil 2.10. Sıvı besiyerinde gelişmiş Cmm kültürü	22
Şekil 2.11. ssDNA örneklerini içeren membranların kurutulması	25
Şekil 2.12. Kemosensörün manyetik karıştırıcıda çözülmesi işlemi	26
Şekil 2.13. DNA tespit şeması	27
Şekil 2.14. Karbazol bileşiğinin alkilleme reaksiyonu.....	28
Şekil 2.15. Karbazol çözeltisinin manyetik karıştırıcıda karıştırılması	28
Şekil 2.16. UV lamba altında referans ve ürünün TLC görüntüleri.....	29
Şekil 2.17. UV lamba altında referans ve ürünün TLC görüntüleri.....	30
Şekil 2.18. Kolon kromatografisi düzeneği.....	30
Şekil 2.19. Ürünlerin çekeroçakta kurutulması.....	31
Şekil 2.20. Kolon kromatografi sonucu ayrıştırılan ürünlerin TLC görüntüleri	31
Şekil 2.21. Karbazol ürününe adenin bazının eklenmesi sonucu oluşan kemosensörün yapısı	32
Şekil 2.22. Adeninsiz ve adeninli ürünlerin TLC sonrası görünümü.....	32
Şekil 2.23. Adenin bazı ve adeninli karbazol ürününün TLC sonrası görüntüleri...	33
Şekil 2.24. Cmm DNA'sı denatürasyonu ve ssDNA'nın adenin içeren karbazol kemosensörü ile bağlanması	34

Şekil 2.25. Cmm ssDNA'larının eşleşmesi ile kemosenörün hibritten ayrılması	35
Şekil 2.26. ACD/Spectrus Programı'nın verileri işleme yöntemleri	36
Şekil 2.27. Pik tespiti seçenekleri	37
Şekil 2.28. IRPal 2.0 Programı ile IR analizi	37
Şekil 2.29. ACD/ Spectrus Processor Programı ile FTIR analizi	38
Şekil 2.30. Aynı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümleri.....	39
Şekil 2.31. Aynı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümleri.....	39
Şekil 2.32. Farklı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümleri.....	40
Şekil 3.1. BSP-1 örneğinin ¹ H NMR analiz sonucu.....	42
Şekil 3.2. BSP-1 ürününün TLC sonrası membranların UV altındaki görüntüleri....	42
Şekil 3.3. BSP-1-6'nın ¹ H NMR analiz sonuçları.....	43
Şekil 3.4. BSP-1-8'in ¹ H NMR analiz sonuçları.....	44
Şekil 3.5. McMurry sonrası yapılan kolon kromatografisi sonrası saflaştırılmış olarak elde edilen BSP-2 maddesi	44
Şekil 3.6. 44 numaralı örneğin ¹ H NMR analiz görüntüsü	45
Şekil 3.7. BSP-2-son örneğinin ¹ H NMR analiz görüntüsü	45
Şekil 3.8. BSP-2 örneğinin ince tabaka sonrası UV altındaki görünümü	46
Şekil 3.9. BSP-2 ürününün floresan spektroskopisi ile analizi.....	47
Şekil 3.10. BSP-3 ürününün TLC sonrası UV altındaki görünümü.....	48
Şekil 3.11. <i>E. coli</i> DNA'sı ve DNA-Kemosensör hibritinin FTIR analiz sonucu	50
Şekil 3.12. BSP-3'ün varlığını gösteren 1600 cm ⁻¹ bölgesindeki bantların vertikal yakınlaştırılmış görüntüsü.....	50
Şekil 3.13. Cmm DNA'sı ve DNA-Kemosensör hibritinin FTIR analiz sonucu.....	52
Şekil 3.14. Cmm-BSP-3 kemosenör hibridizasyonunu gösteren C=C bantının yakınlaştırılmış görüntüsü.....	52
Şekil 3.15. Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu ile oluşan FTIR görüntüleri	53
Şekil 3.16. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü.....	56
Şekil 3.17. Kemosensör ayrımının yapılmasını sağlayan bant görünümünün odaklandırılmış hali	57
Şekil 3.18. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü.....	58
Şekil 3.19. BSP-3 varlığına bağlı olarak FTIR tekniği ile <i>Bacillus thuringiensis</i> türlerinde yapılan ayırım.....	61

Şekil 3.20. <i>Bacillus thuringiensis</i> türlerinin ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	62
Şekil 3.21. BSP-3 varlığına bağlı olarak FTIR tekniği ile <i>Bacillus thuringiensis</i> türlerinde yapılan ayırım.....	63
Şekil 3.22. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	64
Şekil 3.23. Kemosensörün vermiş olduğu 1650 cm ⁻¹ 'deki C=C bantlarının yakın görünümü	65
Şekil 3.24. Cmm ve Bt Türlerinin ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	66
Şekil 3.25. BSP-3 ile 1648 cm ⁻¹ 'de görülen C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri.....	67
Şekil 3.26. Adeninli karbazol kemosensörünün görünümü	68
Şekil 3.27. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	70
Şekil 3.28. Karbazol ile görülen C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri.....	70
Şekil 3.29. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	72
Şekil 3.30. Karbazol ile görülen C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri.....	72
Şekil 3.31. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü	74

SEMBOLLER VE KISALTMALAR DİZİNİ

CMM	<i>Clavibacter michiganensis</i> subsp. <i>michiganensis</i>
PZR	Polimeraz zincir reaksiyonu
NAT	Nükleik asit testleri
BSP	Burak sentez ürünü
DNA	Deoksiribo nükleik asit
RT-PZR	Ters transkripsiyonel polimeraz zincir reaksiyonu
cDNA	Komplementer deoksiribo nükleik asit
UV	Ultraviyole
IR	Kızılötesi radyasyon
pH	Hidrojen gücü
NMR	Nükleer manyetik rezonans
FTIR	Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi
DMF	Dimetilformamit
TLC	İnce tabaka kromatografisi
ssDNA	Tek zincirli deoksiribo nükleik asit
Bt	<i>Bacillus thuringiensis</i>
EDTA	Etilen diamin tetraasetik asit

1. GİRİŞ

1.1. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve Bakteriyel Kanser Hastalığı

Clavibacter michiganensis subsp. *michiganensis* (Cmm), (Smith, 1910; Davis vd. 1984) *Clavibacter* cinsine ait, aerobik ve gram pozitif bir bitki patojenidir (Gartemann vd., 2003). Spesifik olarak domates bitkisinde bakteriyel solgunluk ve bakteriyel kanser hastalıklarına sebep olur (Eichenlaub ve Gartemann, 2011).

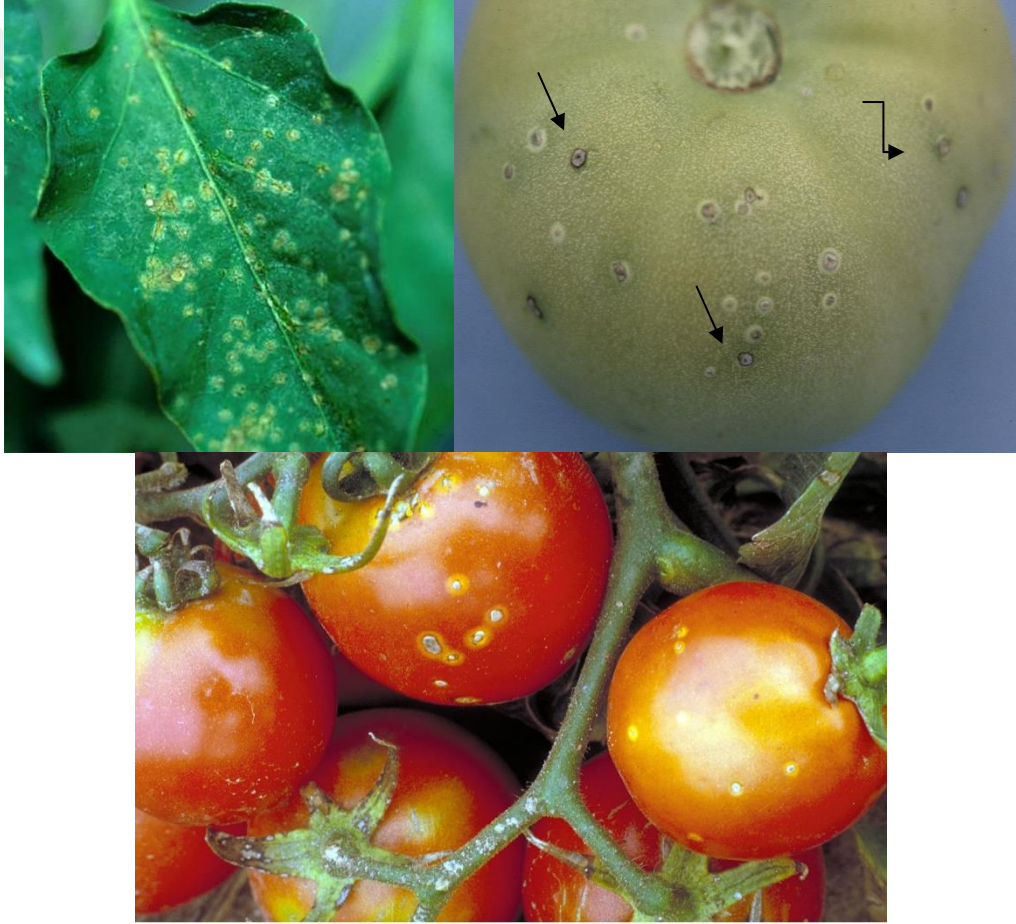
Cmm yabancı tipi olan NCPPB382 suşunda virülenslikten sorumlu iki plazmit bulunmaktadır. Bunlar pCM1 ve pCM2 plazmitleridir. Bu plazmitlerden birini bulunduran suşların bitkilerde ağır enfeksiyonlara sebep olduğu bildirilmiştir (Meletzus vd., 1993).

Cmm'nin neden olduğu enfeksiyon, bitki gelişiminin erken evresinde domates yapraklarında solgunluklara neden olur. Bunun nedeni Cmm'nin bitkiye yaralardan girmesidir. Eğer bakteri, bitkinin odun dokusuna ulaşırsa, odun dokusunu tıkayabilecek bir enfeksiyona neden olur (Elphinstone ve O'Neill, 2010). Enfeksiyonla birlikte odun dokusunda, dokunun gramına 109 bakteri titresi oluşabilmektedir. Solgunluğun tüm yapraklara yayılmasıyla, yaprakların saplarıyla birlikte kıvrılarak ve çarpık bir biçimde büyümesi söz konusu olmaktadır (Elphinstone ve O'Neill, 2010). Kanser lezyonları, Cmm ile görülen bir diğer belirtidir. Hastalık etmeni bakteri, bitki kökünde gelişebilmektedir. Bakterilerin çoğalması sürdükçe lezyonlar derinleşmekte ve genişlemektedir. Bununla birlikte meyve gelişimi tamamen gerçekleşmez veya domatesler düzensiz olgunlaştıklarından benekli bir şekilde görülebilirler (Elphinstone ve O'Neill, 2010).

Eğer enfeksiyon, bitki gelişiminin geç evresinde görülürse bitki hayatta kalabilir ve meyve üretebilir. Bununla birlikte genel bir solgunluk yerine bitkide bir stres hali

yaşanabilir ve kahverengi nekrotik bölgeler oluşturabilir. Tohumlara da hastalığın bulaşma oranı yüksektir (Gartemann vd., 2003).

Yüzeysel enfeksiyonlar bulaş riskini arttırmaktadır. Bakteriler konağın epidermisinde çoğaldığında veya stoma yoluyla girdiğinde bu enfeksiyonlar ortaya çıkar. En sık görülen yaprak semptomu, yaprakta, turuncu bir alanla çevrilmiş koyu kahverengi noktaların oluşumudur (Şekil 1.1) Bununla birlikte domateslerde, kahverengi merkezli, etrafı beyaz ve yeşil olan “kuşgözü” olarak adlandırılan lekeler gelişebilir. Kuşgözü lekeleri Şekil 1.1.’de oklar ile gösterilmiştir. (Elphinstone ve O’Neill, 2010).



Şekil 1.1. Cmm ile enfekte olmuş domates yaprak ve meyveleri

Ek olarak hiçbir semptom görülmeyen gizli enfeksiyonlar da yaygın olarak görülmektedir (Eichenlaub ve Gartemann, 2011).

1.1.1. Cmm'nin domates yetiştiriciliğinde verdiği zararlar

Cmm'nin sebep olduğu bakteriyel kanser hastalığı, tarlalar ve seralarda önemli kayıplara sebep olmaktadır. Hastalığın önlenmesinde bakır içeren ürünler ve pestisitler kullanılmaktadır ki bunlar kalıntı sorunu yaşanmasına ve çevre kirliliğine neden olmaktadır. Meyvelerde görülen lekeler meyvenin ticari değerinin düşmesine ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır (Gleason vd., 1993).

Sherf ve Macnab (1986), enfeksiyonlu olan domates bitkilerinde sistemik enfeksiyon oranının % 31-83 olduğunda meyve ağırlığının ortalama 13 g, ürünün ise % 46 oranında azaldığını belirtmiştir. Türkiye'de domates tarımının çok yaygın olması nedeniyle ve çok sayıda yabancı çeşidin ülkeye girmesiyle domates bakteriyel hastalığında da artış görüldüğü bildirilmiştir (Öktem, 1985). Tohum kökenli bitki hastalıklarının mücadelesinde en etkili bulunan yöntem tohum ilaçlamasıdır.

1.2. Bakteriyel Hızlı Tanı Yöntemleri ve Hızlı Tespitin Önemi

Bakteriyel hastalıklarda patojenin tanımlanması, geleneksel olarak bakterinin izole edilmesi ve kültürde çoğaltılması ile gerçekleştirilmektedir. Bunun en önemli göstergesi olarak Koch postülatları verilebilir (Fredericks ve Relman, 1996). Moleküler tanımlama metodları ise enfeksiyonel hastalıklar için 1980'lerden itibaren uygulanmaktadır. Falkow (2004) moleküler Koch postülatını, patojenin konukçu üzerinde gelişimini teyit etmenin yanı sıra spesifik gen varlığının PZR ile doğrulanması seviyesinde uygulamıştır.

Kültüre alınarak bakteri kimliklendirme yöntemi klasik bir metot olarak, referans bir yöntemdir. Fakat bu metotun bazı dezavantajları da bulunmaktadır. Bazı patojenlerin izole edilmesi ve kültüre alınarak çoğaltılması zordur. Bununla birlikte kültür ortamının şartları spesifiteyi düşürebilmektedir. Patojenin izole edilmesi ve çoğaltılması işlemleri, teşhisin hızlı olarak yapılabilmesini de çoğu zaman engellemektedir (Muthukumar vd., 2008).

Son yirmi sene içerisinde gelişen moleküler tanımlama teknikleri, daha hızlı ve daha spesifik teşhislerin yapılabilirliğini göstermiştir. Nükleik asit testleri (NAT) ile bakterinin genomunda bulunan DNA bilgisi kullanılarak daha hassas düzeyde hastalık etmeni teşhisleri yapılabilmektedir (Muthukumar vd., 2008).

Nükleik asit testlerinin prensibinde hedef DNA-primer veya prob hibridizasyonu bulunmaktadır. Kullanılacak primer ya da prob adı verilen nükleotit dizilerinin bakteri DNA'sına uyumlu olması ve uyum sonrası hibrit molekülün oluşması söz konusudur. Hibritin doğrudan ya da dolaylı olarak tespiti sonucunda, teşhis gerçekleşmiş olur. Doğrudan tespit, sinyal amplifikasyonunu sağlayan raportör bir molekülün varlığı ile hibrit tespit edilirken, dolaylı yoldan tespit hibritin enzimatik amplifikasyonu sonucu oluşan ürünün tespiti gerçekleşir (Muthukumar vd., 2008).

1.2.1. PZR temelli moleküler tanı yöntemleri

Bakterilerin moleküler teşhisi için günümüzde kullanılan birçok farklı teknik mevcuttur. Bakteriyel genlerin tespit edildiği, moleküler biyoloji tekniği olan PZR'de belirli bir hedef gen bölgesinin çoğaltılarak tespit edilecek seviyelerde kopyası elde edilebilmektedir. (Saiki vd., 1988). PZR tabanlı tekniklerde, gerçek zamanlı PZR'de olduğu gibi eş zamanlı olarak amplifiye edilen DNA tespit edilerek teşhis işlemi gerçekleştirilir. Bu işlem, hedef DNA sekansına spesifik komplementer olan ve floresan boya ile işaretlenmiş bir probun DNA'ya bağlanması sonucunda gerçekleştirilir. DNA sentezi arttıkça sinyal amplifikasyonu sağlanarak teşhis yapılabilir hale gelmektedir (Choe vd., 2015; Schmittgen ve Livak, 2008).

PZR temelli moleküler teşhis yöntemlerinden bir diğeri Ters Transkripsiyonel PZR (RT-PZR) ile cDNA formuna dönüştürülerek transkripsiyon seviyesinde etkin genler hakkında bilgi de edinilebilir (Bergin vd., 2010; Birmingham vd., 2008).

PZR temelli moleküler tanı testleri direkt olarak bakteri DNA'sında gen bölgelerini hedef aldığından, geleneksel kültür metotlarına göre çok daha hassas ve spesifiktir. Fakat bu yöntemin de geçerliliğinin belli kısıtlayıcı yönleri bulunmaktadır. DNA'nın istem dışı amplifiye olabilme gücünün yüksek olması yanlış pozitif sonuçlara neden

olabilmektedir. Bununla birlikte bakteriyel DNA, bakteri hücrelerinin canlılığını yitirmesi sonrasında bile uzun zaman kalıcı olabilmekte ve bu durum yanlış pozitif sonuçlara sebep olabilmektedir (Choe vd., 2014).

1.2.2. Hibridizasyon temelli moleküler tanı yöntemleri

Moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte DNA hibridizasyonu kullanılarak teşhise yönelik çalışmalar artmıştır (Gooding ve Odenthal, 2007; Minunni vd., 2001). Geleneksel yöntemler zaman alıcı ve masraflı olduğundan DNA hibridizasyonu temelli biyosensörlerin tasarımına yönelim artmıştır (Hahn vd., 2005; Nakamura ve Karube, 2003). Prosedür; hedef DNA'ya yüksek seviyede özelleşme ile dupleks oluşturabilecek bir prob ve oluşan hibridizasyonu ölçebilen bir ölçüm cihazı ile gerçekleşir (Wang, 2002)

1.3. DNA-Kemosensör Hibridizasyonu Temelli Moleküler Teşhis

Çalışmamızın esas kapsamını oluşturan teşhis yöntemi, domateste bakteriyel kanser hastalığına sebep olan Cmm DNA'sına bağlanabilen farklı kemosensörler kullanarak oluşacak hibritler üzerinden teşhis amaçlı kullanılıp kullanılamayacağını araştırmaktır. Kemosensörler, bir değişimin veya sinyalin üretiminin tespitini sağlamak için bir analitin algılanmasında kullanılan moleküler yapılardır. Moleküler seviyede oluşan etkileşimler ya da değişimler kemosensörler yardımıyla test edilebilir. Bu etkileşimler; kimyasal bağların oluşumu ya da yıkımı, ligand-enzim reaksiyonları, asit-baz reaksiyonları gibi farklı etkileşimler şeklinde olabilir.

Kemosensörlerin çalışması; pH değişimi, renk değişimi gibi çıplak gözle görülebilir değişiklikleri algılanması şeklinde olabildiği gibi, UV spektrumu veya IR spektrumu piklerindeki değişimlerinin tespiti şeklinde de yapılabilmektedir (Gültekin, 2018).

1.3.1. Kemosensörlerin sentez reaksiyonları

1.3.1.1. Williamson eter sentezi

Yöntem, İngiliz kimyacı Aleksandr Williamson tarafından geliştirilmiştir. Williamson eter sentezi sonucunda asimetrik ve simetrik eter elde edilmektedir. Sözkonusu yöntem eter eldesinde laboratuvarlarda en çok kullanılan yöntemlerden biridir (Khan vd., 2014).

1.3.1.2. NMR analizleri

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, atom çekirdeği etrafındaki manyetik alanı ölçmeye dayalı bir spektroskopi tekniğidir. Bu teknikte, örnek bir manyetik alana yerleştirilir. Numunenin çekirdeğinde bulunan radyo dalgalarının uyarılması ile NMR sinyali oluşur. Radyo dalgaları, hassas radyo alıcıları ile tespit edilmektedir (Silverstein vd., 1991).

Molekülü oluşturan atomların etrafında bulunan molekül içi manyetik alan, rezonans frekansını değiştirmektedir. Bu da molekül içerisindeki atomların oluşturduğu fonksiyonel grupların detayları hakkında bilgi edinilmesini sağlar. Manyetik alanlar her molekül için spesifik ve oldukça karakteristik olduğundan, NMR spektroskopisi, organik bileşikler tanımlamada ve yapı analizinde kullanılan kesin sonuç veren bir yöntemdir. Organik kimyada ve biyokimyada oldukça sık kullanılan bir yöntemdir. Biyokimyada proteinlerin ve diğer kompleks moleküllerin tanımında NMR kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra molekül içi dinamikler, reaksiyon durumu ve kimyasal ortam hakkında ayrıntılı bilgi edinilmesini sağlar (Silverstein vd., 1991).

En yaygın NMR tipleri, proton veya ^1H NMR ve karbon NMR (^{13}C NMR)' dır. Proton NMR veya ^1H NMR, molekül yapısını belirlemek için molekül içindeki hidrojen çekirdeklerine göre uygulanan nükleik manyetik rezonanstır (Silverstein vd., 1991).

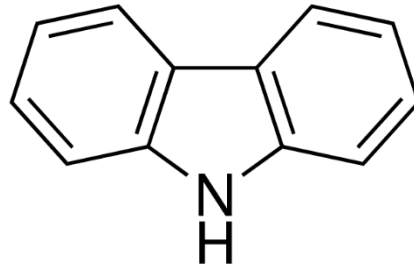
1.3.1.3. McMurry reaksiyonu

Organik kimyada kullanılan önemli bir reaksiyondur. $TiCl_3$ veya $TiCl_4$ ile birlikte bazı metallerin kullanıldığı ve reaksiyon bitiminde alken oluşturan bir yöntemdir (Çankaya, 2011).

1.3.2. 9H-karbazol kemosensörü

9H-karbazol ya da karbazol molekülü, aromatik heterosiklik yapı, organik bir bileşiktir (Şekil 1.2.). Turuncu bir renge sahiptir. Menekşe pigmenti-23'ün sentezinde kullanılmaktadır (Hetschko ve Hufnagel, 1982).

Karbazol ve türevlerinin DNA ile bağlanması ile ilgili farklı birçok çalışmalar da bulunmaktadır. (Gluszynska vd., 2018; Cheng vd., 2003).



Şekil 1.2. Karbazol molekülünün yapısı

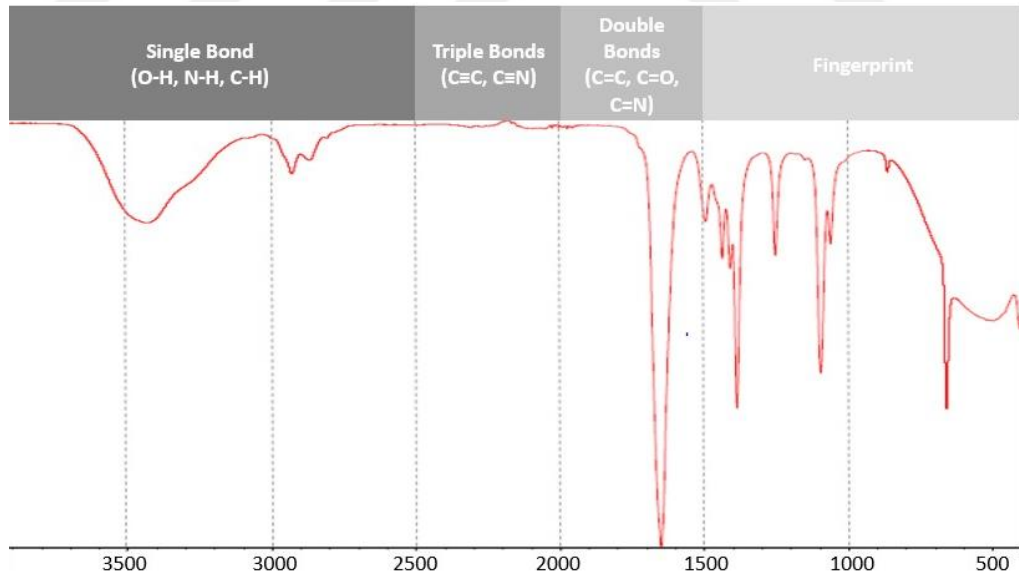
1.3.3. FTIR (Fourier-dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi) analizleriyle hibridizasyonların tespiti ve yorumlanması

Fourier dönüşümlü kızılötesi spektroskopisi (FTIR), araştırmacıların çokça başvurduğu önemli analitik tekniklerden biridir. FTIR analizleri sıvı, solüsyon, gazlar, katı örnekler gibi birçok örneğin analizinde kullanılabilmektedir (Fan vd., 2012). FTIR tekniği ile karakterizasyon hızlı, hassas ve başarı derecesi yüksek bir şekilde gerçekleştirilebilmektedir (Jaggi ve Vij, 2006)

FTIR analizlerinde, örnekler kızılötesi radyasyona maruz bırakılırlar. Kızılötesi radyasyonu, moleküllerdeki atomik titreşimleri harekete geçirir ve spesifik absorpsiyon veya transmisyon pikleri oluşur. Bu, FTIR tekniğini moleküler teşhisler için çok kullanışlı hale getirmektedir (Kirk ve Othmer, 2004).

FTIR spektrumunun vermiş olduğu dalga boyları absorbands ya da transmittans değerleri olabilmektedir. Bu iki değer de molekül yapı teşhisi için kullanılabilir (Nandiyanto vd., 2019). Kızılötesi spektrumları (IR) dalga boylarına göre üçe ayrılmaktadır. Bunlar uzak-IR ($<400\text{ cm}^{-1}$), orta-IR ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) ve yakın-IR ($4000\text{-}13000\text{ cm}^{-1}$) spektrumlarıdır. En sık kullanılan spektrum orta-IR spektrumudur (Coates, 2000; Nandiyanto vd., 2019).

Orta-IR spektrumu kendi içinde dört farklı kısımdan oluşmaktadır; tek bağ bölgesi ($2500\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$), üçlü bağ bölgesi ($2000\text{-}2500\text{ cm}^{-1}$), çift bağ bölgesi ($1500\text{-}2000\text{ cm}^{-1}$), parmak izi bölgesi ($600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$)' dir. Şekil 1.3.'te kızılötesi spektrumunun şematik görünümü, Çizelge 1.1.'de spesifik bazı fonksiyonel grupların frekansları gösterilmiştir.



Şekil 1.3. Orta-IR spektrum bölgeleri (Nandiyanto vd., 2019)

Çizelge 1.1. Fonksiyonel gruplar ve ait oldukları orta-IR dalga boyları (Coates, 2000)

Fonksiyonel gruplar	Dalga boyu (cm ⁻¹)
Doymuş Alifatik (alken/alkil)	
a) Metil (-CH ₃)	
Metil C-H asim./sim. Esneme	2970-2950/ 2880-2860
Methyl C-H asim./sim. Bükme	1470-1430/ 1380-1370
gem-Dimetil ya da “iso”- (duplet)	1385-1380/ 1370-1365
Trimetil ya da “tert-butil” (multiplet)	1395-1385/ 1365
b) Metilen (>CH ₂)	
Metilen C-H asim./sim. Esneme	2935-2915/ 2865-2845
Metilen C-H bükme	1485-1445
Metilen -(CH ₂) _n - sallanma (n ≥ 3)	750-720
Sikloheksan halka vibrasyonları	1055-1000/ 1005-925
c) Metin (>CH-)	
Metin C-H esneme	2900-2880

FTIR transmittans ya da absorbans spektrumlarının vermiş olduğu piklere göre hangi atomik bağlarda esneme, bükme, gerilme gibi hareketlerin olduğu anlaşılır. Buna bakılarak örnek içerisinde hangi organik yapıların olduğu anlaşılmaya çalışılır (Coates, 2000).

1.4. Projenin Amacı

Bu tez çalışmasının amacı, domateste bakteriyel kanser hastalığına sebep olan Cmm DNA'sını, DNA-kemosensör hibridizasyonunu temel alan kemosensörler kullanarak, hızlı ve hassas bir şekilde tespit edebilecek bir tanı kiti tasarımı için yöntem geliştirmek ve bunun kullanılabilirliğini araştırmaktır.

2. MALZEME VE YÖNTEM

2.1. Deneylerde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler ve çözeltiler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiş ve sentez öncesinde saflaştırma yapılmadan kullanılmıştır (Çizelge 2.1.).

Çizelge 2.1. Kimyasal malzemeler

Kimyasalın adı	Üretici firma
Benzofenon	Sigma-Aldrich
1,3-dibromopropan (Reagentplus) %99	Sigma-Aldrich
4,4'-dihidroksifenon	Sigma-Aldrich
Aseton	Sigma-Aldrich
Çinko tozu	Sigma-Aldrich
Tetrahidrofuran	Sigma-Aldrich
Sodyum metal (parafin yağ içinde)	Sigma-Aldrich
Adenin	Sigma-Aldrich
Timin	Sigma-Aldrich
Potasyum karbonat	Sigma-Aldrich
TiCl ₄	Sigma-Aldrich
Etanol % 96 ekstra saf	Merck
N-hekzan ekstra saf	Merck

2.2. Deneylerde Kullanılan Cihazlar

Sentez aşamasında ve sentezlenen bileşiklerin yapılarının aydınlatılmasında kullanılan cihazlar şunlardır:

Manyetik karıştırıcı: Heidolph MR Hei-Standart

Ultraviyole/Görünür bölge (UV-GB) spektrumları Shimatzu spektrofotometresi ile alındı.

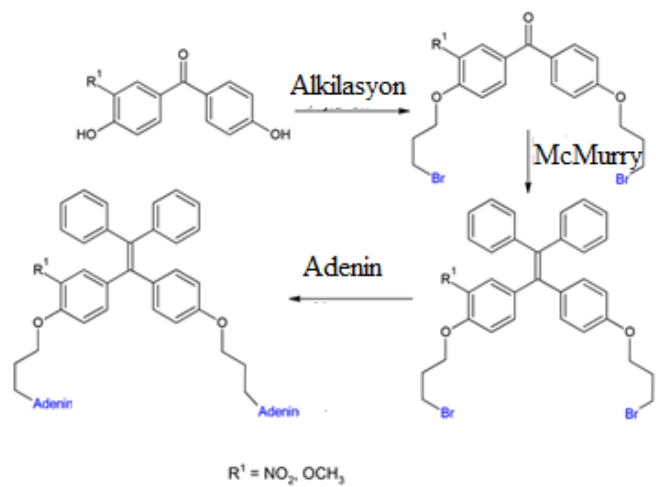
¹HNMR spektrumları Bruker 400 MHz spektrometresi ile alındı. (Mersin Üniversitesi).

Perkin Elmer LS 55 Floresan spektroskopisi ile floresan spektrum alındı.

FTIR analizleri Thermo Scientific Nicolet iS10 cihazı ile yapıldı.

2.3. BSP-3 Kemosensörünün Sentezi

BSP-3 (Burak Sentez Ürünü) kemosensörünün sentezi için 4,4-dihidroksibenzofenon (DHB) başlangıç madde olarak seçilmiştir. Kemosensör sentezi için sırasıyla alkilleme (Williamson eter sentezi), McMurry reaksiyonları gerçekleştirilmiş ve sentezlenen kemosensöre adenin bazı eklenmiştir (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. BSP-3 kemosensör sentezi aşamaları

2.3.1. Williamson eter sentezi (alkilleme)

20 mL dimetilformamit (DMF), 0,43g dihidroksibenzofenon, 700 µL dibromopropan ve 1,38g potasyum karbonat balon joje içerisine konuldu. Manyetik karıştırıcı yardımı ile hazırlanan solüsyon 24 saat oda sıcaklığında çözdürülmüştür. Elde edilen solüsyon 20 mL kloroformla yıkanmış (1:1) ve altta kalan faz beher içinde toplanmıştır. Üst faz kloroform ile tekrar yıkanmıştır. Aynı işlem 2 kez daha tekrar edilerek huni içerisine filtre kağıdı yerleştirilmiş ve üzerine sodyum sülfat serpilmiştir. Beher içerisinde biriktirilen solüsyon huniden geçirilerek elde edilen solüsyon direkt güneş ışığını almayacak bir yerde tüm kloroform uçana kadar bekletilmiştir. Kloroform uçurulduktan sonra elde edilen karışımda maddenin varlığını tespit etmek amacıyla HNMR analizi yapılmıştır.

HNMR analizi sonrası görülen matriks etkisi nedeniyle aynı reaksiyon 60 °C'de çözücü olarak DMF yerine aseton kullanılarak tekrarlanmıştır. Tepkime bitiminde aseton vakum altında uçurulmuş ve su ile kloroform karıştırıldıktan sonra kloroform faz ekstrakte edilmiştir. Yıkamanın ardından altta kalan faz beher içinde toplanmıştır. Kloroform sudan ağırdır ve kloroform beherin altında toplanmaktadır. Elde edilen üst faz kloroform ile üç kez yıkanmıştır. Ardından huni içerisine filtre kağıdı yerleştirilerek üzerine sodyum sülfat eklenmiştir. Ardından elde edilen solüsyon direkt güneş ışığını almayacak bir yerde kurumaya bırakılmıştır. Son olarak elde edilen kuru madde (BSP-1) NMR analizi yapılması için hazır hale getirilmiştir. NMR analizi deuterio-kloroform solvent içerisinde yapılmıştır.

2.3.2. Kolon kromatografisi

Sözkonusu karışımdan sentezlenen maddeyi saf bir şekilde elde etmek amacıyla kolon kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Kolonun ucuna pamuk yerleştirilerek beher içerisinde yeterli miktarda silika jel ve heptan kabarcık kalmayacak şekilde karıştırıldıktan sonra karışım 3 dakika sonikasyona tabii tutulmuştur. Kolon içerisine hazırlanan silika jel aktarılmış (18 cm) ve beher içerisinde toplanan heptan 4 defa silikanın yerleşmesi için kolon içerisine aktarılmıştır. Safılaştırmak istediğimiz madde

içerisine silika konmuş ve karıştırılmıştır. Elde edilen karışım kolon içerisine aktarılmış ve karışımın üzerine heptan eklenmiştir. Üstünü kaplayacak miktarda silika konmuştur. Üzerine heptan eklenerek, silika içerisindeki kabarcıkların çıkması için kolona yumuşak bir cisimle birkaç kez vurulmuştur. Altta beherde toplanan heptan 3 defa tekrar kolon içine aktarıldıktan sonra beher içerisinde biriktirilen heptanlı solüsyon alınarak etiketleme yapılmıştır. 2 mL aseton 150 mL'ye heptan ile tamamlanmış ve kolon içerisine aktarılmıştır. Solvent, tüplere toplanarak etiketleme yapılmıştır. 4 mL aseton 150 mL'ye heptan ile tamamlanarak kolon içerisine aktarılmıştır. Solvent tüplere toplanarak etiketleme yapılmıştır. 10 mL aseton 100 mL'ye heptan ile tamamlanarak kolon içerisine aktarılmıştır. Elde edilen solvent, tüplere toplanarak ikinci bir etiketleme yapılmıştır. Son aşama olarak kolon içerisine aseton eklenerek beher içerisine toplanarak en son etiketleme yapılarak, etiketlenen tüm tüpler çekerocak içinde buharlaşması için bırakılarak saf BSP-1 ürünü elde edilmiştir (Şekil 2.2.).

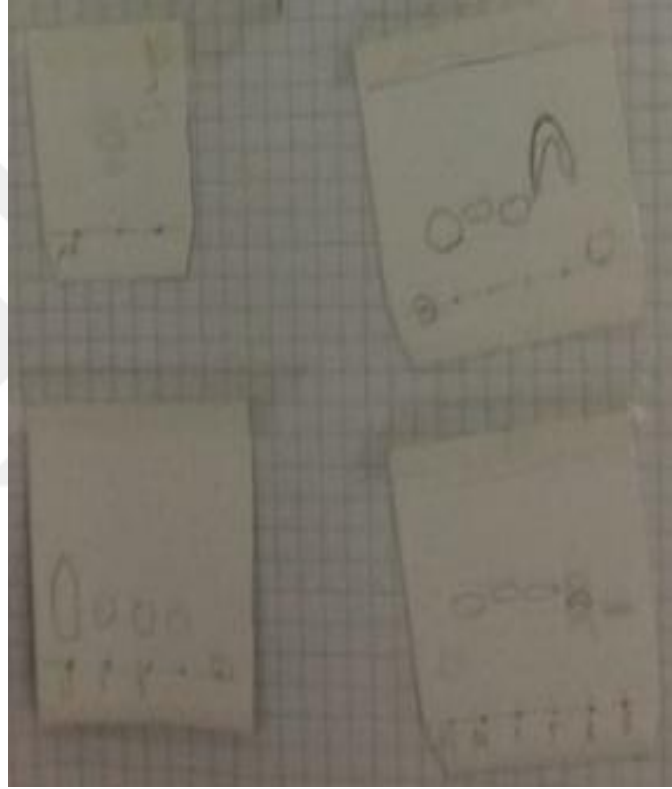


Şekil 2.2. Saf BSP-1 ürününün görünümü

2.3.3. İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Bir karışımı oluşturan bileşenlerin tespiti veya tepkimelerin ilerleme aşamalarının izlenmesi amacıyla TLC yöntemi kullanılmıştır. Beher içerisine bir miktar

diklorometan konulmuştur. TLC tabakada (Şekil 2.3.) devam eden veya bitmiş olan tepkimelerden alınan ürün karışımları kapıları (ince pipet) yardımı ile damlatılmış ve etiketlendiği numara ile işaretlenmiştir. RF (referans) işaretli olan yere ise dihidroksibenzofenon damlatılmıştır. İnce tabaka beher içerisine yerleştirilerek 2 dk beklenmiştir. Ardından UV lamba altında görüntülenmiştir. UV lamba altında görülen 1, 5, 6 ve 8 numaralı beherlerdeki numuneler ¹HNMR analizine gönderilmiştir.



Şekil 2.3. Kolon kromatografisi sonucu ayrılan örneklerin TLC görünümüleri

2.3.4. McMurry reaksiyonu

0,566 g (26,5 mmol) çinko tozu balon joje içerisine aktarılmıştır. 10 mL THF balon joje içerisine eklenmiş ve manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Balon joje üzerine tuz serpilmiş ve buz üzerine yerleştirilmiştir (-10 °C). 0,476 mL TiCl₄ mikropipet yardımı ile çok yavaş bir şekilde balon içerisine aktarılmıştır. Birkaç dakika

manyetik karıştırıcı yardımı ile karıştırılmıştır. Daha sonra sıcak yağ içerisine yerleştirilmiş (90 °C) ve 2 saat reflaks (çekilme) işlemi yapılmıştır (Şekil 2.4.).



Şekil 2.4. McMurry tepkimesinin düzeni

Ardından balon joje içerisine elde edilen bileşenden 0,50 g eklenmiş ve 0,2 g difenil keton balon joje içerisine aktarılmıştır. 4 saat reflaks işlemi yapılmış ve elde edilen karışım 25 °C’de soğutulmuştur. %10’luk sıvı 30 mL K_2CO_3 (3g) içerisine karışım dökülerek 5 dakika vortekslenmiştir. Bileşen içerisindeki çözünmemiş bileşenler Buchner hunisi ile filtrelenmiştir (Şekil 2.5.).



Şekil 2.5. Buchner hunisi ile ayırma işlemi

Filtre kağıdı su ile ıslatılarak THF eklenmiştir. Katı olan kısım uzaklaştırılmış ve sıvı kısım alınmıştır. Sıvı tabaka 50 mL kloroform ile iki defa ekstrakte edilmiştir. İki defa su ile yıkanmıştır. Çekerocakta kurumaya bırakılmıştır. Böylece BSP-2 örneği sentezlenmiştir.

2.3.5. McMurry reaksiyonu sonrası kolon kromatografisi

Silika jelde çözücü olarak kloroform kullanılarak kolon kromatografisi yapılmış ve maddeler çekerocakta kurutulmuştur.

2.3.6. McMurry reaksiyon ürünlerinin ince tabaka kromatografisi ile görüntülenmesi (TLC)

Elde edilen numunelere TLC’de UV lamba altında bakılmış ve ardından ^1H NMR analizine gönderilmiştir.

2.3.7. Kemosensörün floresan spektroskopisi ile fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi

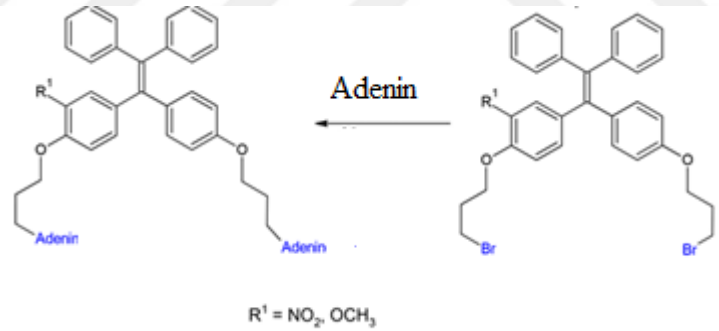
Yapı tayininden sonra BSP-2 örneğinin fotofiziksel özellikleri Perkin Elmer LS 55 floresan spektroskopisi yardımı ile tespit edilmiştir. Sentezlenen maddelerin absorpsiyon ve emisyon spektrumları kaydedilmiştir (Şekil 2.6.).



Şekil 2.6. Kullanılan floresan spektroskopisi

2.4. Adenin Bazının Ürüne Bağlanması ve İnce Tabaka Kromatografisi

Gerekli hesaplamalar yapıldıktan sonra 0,076 g adenin, asetonla çözülmüş ürüne (BSP-2) eklenmiştir. Manyetik karıştırıcı eklenerek 60 °C’de 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Kimyasal reaksiyonu Şekil 2.7.’de verilmiştir.



Şekil 2.7. Adenin bazının BSP-2 ürününe eklenmesi

Adenin eklenmiş ürüne BSP-3 adı verilmiştir. Beher içerisine heptan, kloroform ve etanol eklenmiş, TLC tabakaya farklı çözücülerde çözelti halinde bulunan BSP-3 ürünü damlatılmıştır. Kağıt beher içerisine yerleştirilmiş ve 2 dk beklenmiştir. Ardından UV lamba altında görüntülenmiştir. Böylece DNA analizlerinde kullanılacak kemosensör elde edilmiştir.

2.5. *E. coli* ve *C. michiganensis* subsp. *michiganensis* Türlerinin DNA'larının BSP-3 Kemosensörü ile Etkileşimleri

Etkileşimlerin görülmesi amacıyla ön denemeler yapmak amacıyla *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Escherichia coli* bakterileri ile çalışılmıştır. Sentezlenen kemosensörle hibridizasyon testleri için *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ve *Escherichia coli* DNA'ları elde edilmiştir.

2.5.1. *E. coli* bakterisinden DNA izolasyonu

Stok kültürden alınan *Escherichia coli* BL-21 suşu nutrient broth sıvı besiyerine ekim yapılarak 1 gün boyunca 26 °C, 100 rpm'de inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası bakteriyi içeren besiyerinden ependorf örnek alınarak DNA izolasyonuna gidilmiştir. Thermo Scientific GeneJET Genomik DNA Purifikasyon Kiti kullanılarak, *E. coli* örneğinden DNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir.

2.5.2. *E. coli* DNA'sının pH ile denatürasyonu

Elde edilen *E. coli* DNA örneği tek zincir haline (ssDNA) dönüştürülmek için denatüre edilmiştir. Denatürasyon işlemi ortam alkali pH'a (pH 10) çevrilerek yapılmıştır. 0,4 g NaOH tartılarak 10 mL distile suda çözülmüş ve DNA örneğinden 10 µL alınarak 100 µL NaOH çözeltisi ile karıştırılmıştır. Pipetleme yapılarak 10 dk inkübasyona bırakılmıştır.

2.5.3. *E. coli* ssDNA'sının nitroselüloze sabitlenmesi, kemosensörle muamele ve FTIR analizleri

pH ile denatüre edilmiş *E. coli* ssDNA örneğinden 20 µL alınarak nitroselüloz membrana damlatılmış ve kurumaya bırakılmıştır. Kör olarak boş nitroselüloz membran kullanılmış ve NCE adı ile ölçüm alınmıştır. *E. coli* ssDNA'sının

sabitlenmesi sonrası FTIR cihazında ölçüm yapılmış (Şekil 2.8.) ve transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCE-DNA ismi ile kaydedilmiştir. Ölçüm sonrası sentezlenen kemosensör olan BSP-3 aynı nitroselüloz membrana damlatılarak ssDNA ile hibridize edilmiştir. Çekerocakta kurutulan membran FTIR-ATR analizi sonrası transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCE-DNA-CM olarak kaydedilmiştir. Bu ölçümler diğer sonuçlar ile kontrol ve karşılaştırma yapabilmek için yapılmıştır.



Şekil 2.8. Kullanılan FTIR cihazı

2.5.4. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* DNA'sının sıcaklıkla denatürasyonu

Sentezlenen kemosensör ile *C. michiganensis* (Cmm) DNA'sının hibridizasyonu amacıyla, Baysal vd. (2011), tarafından PZR ile doğrulanmış Cmm 16/5 suşları kullanılmıştır. İzole edilmiş Cmm DNA'ları, BATEM Enstitüsü - Antalya'dan temin edilmiştir. Sonrasında, temin edilen Cmm DNA'ları denatürasyona uğratılmıştır. Denatürasyon için Cmm- DNA örnekleri 95 °C'lik su banyosunda 30 dk boyunca tutulmuş ve sonrasında hemen buz üzerine alınmıştır. Buzda 15 dk bekletildikten sonra nitroselüloz membrana sabitleme işlemine geçilmiştir.

2.5.5. *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve kemosenörle muamele sonrası FTIR analizleri

Cmm ssDNA'sından 20 µL alınarak nitroselüloz membrana damlatılmış ve çekeroçakta kurutulmuştur. Örnek NCM-DNA olarak kaydedilmiştir. Kurutma sonrası membran kemosenör ile muamele edilmiş ve 1 gün boyunca çekeroçakta kuruması sağlanmıştır. Kurutmanın ardından FTIR cihazında ölçüm yapılarak transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCM-DNA-CM olarak kaydedilmiştir.

2.6. Aynı Bakteri (Cmm) Türlerinin DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 Kemosenörü ile Etkileşimi

Cmm'nin DNA düzeyinde teşhisinde kullanılmak üzere Cmm DNA'ları ve sentezlenen kemosenör arasındaki etkileşime FTIR analizi aracılığıyla bakılmıştır.

2.6.1. Cmm DNA'sının sıcaklıkla denatürasyonu

Bir önceki analizde de kullanılan Cmm DNA örnekleri 95 °C'lik su banyosunda 30 dk boyunca tutulmuş ve sonrasında hemen buz üzerine alınmıştır. Buzda 15 dk bekletildikten sonra membrana sabitleme işlemine geçilmiştir.

2.6.2. Cmm ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, kemosenörle muamele ve FTIR analizleri

Cmm ssDNA'larını içeren ilk tüpten 20 µL örnek alınarak nitroselüloz membrana damlatılmıştır ve kurutma sonrası FTIR-ATR ölçümü yapılarak transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCM-DNA-2 olarak kaydedilmiştir. Nitroselüloz membran, kemosenör ile muamele edilmiş ve çekeroçakta 1 gün boyunca kurutulmuştur. Sonrasında FTIR-ATR ölçümü yapılarak transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCM-DNA-CM-2 olarak kaydedilmiştir. Bir sonraki işlem olarak aynı membran üzerine diğer Cmm-ssDNA örneği damlatılıp kurutulmuş ve FTIR-ATR ölçümü

yapılarak transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları NCM-DNA-DNA-2 olarak kaydedilmiştir. Ölçüm sonuçları karşılaştırılmıştır.

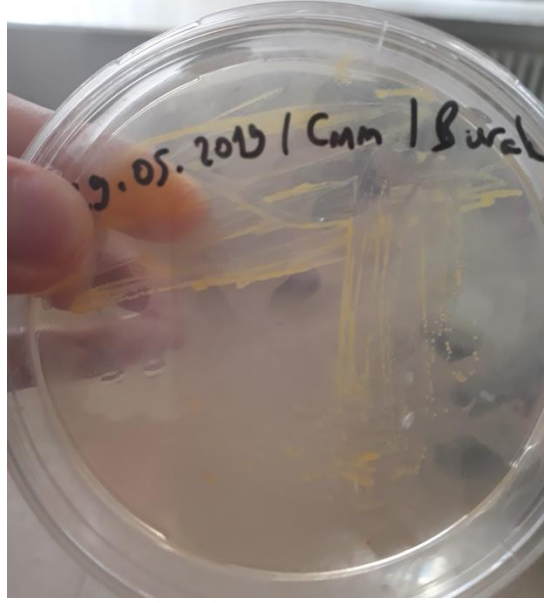
2.7. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri

Teşhisin daha kolay yapılabilirliğini ölçmek için kit kullanılmadan DNA izolasyonu yapılan Cmm örneği ve kit kullanılarak DNA izolasyonu yapılan Cmm örneği karşılaştırılması ve doğru teşhis yapma kabiliyetini tespit etmek amacıyla bir diğer DNA-kemosensör analizi daha gerçekleştirilmiştir.

Sonuçların negatif kontrolü için ise *Bacillus thuringiensis* DNA'sı kullanılmıştır. Cmm'den farklı bir bakteri DNA'sı kullanılarak, kitin Cmm DNA'sını spesifik olarak tanıyıp tanımadığı test edilmiştir.

2.7.1. Bakterilerin ekimi ve büyütülmesi

Kitsiz DNA izolasyonunda kullanılmak üzere, katı besiyerinde büyütülecek Cmm'ler için 0,16 g nutrient broth hazır besiyeri ve 0,3 g agar tartılarak 20 mL dH₂O içerisinde çözülmüş ve otoklav ile besiyeri sterilize edilmiştir. Sterilizasyon sonrası besiyeri plastik petrilere dökülmüştür. Stok Cmm kültüründen öze yardımıyla alınan örnek petrilere çizgi ekim yöntemiyle ekilmiştir. Ekim sonrası petrilere inkübatöre alınarak Cmm'ler 25 °C'de 3 gün boyunca inkübe edilmiştir (Şekil 2.9.).



Şekil 2.9. İnkübasyon sonrası nutrient agarda gelişen Cmm kolonileri görünümü

Sıvı besiyerinde büyütülecek bakteriler için 0,4 g nutrient broth hazır besiyeri tartılarak 50 mL dH₂O içerisinde çözülmüştür. Besiyeri steril hale getirilmek için otoklavlanmıştır. Otoklav sonrası besiyerinin sıcaklığı belli bir noktaya gelene kadar soğuması beklenmiş, ardından besiyeri 10 ml'lik cam deney tüplerine paylaştırılmıştır. Stok *B. thuringiensis* (Bt) kültüründen ve nutrient agarda gelişmiş Cmm kolonilerinden örnekler alınarak sıvı besiyerlerine ekilmiştir. Ekim sonrası Cmm içeren tüpler çalkalamalı inkübatöre alınarak 27 °C 120 rpm'de 3 gün boyunca bakterilerin gelişmesi sağlanmıştır. Aynı şekilde Bt'ler de 29 °C 120 rpm'de 3 gün boyunca geliştirilmiştir (Şekil 2.10.).



Şekil 2.10. Sıvı besiyerinde gelişmiş Cmm kültürü

2.7.2. Cmm'den kitsiz DNA izolasyonu

Kitsiz DNA izolasyonu için kaynatma metodu uygulanmıştır. Nutrient agarda geliştirilmiş Cmm kolonilerinden öze yardımıyla birkaç tane alınarak içerisinde 2 mL distile su bulunan ependorf tüpe aktarılmıştır. Su içerisinde karıştırılarak dağılması sağlanan örnek, 100 °C' ye ayarlanmış su banyosunda 10 dk bekletilmiştir. Ardından direkt olarak buza alınan örnek 5 dk buzda bekletilmiş ve soğuması sağlanmıştır. Yaklaşık olarak oda sıcaklığına gelen ependorf tüp içerisine 40 mg lizozim enzimi ve 20 µL proteinaz K enzimi eklenmiş ve vortekslenerek örneğin homojen bir hal alması sağlanmıştır. Sonrasında ependorf termomikserde 56 °C' de 1 saat boyunca inkübe edilmiştir. Inkübasyon sonrası ependorf mikrosantrifüje alınarak 12000 x g'de 3 dk santrifüjlenmiştir. İzole edilen DNA'nın bulunduğu kısım olan süpernatant kısmı pipet ile steril başka bir ependorfa alınıp pellet atılmıştır.

2.7.3. Cmm ve Bt kitli DNA izolasyonları

Cmm (+), Cmm (+) 2 ve Bt (+), Bt (+) 2 örnekleri vortekslenerek homojen bir hale getirilmiştir. Kit olarak Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kit kullanılmış ve gram-pozitif bakteriler için genomik DNA pürifikasyon protokolü uygulanmıştır.

Protokole göre izolasyon öncesi gram-pozitif bakteri lizis tamponu hazırlanmıştır. Lizis tamponunda kullanılmak üzere 1 M 10 ml'lik Tris-HCl, pH 8.0 hazırlanmıştır. 1,211 g trizma baz 8 mL distile suda çözülmüş ve HCl ile pH'ı 8'e ayarlanmış ve distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. 0,5 M 10 mL EDTA, pH 8.0 için 1,86 g EDTA 8 mL distile suda çözülerek NaOH ile pH'ı 8'e ayarlanmış ve distile su ile 10 ml'ye tamamlanmıştır. İçerisinde 20 mM Tris-HCl, 2 mM EDTA, % 1.2 Triton X-100 ve 20 mg/mL lizozim olacak şekilde 5 ml'lik lizis tamponu hazır hale getirilmiştir.

DNA izolasyon protokolünü uygulamak üzere tüm örneklerden 2'şer mL örnek alınarak 10 dk 5000 x g'de santrifüjlenmiştir. Supernatantlar atıldıktan sonra her bir

pellet 180 µL gram-pozitif bakteri lizis tamponunda çözölmüş ve termomikserde 37 °C’de 30 dk inkübe edilmiştir. Her örneğe 200 µL lizis solösyonu ve 20 µL proteinaz K eklenerek örnekleler homojen hale gelene kadar vortekslenmiştir. Hücreler tamamen lizis edilmek için tekrar termomiksere alınan örnekleler 56 °C’ de 30 dk çalkalamalı bir şekilde inkübasyona bırakılmıştır. Her bir örneğe 20 µL RNaz A solösyonu eklenerek karışım vortekslenmiş ve 10 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 400 µL 50% etanol eklenmiş ve tekrar vorteksleme işlemi yapılmıştır. Lizatlar GeneJET Genomic DNA Purification Kolonlarına alınmış ve 6000 x g’de 1 dk santrifüjlenmiştir. Kolon içerisindeki toplama tüpüne geçen solösyon atılarak kolon steril bir başka toplama tüpüne yerleştirilmiştir. Örneklelere 500 µL Yıkama Tamponu I eklenmiş ve 8000 x g’de 1 dk santrifüjlenmiştir. Toplama tüpüne geçen solösyon atılmıştır. Kolon içerisine 500 µL Yıkama Tamponu II (etanol eklenmiş) ilave edilerek 12000 x g’de 3 dk santrifüjlenmiştir. Toplama tüpüne akan solösyon atılarak kolonlar steril ependorf tüplere transfer edilmiştir. Son işlem olarak 200 µL elösyon tamponu kolonlara eklenmiş ve örnekleler 2 dk oda sıcaklığında inkübe edilmiştir. 8000 x g’de 1 dk santrifüj sonrası kolonlar çıkarılmış ve pürifiye edilmiş DNA örnekleleri -20 °C’ de saklanmıştır.

2.7.4. DNA örneklelerinin spektrofotometrede konsantrasyon ve saflık ölçömleri

Kitle izole edilmiş DNA örneklelerinin ölçümü için kör olarak 2 µL elösyon tamponu ve 2’şer µL Cmm (+), Cmm (+) 2 DNA örnekleleri kuyulara yüklenmiştir. Örneklelerin konsantrasyon miktarlarına ve A_{260}/A_{280} , A_{260}/A_{230} değerklerine bakılmıştır. Aynı işlemler Bt ve kitsiz (kit (-)) izole edilen Cmm için de uygulanmıştır. Kit (-) Cmm DNA örneğinin ölçümünde kör olarak distile su kullanılmıştır. Değerlere bakılarak yeterli konsantrasyona sahip olmayan Cmm (+) 2 örneği sonraki aşamalara dahil edilmemiştir.

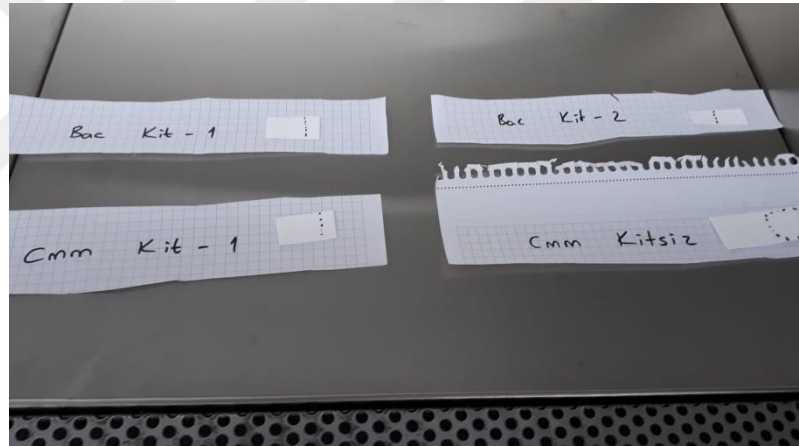
2.7.5. DNA örneklelerinin sıcaklıkla denatürasyonu

Tüm DNA örneklelerinden 10’ar µL alınarak 90’ar µL distile suda çözölmüştür. Örneklelerin bulunduğu ependorflar 95 °C’ lik su banyosunda 30 dk tutulmuştur. Süre

sonunda örnekler su banyosundan hemen buz üzerine alınarak şoklanmıştır. DNA örnekleri buz üzerinde 15 dk bekletilmişlerdir.

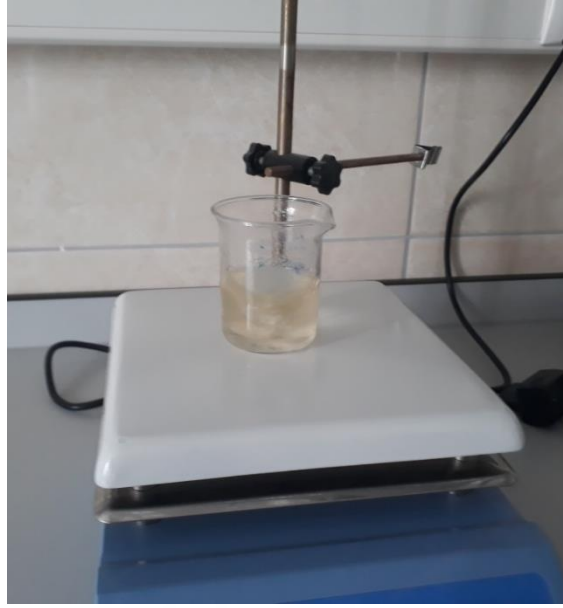
2.7.6. Örneklerin nitroselüloz membrana sabitlenmesi, kemosensör ile muamele ve FTIR analizleri

Her bir ssDNA örneğinden 20 µL alınarak farklı nitroselüloz membranlara damlatılmıştır. Membranlar 1 gün boyunca çekercokta kurutulmuştur (Şekil 2.11.). Kurutma sonrası 3 ssDNA örneği (Cmm kit (-), Cmm kit (+), Bt kit (+)) FTIR-ATR analizi yapılmış ve transmittans-dalga sayısı değerlerine bakılmıştır. Sonuçlar Cmm kit (-), Cmm kit (+) ve Bt kit (+) olarak kaydedilmiştir. Membranın boş bir kısmı kör olarak kullanılmış ve ölçüm alınmıştır.



Şekil 2.11. ssDNA örneklerini içeren membranların kurutulması

Kemosensörle muamele işlemi için BSP-3 ürünü dimetilformamid içinde çözülmüş ve içerisine balık atılarak manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır (Şekil 2.12.).



Şekil 2.12. Kemosensörün manyetik karıştırıcıda çözülmesi işlemi

Kemosensör homojen bir forma geldikten sonra her bir membrana 60'ar μL damlatılmıştır. Membranlar 1 gün boyunca çekerocakta kurutulduktan sonra 3 örnek bir kez daha FTIR-ATR analizi yapılmıştır. Transmittans-dalga sayısı ölçüm sonuçları Cmm kit (-) -CM, Cmm kit (+) -CM ve Bt kit (+) -CM olarak kaydedilmiştir.

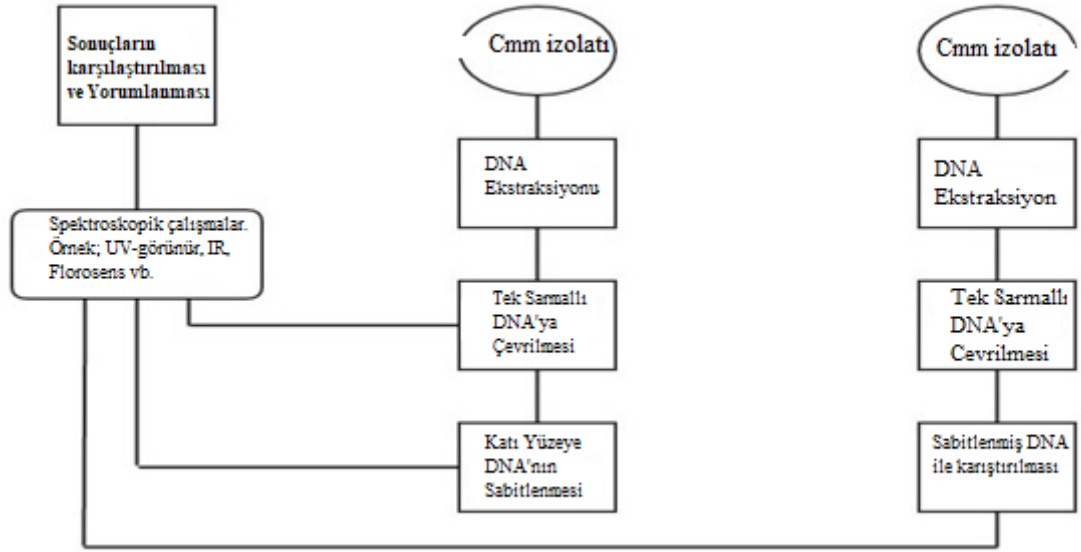
DNA-kemosensör-DNA etkileşimlerini incelemek için Cmm kit (-) -CM membranına Cmm kit (+) ssDNA'sından 20 μL , Cmm kit (+) -CM membranına Bt kit (+) ssDNA'sından 20 μL ve Bt kit (+) -CM membranına Bt kit (+) 2 ssDNA'sından 20 μL damlatılmıştır. Membranlar 1 gün boyunca çekerocakta kurutulmuştur. 3 membrandan FTIR-ATR ölçümü alınmış ve transmittans- dalga sayısı ölçümleri Cmm kit (-) 2, Cmm kit (+) 2, Bt kit (+) 2 olarak kaydedilmiştir. Sonuçlar karşılaştırılarak teşhis edilebilirlik incelenmiştir.

Aynı işlemler kemosensör damlatıldıktan sonra su ile yıkama yapılarak tekrarlanmıştır. Böylece spesifik olmayan bağlanmaların uzaklaştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen FTIR sonuçları Cmm kit (-) / Cmm kit (-) -CM / Cmm kit (-) 3 / Cmm kit (-) 4, Cmm kit (+) / Cmm kit (+) - CM / Cmm kit (+) 3 / Cmm kit (+) 4 ve Bt kit (+) / Bt kit (+) CM / Bt kit (+) 3 / Bt kit (+) 4 olarak kaydedilmiştir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.2. Cmm ve Bt DNA'larının uğradığı işlemler

Aşamalar/Örnekler	Cmm kit (-)	Cmm kit (+)	Bt kit (+)
Membrana Sabitleme	Cmm kit (-)	Cmm kit (+)	Bt kit (+)
BSP-3 Muamelesi	Cmm kit (-) CM	Cmm kit (+) CM	Bt kit (+) CM
Su ile Yıkama	Cmm kit (-) 3	Cmm kit (+) 3	Bt kit (+) 3
İkinci DNA'nın Eklenmesi	Cmm kit (-) 4	Cmm kit (+) 4	Bt kit (+) 4

Şekil 2.13.'te Cmm DNA tespiti için gerçekleştirilen aşamalar şematik olarak gösterilmiştir.

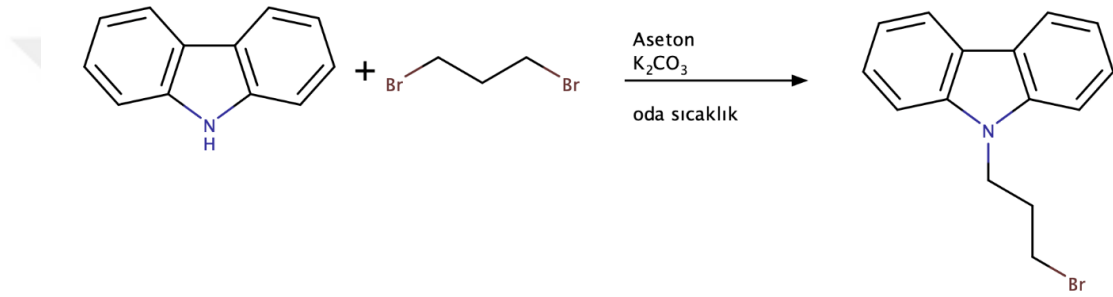


Şekil 2.13. DNA tespit süreçlerinin şematik anlatımı

2.8. Karbazol Kemosensörünün Sentezi

2.8.1. Alkilleme reaksiyonu

Ticari olarak satın alınan karbazol bileşiğinden hassas terazide tartılarak 167 mg alınmış ve balon jojeye aktarılmıştır. İçerisine 0,612 mL 1,3-dibromopropan, 200 mg potasyum karbonat ve 10 mL aseton eklenerek manyetik karıştırıcıda 24 saat boyunca oda sıcaklığında Şekil 2.15.'de gösterildiği gibi karıştırılmıştır.



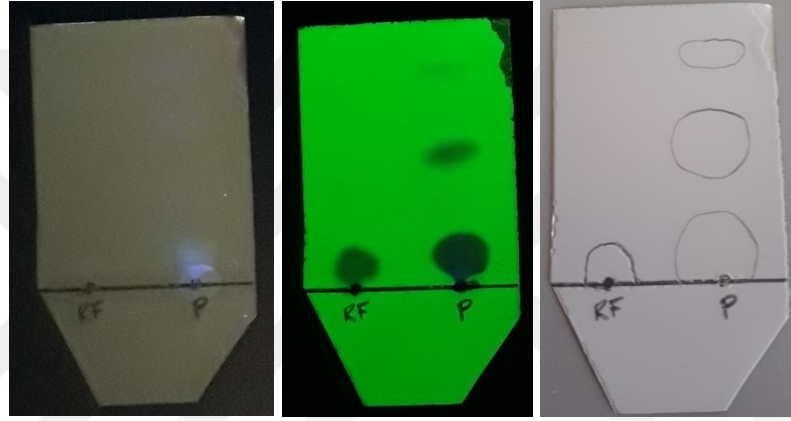
Şekil 2.14. Karbazol Bileşiğinin Alkilleme Reaksiyonu



Şekil 2.15. Karbazol çözeltisinin manyetik karıştırıcıda karıştırılması

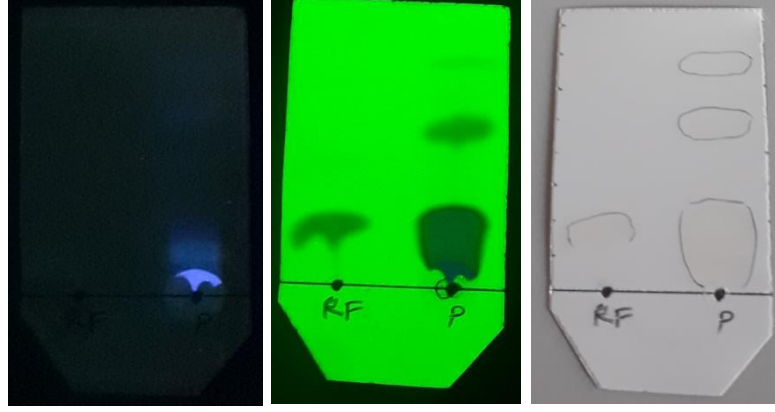
2.8.2. İnce tabaka kromatografisi

Reaksiyon sonunda ürünlerin görülmesi için ince tabaka kromatografisi yapılmıştır. Referans olarak reaksiyona giren madde olan karbazolden 2 mg alınarak aseton solventinde çözülmüştür. Reaksiyon ürünü de asetonda çözülmüş ve referansla birlikte silika membrana damlatılmıştır. Silika membran, 10 mL hekzan ve birkaç damla aseton içeren karışıma daldırılarak 1-2 dk beklenmiştir. Yürütme işlemi sonrası UV lamba altında kısa ve uzun dalga boylarında görüntüleme yapılmıştır (Şekil 2.16).



Şekil 2.16. UV lamba altında referans ve ürünün TLC görüntüleri

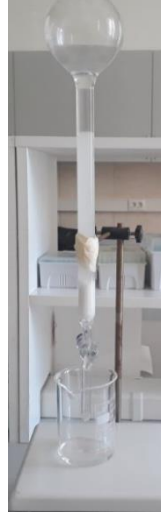
Ürünlerin daha iyi ayrışması için aynı işlem daha polar olan etil asetat + hekzan karışımında yürütülerek tekrarlanmış ve UV lamba altında görüntülenmiştir (Şekil 2.17).



Şekil 2.17. UV lamba altında referans ve ürünün TLC görünüşleri

2.8.3. Kolon kromatografisi

İstenen ürünün reaksiyon sonucu oluşan diğer bileşenlerden saflaştırılması için kolon kromatografisi yapılmıştır. 60 g silika üzerine hekzan eklenerek 3 saat boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır. Elde edilen silika jel kolondan geçirilmiş ve ardından hekzan kolondan geçirilmiştir. Karbazol ürünü silika ile karıştırılıp kolona üstten eklenmiştir. Kolonun altına beher koyulmuş ve üstten hekzan eklendikçe alttaki beherlerden toplanmıştır (Şekil 2.18.)



Şekil 2.18. Kolon kromatografisi düzeneği

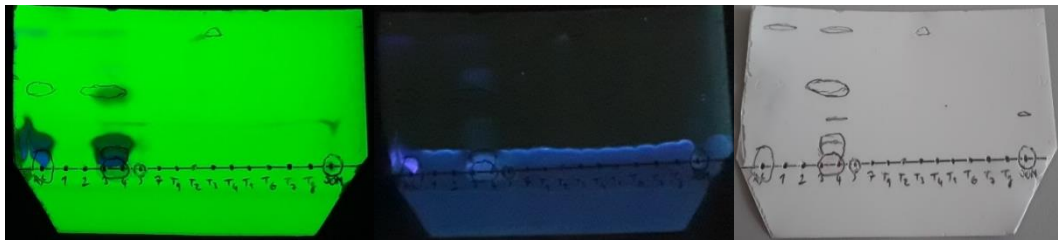
Aynı işlem 5 kez tekrarlandıktan sonra kolonun üstünden % 50 hekzan- %50 etil asetat karışımı eklenmeye başlanmıştır. Birkaç kez bu işlem tekrarlanıp alttan beherlerde toplanandıktan sonra %100 etil asetat eklenerek, ürünler 20 farklı deney tüpünde toplanmıştır. Son olarak kolon asetonla yıkanmış ve tüm ürünler toplanmıştır. Toplanan beherler ve tüpler sırasıyla numaralandırılmıştır. Tüm ürünler solventlerin uçması için çekerocakta kurutulmuştur (Şekil 2.19.).



Şekil 2.19. Ürünlerin çekerocakta kurutulması

2.8.4. İnce tabaka kromatografisi

Kuruyan örneklerden içinde kalıntı bulunan 1, 2, 3, 4, 5, 7 numaralı beherler, deney tüpleri ve asetonla yıkama sonucu toplanan son ürün içerisine kloroform damlatılarak ürünlerin çözülmesi sağlanmıştır. Referans olarak kullanılacak karbazolden de birkaç mg alınarak kloroformda çözülmüştür. Her örnekten birer damla alınarak silika membrana damlatılmış ve etil asetat + hekzan karışımında yürütülmüştür. Yürütme sonrası UV lamba altında görüntülenmiştir (Şekil 2.20.).

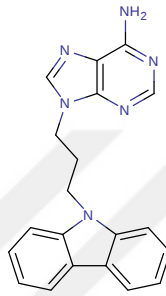


Şekil 2.20. Kolon kromatografi sonucu ayrıştırılan ürünlerin TLC görünüşleri

TLC sonrası UV altında floresan özellik gösteren 3 ve 4 numaralı beherlerdeki ürünler sonraki adımlar için seçilerek birleştirilmiştir.

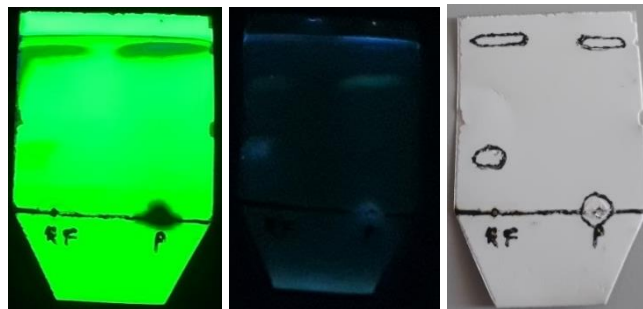
2.9. Karbazol Kemosensörüne Adenin Bazının Eklenmesi

Floresan özellik gösteren ürün hassas terazide tartılmış ve 1,1361 gram gelmiştir. 1 mol ürüne 1 mol adenin bazını eklemek için 0,533 g adenin tartılarak ürüne eklenmiştir. Bu karışıma 1,090418 grama tekabül eden 2 mol potasyum karbonat ilave edilmiştir. Son olarak beher içerisine 15 mL aseton eklenmiş ve 1 gün boyunca oda sıcaklığında manyetik karıştırıcıda karıştırılmıştır.



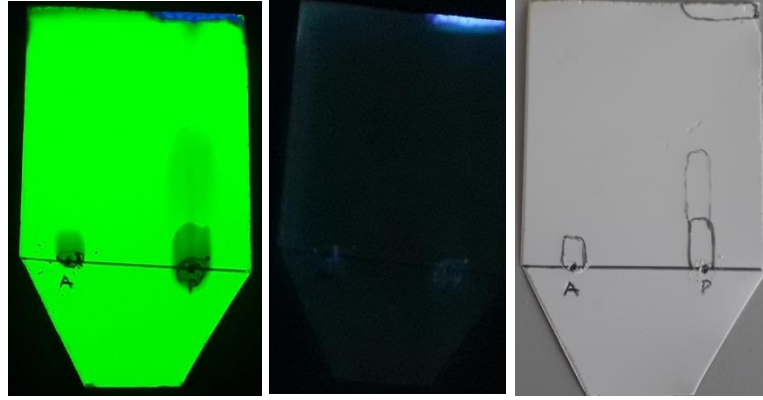
Şekil 2.21. Karbazol ürününe adenin bazının eklenmesi sonucu oluşan kemosensörün yapısı

Karıştırma işlemi sonrası adeninsiz ürün ve adeninli ürün arasında karşılaştırma yapabilmek için adeninsiz ürün ve adeninli ürün asetonda çözülerek 10 mL hekzan + 1 mL etil asetat içerisinde yürütülmüş ve ince tabaka kromatografisi (TLC) yapılmıştır. Adeninsiz ürün referans olarak işaretlenirken adeninli ürün P olarak işaretlenmiştir. TLC sonrası UV altındaki görünüm Şekil 2.22.'de verilmiştir.



Şekil 2.22. Adeninsiz ve adeninli ürünlerin TLC sonrası görünümü

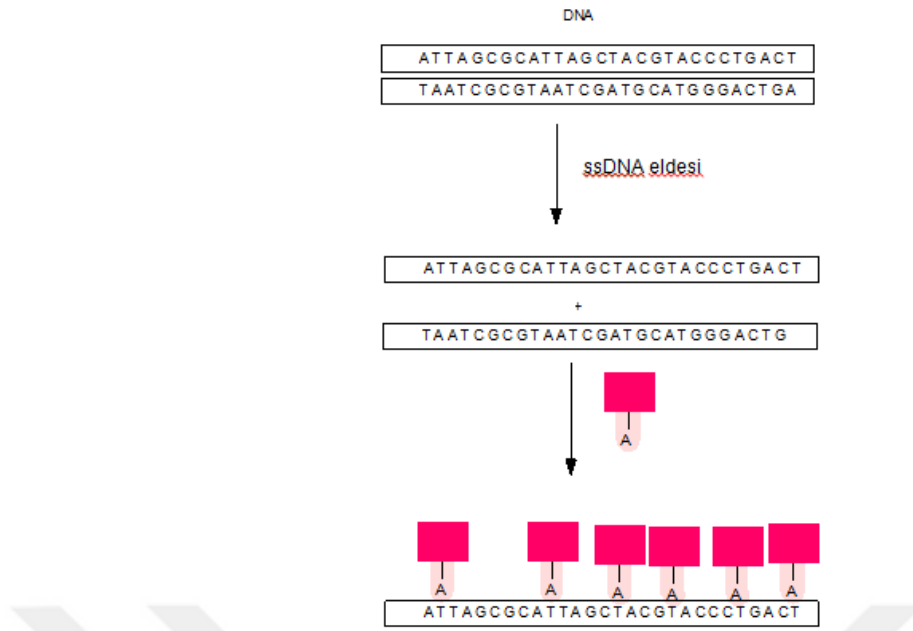
0,2 g adenin bazı ve adeninli ürün 10 mL asetonda çözülmüş, %50 hekzan + % 50 etil asetat içerisinde yürütülerek TLC yapılmıştır.



Şekil 2.23. Adenin bazı ve adeninli karbazol ürününün TLC sonrası görünüşleri

2.10. ssDNA Örneklerinin Nitroselüloz Membrana Sabitlenmesi, Karbazol ile Muamele ve FTIR Analizleri

Üç farklı nitroselüloz membrana önceki çalışmalardan izole edilmiş Cmm kit (-) ssDNA, Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA'larından 10'ar μ L damlatılmış ve kurutulduktan sonra FTIR ölçümü yapılmıştır. Sonuçlar Karbazol Cmm kit (-) / Karbazol Cmm kit (+) / Karbazol Bt kit (+) olarak kaydedilmiştir. Adenin eklenmiş karbazol kemosensörü asetonda çözülmüştür ve üç membrana da 10'ar μ L damlatılmış, 1 gün boyunca çekeroçakta kurutulmuştur. Şekil 2.24.'te membrana sabitlenmiş Cmm ssDNA'sının timin bazları ile kemosensörle bağlı adenin bazının hidrojen bağları ile bağlanması gösterilmiştir. Sonraki gün karbazollü membranların FTIR ölçümleri yapılmıştır. Ölçümler Karbazol Cmm kit (-) 2 / Karbazol Cmm kit (+) 2 / Karbazol Bt kit (+) 2 olarak kaydedilmiştir.



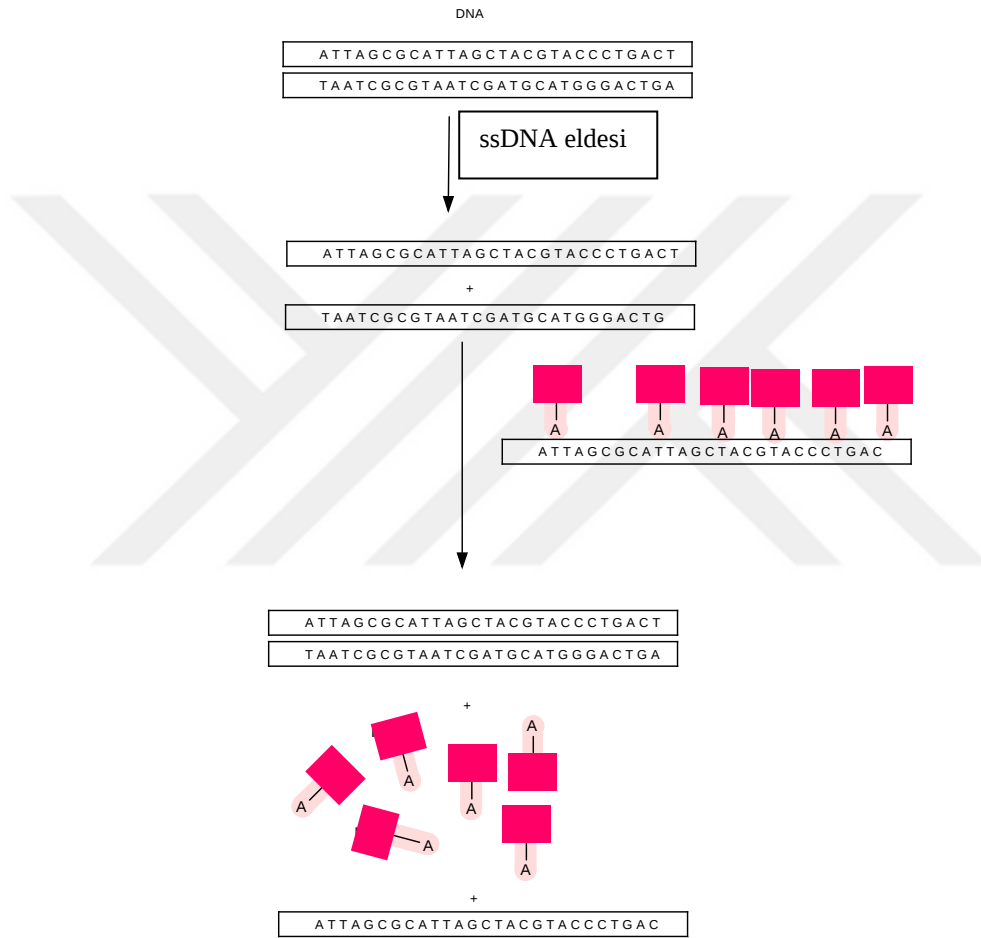
Şekil 2.24. Cmm DNA'sı denatürasyonu ve ssDNA'nın adenin içeren karbazol kemosensörü ile bağlanması

Membranlar su ile yıkanarak tekrar kurutulmuş ve FTIR ölçümleri alınmıştır. Ölçümler Karbazol Cmm kit (-) 3/ Karbazol Cmm kit (+) 3/ Karbazol Bt kit (+) 3 olarak kaydedilmiştir. Son olarak karbazol Cmm kit (-) örneği içeren membrana 10 μ L Cmm kit (+) ssDNA'sı, karbazol Cmm kit (+) örneğine 10 μ L Bt kit (+) ssDNA'sı, karbazol Bt kit (+) örneğine 10 μ L Bt kit (+) 2 ssDNA'sı eklenmiştir. Ölçümler Karbazol Cmm kit (-) 4/ Karbazol Cmm kit (+) 4/ Karbazol Bt kit (+) 4 olarak kaydedilmiştir. Çizelge 2.3.'te tüm örnekler ve yapılan aşamalar verilmiştir.

Çizelge 2.3. Cmm ve Bt DNA'larının uğradığı işlemler

Aşamalar/Örnekler	Cmm kit (-)	Cmm kit (+)	Bt kit (+)
Membrana Sabitleme	Karbazol-Cmm kit (-)	Karbazol Cmm kit (+)	Karbazol Bt kit (+)
Karbazol Muamelesi	Karbazol Cmm kit (-) 2	Karbazol Cmm kit (+) 2	Karbazol Bt kit (+) 2
Su ile Yıkama	Karbazol Cmm kit (-) 3	Karbazol Cmm kit (+) 3	Karbazol Bt kit (+) 3
İkinci DNA'nın Eklenmesi	Karbazol-Cmm kit (-) 4	Karbazol Cmm kit (+) 4	Karbazol Bt kit (+) 4

Şekil 2.25.'te karbazol kemosensörü ile hibridize olmuş Cmm ssDNA'sına başka bir Cmm ssDNA'sının eklenmesi sonucu karbazol kemosensörünün hibritten ayrılması şematik olarak gösterilmiştir. Sadece timinlerle zayıf bir şekilde bağlanmış olan kemosensör, ortamdaki tamamen komplementer ssDNA zincirlerinin eşleşmesi sonrası hibritten ayrılacaktır. Böylece DNA'nın Cmm DNA'sı olduğu anlaşılabilir ve Cmm tespiti yapılmış olacaktır.

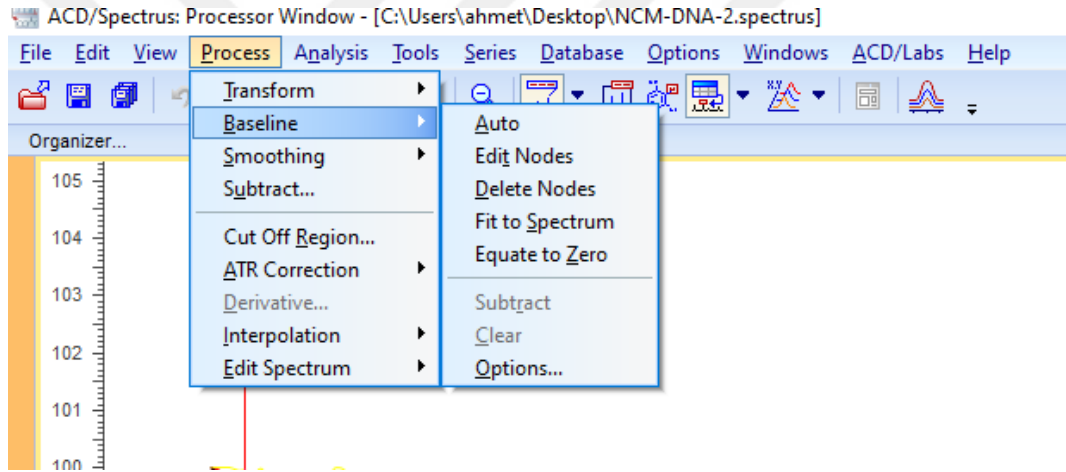


Şekil 2.25. Cmm ssDNA'larının eşleşmesi ile kemosensörün hibritten ayrılması

2.11. FTIR Sonuçlarının İşlenmesi ve ACD/ Spectrus Processor Programıyla Yorumlanması

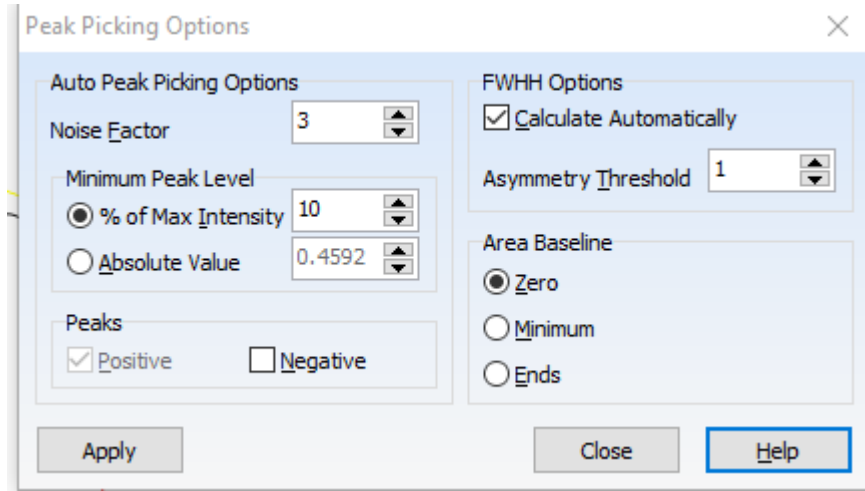
Sonuçların analiz edilmesi için, FTIR cihazından alınan sonuçların işlenmesi gerekmektedir. Bunun için ACD/ Spectrus Processor programı kullanılmıştır. Bu program, FTIR verilerinin işlenmesi, pik alınması ve yorumlama gibi işlevler için tasarlanmış bir programdır.

FTIR verileri bu programa yüklenerek her bir veri için “Auto Baseline Correction” alınmıştır. Böylece sonuçların bir temel çizgisine göre hizalanması sağlanmaktadır. Ardından “smoothing” adı verilen düzeltme/ yumuşatma işlemi uygulanmıştır. Elde edilen verilere son olarak ATR-Correction işlemi uygulanmıştır (Şekil 2.26.).



Şekil 2.26. ACD/Spectrus Programı'nın verileri işleme yöntemleri

Analiz yapabilmek için her örneğin verilerinden pik (zirve) bantları alınmıştır. Pikler alınırken kullanılan parametrelerde “Noise Factor” 3 olarak, minimum pik seviyesi ise % 10 yoğunlukta olacak şekilde ayarlanmıştır (Şekil 2.27.). Bu ayarlamaların yapılması noise yani gürültü olan ve istenmeyen düşük yoğunlukta bantların elenmesi için önemlidir.



Şekil 2.27. Pik tespiti seçenekleri

Alınan pik bantlarının değerlendirilmesi için farklı yöntemler kullanılmıştır. ACD/Spectrus Programının içerdiği veritabanlarından FTIR bantlarının hangi fonksiyonel gruplarını içerdiği bilgisi alınmıştır (Şekil 2.29.). Bu programın yanı sıra IRPal 2.0 ve IR Wizard 2019^{beta} programları kullanılmıştır (Şekil 2.28.). Bu programlar IR frekanslarının hangi fonksiyonel gruplarla ilişkili olduğunu anlamada kullanılan programlardır.

Tüm programlardan alınan sonuçlar ve literatür taraması sonuçları birbirleri ile karşılaştırılarak en net sonuçlara ulaşılmıştır.

IRPal 2.0 TableDriven Infrared Application

File Rule out classes Log Help Exit

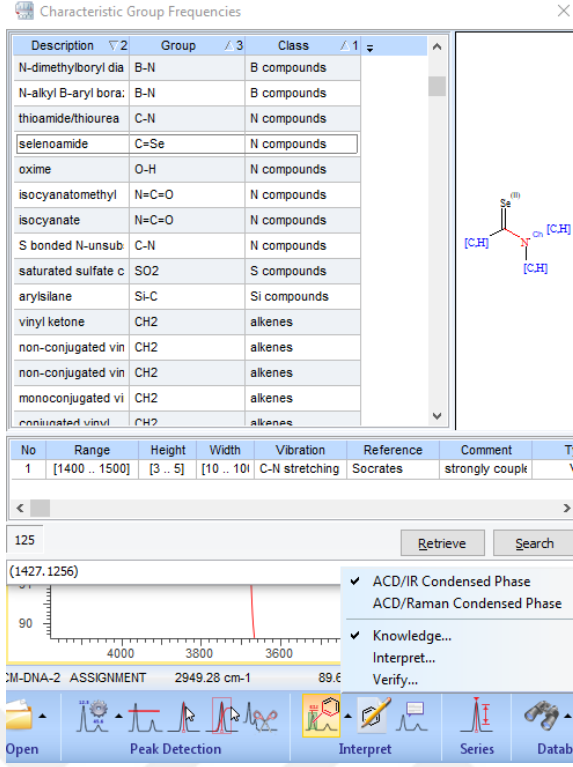
Start a new session 1650 Search Database All classes

Class	Structure	High	Low	Typical	Second	Intensity	Assignment
Alkenes	RCH=CH2	1660	1650	1655		m	C=C stretch
Alkenes	R2C=CH2	1655	1645	1650		m	C=C stretch
Alkenes	6-ring	1654	1644	1649		w	C=C stretch
Alkenes	7-ring	1656	1646	1651		w	C=C stretch
Alkenes	8-ring	1658	1648	1653		w	C=C stretch
Amides	RCONH2	1655	1645	1650		s	C=O stretch
Amides	RCONHR'	1655	1645	1650		s	C=O stretch
Amides	R'CONR2	1655	1645	1650		m	C=O stretch

Data possibly related to selected structure (above)

Class	Structure	High	Low	Typical	Second	Intensity	Assignment
-------	-----------	------	-----	---------	--------	-----------	------------

Şekil 2.28. IRPal 2.0 Programı ile IR analizi



Şekil 2.29. ACD/ Spectrus Processor Programı ile FTIR analizi

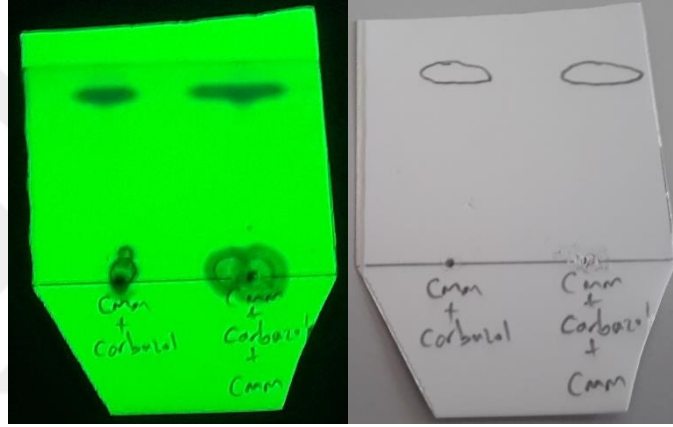
2.12. Karbazol Kemosensörü ile Gözle Görülebilir Teşhise Yönelik Denemeler

Gözle görülebilir teşhis için ince tabaka kromatografisi ve UV görüntülemesi yapılmıştır. Aynı bakteri türü DNA'larının karbazol kemosensörü ile etkileşiminin incelenmesi için silika membran üzerine sırasıyla 10'ar µL kit (-) izole edilen Cmm ssDNA'sı, asetonda çözülmüş karbazol damlatılmıştır. Diğer örnekler olarak kit (-) Cmm ssDNA + karbazol ve kit (-) Cmm ssDNA + karbazol + Cmm kit (+) ssDNA'sı kullanılmıştır. Membran 5 mL etil asetat + 5 mL hekzan içerisinde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir (Şekil 2.30.).



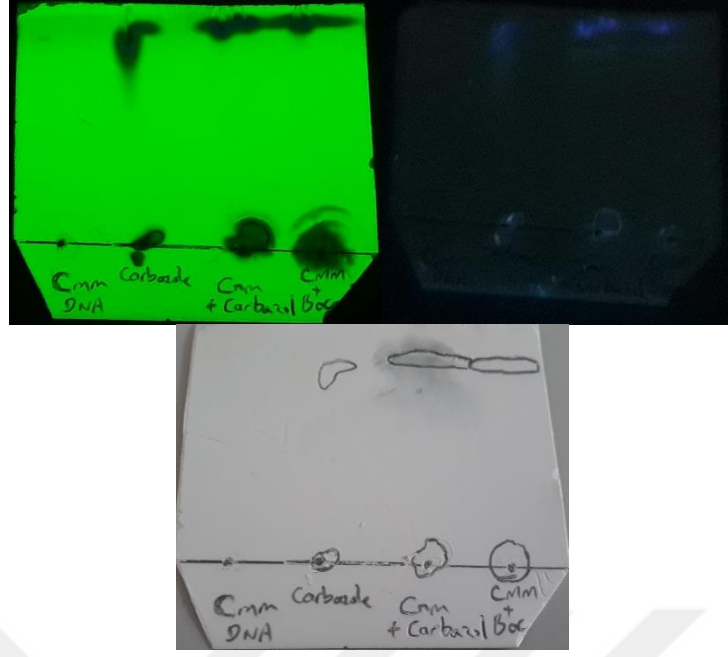
Şekil 2.30. Aynı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümüleri

Aynı işlem referanslar olmadan tekrarlanmıştır (Şekil 2.31.).



Şekil 2.31. Aynı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümüleri

Farklı bakteri türü DNA'larının karbazol kemosensörü ile etkileşiminin incelenmesi için silika membran üzerine sırasıyla 10'ar μL kit (-) izole edilen Cmm ssDNA'sı, asetonda çözülmüş karbazol damlatılmıştır. Diğer örnekler olarak kit (-) izole edilmiş Cmm ssDNA + karbazol ve kit (-) izole edilmiş Cmm ssDNA + karbazol + Bt kit (+) ssDNA'sı kullanılmıştır. Membran 5 mL etil asetat + 5 mL hekzan içerisinde yürütülmüş ve UV altında görüntülenmiştir (Şekil 2.32.).



Şekil 2.32. Farklı bakteri türü DNA'larının karbazol ile etkileşimlerinin TLC görünümleri

3. SONUÇLAR

3.1. BSP-3 Kemosensörünün Sentezi

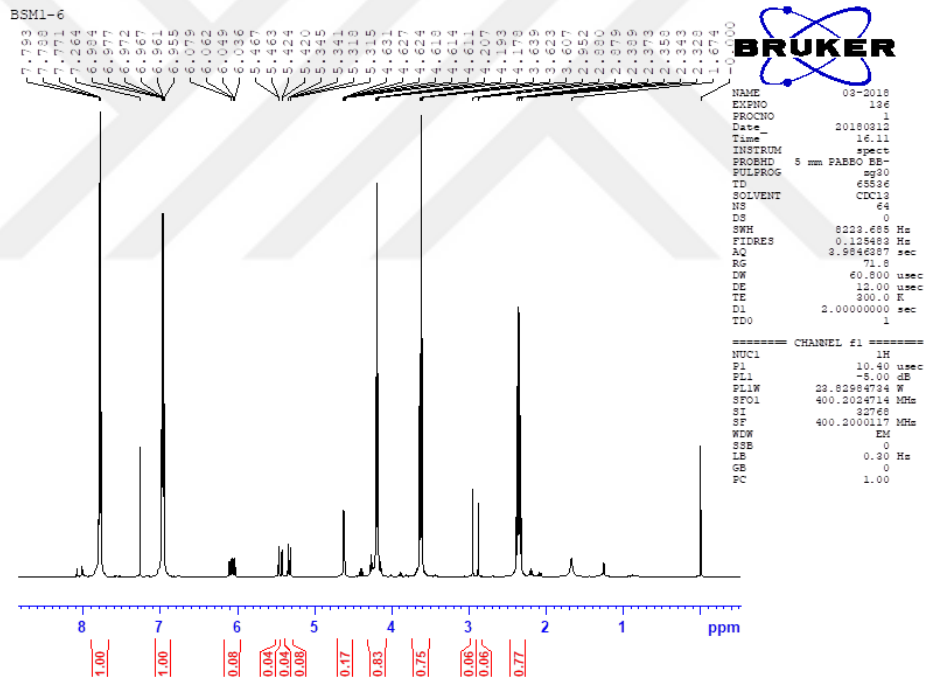
3.1.1. Williamson- eter sentezi

Williamson eter sentez reaksiyonu, 4-hidroksi-benzofenon maddenin 1,3 dibromopropan ile yer değiştirme (SN_2), alkilleme tepkimesi eter eldesinde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir. Reaksiyon sonucunda elde edilen BSP-1 ürününün saflığının analizi için 1H NMR analizi yapılmıştır.

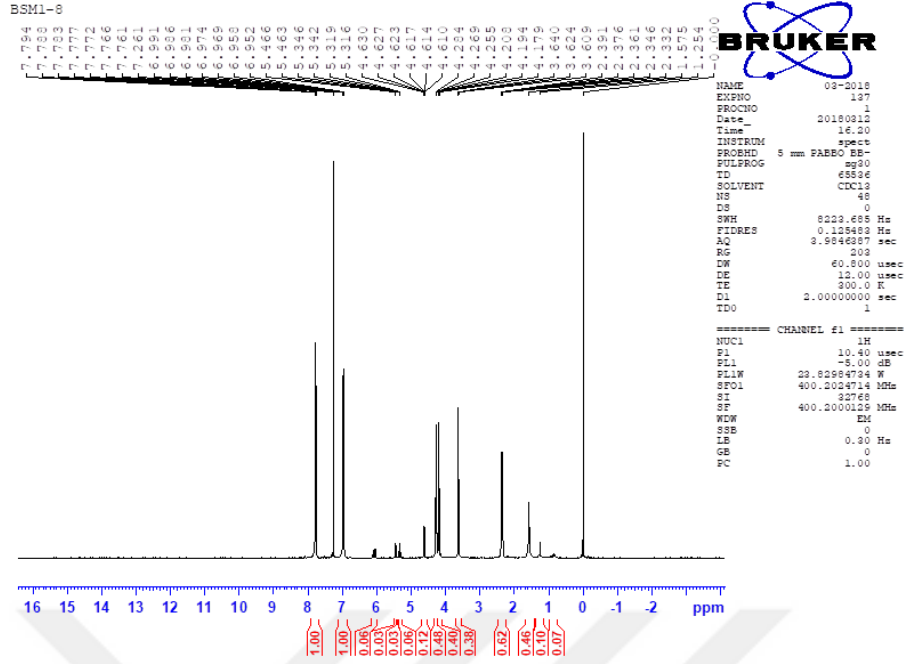
1H NMR ya da proton NMR analizi, herhangi bir molekülün nasıl bir molekül mimarisine sahip olduğunu, molekül üzerindeki hidrojen gruplarının yerleşimini anlama yoluyla spektral data üzerinden yapılan analizdir. Analiz sonucunda beklediğimiz üzere 4,4'-bromopropilbenzofenon (BSP-1) maddesinin pikleri görülmüştür. BSP-1 molekülünün yapısının aromatik bölgesinde iki çeşit proton bulunmaktadır. Bunların pikleri 7.78 ve 6.97 ppm'de görülmüştür. Williamson eter sentezi tepkimesinden sonra alkil olarak propil parçası benzofenon molekülünde bulunan hidroksi grubunu oksijen atomuna bağlamıştır. 1H NMR spektrumunda bu protonların pikleri 4.27, 3.63, 2.36 ppm'de her pikte 2 proton (toplam 6H) olmak üzere görülmektedir. Bu piklerin yanı sıra birçok küçük pikler bulunmaktadır ki bunlar da safsızlığı veya yan ürünlerin olduğunu göstermektedir.

3.1.3. TLC sonrası seçilen örneklerin ^1H NMR sonuçları

TLC sonrası seçilen 1, 5, 6 ve 8 numaralı beherlerdeki numuneler ^1H NMR analizlerinde 6,8 numaralı numunelerde istediğimiz sonuçlar alınmıştır (Şekil 3.3. ve Şekil 3.4.). Analiz sonucunda beklediğimiz üzere bis[4-(3-bromopropoksi)fenil]methanon (BSP-1) maddesinin pikleri görülmüştür. Şekilde görülen 7,79 ve 6,97 ppm'de dublenin dublesi (4J = 2 Hz, 3J = 8.8 Hz) olması, sentezlenmiş maddede aromatik grubun olduğunu göstermektedir. Bunun dışında BSP-1'de 3 farklı $-\text{CH}_2-$ gruplarının varlığı analiz sonuçlarındaki piklerde görülmüştür. ^1H NMR spektrumunda gözlenen tüm piklerin varlığı bizim beklediğimiz ürünü ifade etmektedir. NMR analizine karışım gönderildiği için bazı küçük pikler de görülmektedir. Bu pikler safsızlığı ve gürültü (noise) olduğunu göstermektedir.



Şekil 3.3. BSP-1-6'nın ^1H NMR analiz sonuçları



Şekil 3.4. BSP-1-8'in ^1H NMR analiz sonuçları

3.1.4. McMurry reaksiyonu ile BSP-2 ürünü sentezi ve ^1H NMR analizi

BSP-1-6 ve BSP-1-8 örnekleri birleştirilerek McMurry reaksiyonuna sokulmuş ve reaksiyon sonunda oluşan BSP-2 ürünü kolon kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Kromatografi sonrası 44 numaralı (Şekil 3.5.) ve “son” olarak kodlanan beherlerde fazla miktarda bulunan krem rengi ürün ^1H NMR analiz için seçilmiştir.



Şekil 3.5. McMurry sonrası yapılan kolon kromatografisi sonrası saflaştırılmış olarak elde edilen BSP-2 maddesi

PROC1	16
F2	10.00 MHz
PL1	-1.00 dB
PL12	23.9784734 W
SFO1	400.2624714 MHz
E1	37.68
DP	400.2605122 MHz
WDW	EM
SF0	0
LB	0.30 Hz
GB	0
PC	1.00

Aromatik

Alifatik CH₂'ler

0.94 1.12 1.00 2.40

0.29 1.31 1.25 3.16

3.04

45

Kolon kromatografi sonucunda elde edilen 44 numaralı maddenin ^1H NMR spektrumu şekilde verilmiştir. NMR sonucunda aromatik ve alifatik bölgelerde üçer tane ($-\text{CH}_2-$) görülmesi gerekmektedir ki NMR spektrumun aromatik bölgesinde 7,02, 6,97, ve 6,65 ppm'de hidroksibenzofenon ve benzofenona ait pikler görülmüştür. İlaveten, alifatik ($-\text{CH}_2-$) bölgede 4,01, 3,60 ve 2,27 ppm'de pikler görülmüştür. Bu veriler bize kemosensörün (BSP-2) saf bir şekilde sentezlendiğini göstermiştir.

3.1.5. BSP-2 ürününe ince tabaka kromatografisinde bakılması

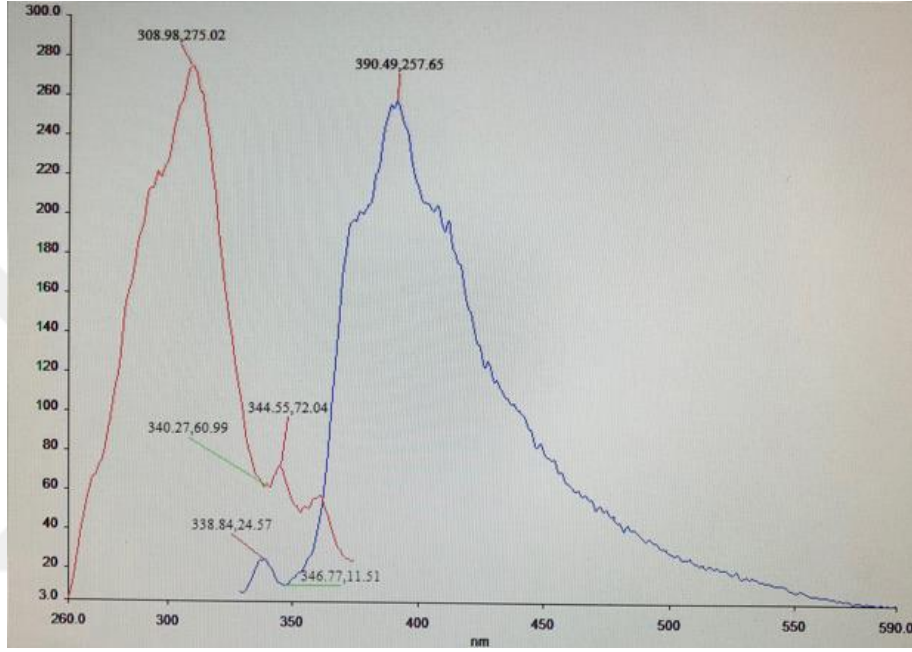
Sentezlenen BSP-2 ürününe ince tabaka kromatografisi sonrası UV lamba altında bakıldığında hedeflendiği üzere kemosensörün floresan özellik gösterdiği görülmüştür (Şekil 3.8.).



Şekil 3.8. BSP-2 örneğinin ince tabaka sonrası UV altındaki görünümü

3.1.6. Kemosensörün floresan spektroskopi ile fotofiziksel özelliklerinin incelenmesi

Yapı tayininden sonra bu kemosensör maddenin fotofiziksel özellikleri floresan spektroskopi yardımı ile tespit edilmiştir. Sentezlenen madde yüksek floresan göstermiştir.

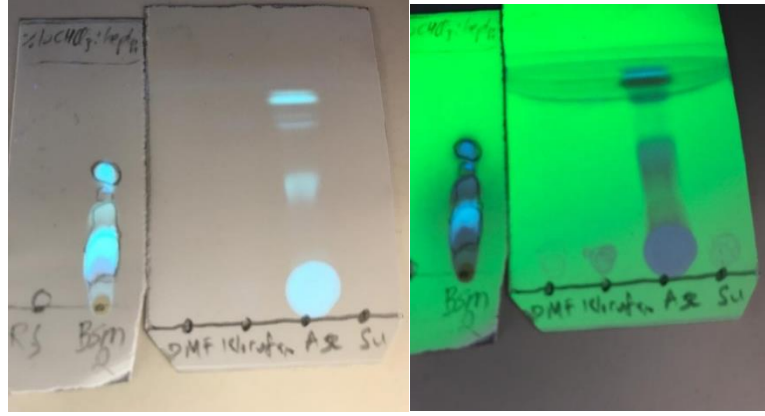


Şekil 3.9. BSP-2 ürününün floresan spektroskopi ile analizi

Yukarıda Şekil 3.9.'da görüldüğü üzere, BSP-2'nin eksitasyon (uyarım) 308.98 nm'de ve emisyon 390.49 nm'de bulunmuştur. Söz konusu uyarma ve emisyon araları (Stokes shift) yaklaşık 82 nm olarak belirlenmiştir. Genellikle 50 nm'den fazla stokes shift olan maddeler iyi floresan maddeler arasında sayılmaktadır. Bu da sentezlenen kemosensörün floresan özelliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

3.1.7. Adenin bazının kemosensöre bağlanması ve ince tabaka kromatografisi

BSP-2 ürününe adenin bazı eklenerek elde edilen kemosensör özellikteki BSP-3 ürününün TLC sonrası UV altında görüntüsü elde edilmiştir.



Şekil 3.10. BSP-3 ürününün TLC sonrası UV altındaki görünümü

Sentezlenen kemosenör adenin bazı ile bağlandıktan sonra da yüksek floresan özellik göstermektedir. Adenin bağlanmış BSP-3 ürününün saflık durumu yukarıda verilmiş olup, bu durum ince tabaka kromatografisi ile kontrol edilmiştir. Mobil faz olarak kloroform, aseton ve DMF kullanılmış fakat aseton harici bir solventle kemosenör yürümemiştir. Sentezlenmiş kemosenör madde çok polar özelliktedir fakat hazırlanan kemosenör madde doğrudan nitroselüloz içeren katı yüzeye sabitlenmiştir. Su ile yıkandığında matriks etkisi gösteren kısım giderileceği için kolon kromatografisi ile saflaştırma tekrar yapılmamıştır.

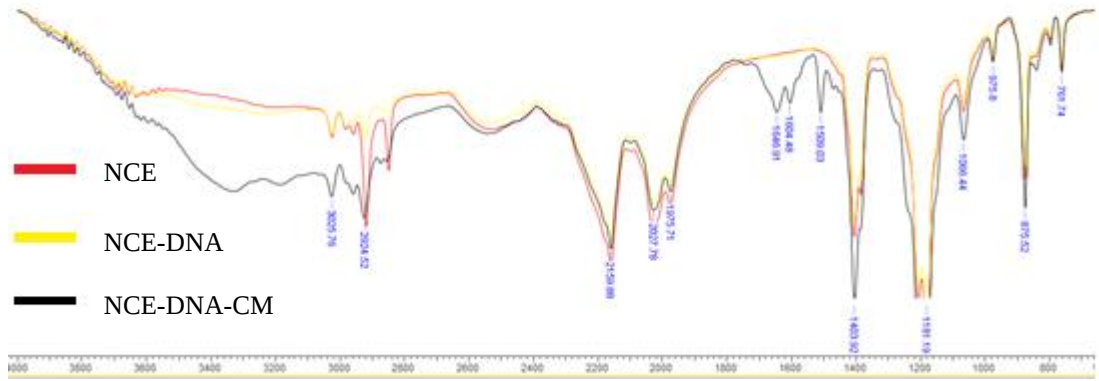
3.2. *E. coli* ve *C. michiganensis* Türlerinin DNA'larının BSP-3 ile Etkileşimleri

3.2.1. *E. coli* DNA izolasyonu yapılarak nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve BSP-3 ile muamele sonrası FTIR analizi

E. coli BL-21 suşundan DNA izolasyonu yapılarak, pH ile denatüre edilmiştir. Böylece tek zincirli DNA formu elde edilmiştir. Blank olarak nitroselüloz membran boş olarak FTIR ölçümü yapılmış ve NCE olarak kaydedilerek kırmızı renkle gösterilmiştir (Şekil 3.11.). Dalga boyları sırasıyla; 2917.73, 2848.79, 2159.56, 2027.17, 1404.86, 1181.52, 1066.47, 975.29, 875.25, 761.93 olarak kaydedilmiştir. Nitroselüloz yapısında bulunan nitro gruplarının içerdiği N-O bağlarının esneme

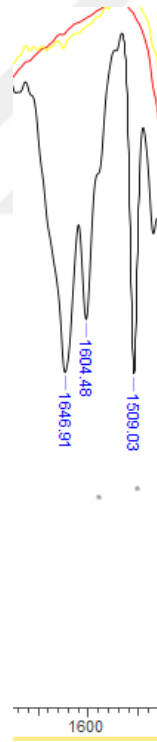
bantları 1000-500 cm^{-1} ara sındaki parmak izi bölgesinde görülmüştür. 1404'de görülen bant ise aromatik C-C bantlarının varlığını göstermektedir. Elde edilen tek zincir DNA (ssDNA) nitroselüloz membrana sabitlenmiştir ve FTIR sonucu alınarak NCE-DNA olarak kaydedilmiştir; Şekil 3.11.'de sarı renk ile gösterilmiştir. Blank + *E. coli* ssDNA FTIR ölçümü sonucu dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2982.37, 2922.59, 2850.27, 2159.88, 2028.75, 1975.71, 1404.89, 1182.15, 1067.41, 975.80, 875.52, 761.74 olarak saptanmıştır. Burada, DNA eklenmesi ile oluşacak 1300-1400 cm^{-1} aralığındaki P=O esnemelerinin çıkması beklenmektedir. Fakat bu denemede çok düşük yoğunlukta bir bant çıktığı için pik olarak değerlendirilmemiştir.

Sentezlenen kemosensör ile membran muamele edilmiş ve böylece kemosensörün içerdiği adenin bazlarının ssDNA üzerindeki timin bazlarıyla ikili hidrojen bağı yaparak eşleşmesi yoluyla kemosensörün DNA'ya bağlanması sağlanmıştır. FTIR sonucu alınarak NCE-DNA-CM olarak kaydedilmiş ve siyah renkle gösterilmiştir (Şekil 3.11.). Blank + *E. coli* ssDNA + BSP-3 FTIR ölçümü sonucu dalga boyları sırasıyla; 2924.25, 2159.77, 2024.98, 1645.56, 1508.97, 1404.18, 1180.99, 1066.08, 975.36, 875.20, 761.97 olarak kaydedilmiştir. Kemosensörün bağlanmasıyla birlikte oluşan yeni bantlar 1645 ve 1508 cm^{-1} 'de görülmüştür. 1500-2000 cm^{-1} aralığı genel olarak çift bantların görüldüğü aralıktır. 1645 ve 1508 cm^{-1} 'de görülen bantlar C=C ve aromatik C=C esnemelerini göstermektedir ki BSP-3 molekülünün varlığının tespiti bu banttan anlaşılmıştır. Aynı zamanda nitroselüloz içerdiği N=O çift bağı bu ölçüm sonucunda görülmüştür. Kemosensörün *E. coli* ssDNA'sı ile hibridize olduğu sonucuna bu pikler sayesinde varılmıştır. Bu çalışma kemosensör-DNA hibridizasyonunun gerçekleşip gerçekleşmediğini anlamak için yapılmış çalışmalardan biridir. Görülen bantların hangi bağlanmaları içerdiği sonucuna hem literatür taranarak hem de IRPal 2.0 ve IR Wizard 2019^{beta}, ACD/ Spectrus Processor programları aracılığıyla kontrol edilerek ulaşılmıştır.



Şekil 3.11. *E. coli* DNA'sı ve DNA-Kemosensör hibritinin FTIR analiz sonucu

Şekil 3.12.'de ise kemosenörün tespit edildiği C=C bölgesinin vertikal yaklaşılmış görüntüsü görülmektedir.



Şekil 3.12. BSP-3'ün varlığını gösteren 1600 cm^{-1} bölgesindeki bantların vertikal yaklaşılmış görüntüsü

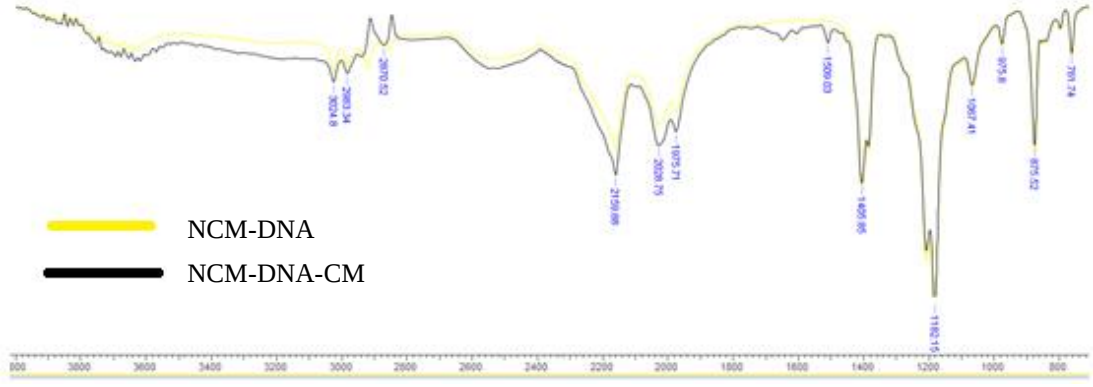
3.2.2. *C. michiganensis subspecies michiganensis* ssDNA'sının nitroselüloz membrana sabitlenmesi ve BSP-3 ile muamele sonrası FTIR analizleri

Cmm DNA'ları sıcaklık kullanılarak denatüre edilmiştir. Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 2917.73, 2848.79, 2159.56, 2027.17, 1404.86, 1181.52, 1066.47, 975.29, 875.25, 761.93 olarak kaydedilmiştir.

İzole edilmiş olarak hazır alınan Cmm DNA'sı sıcaklıkla denatüre edilmiştir. Denatüre edilmiş Cmm ssDNA'sı nitroselüloz membrana sabitlenmiştir. Blank + Cmm DNA'sını içeren membranın yapılan FTIR sonuçları NCM-DNA olarak kaydedilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2982.37, 2919.70, 2852.20, 2159.88, 2027.78, 1975.71, 1404.89, 1182.15, 1067.41, 975.80, 875.52, 761.74 şeklindedir.

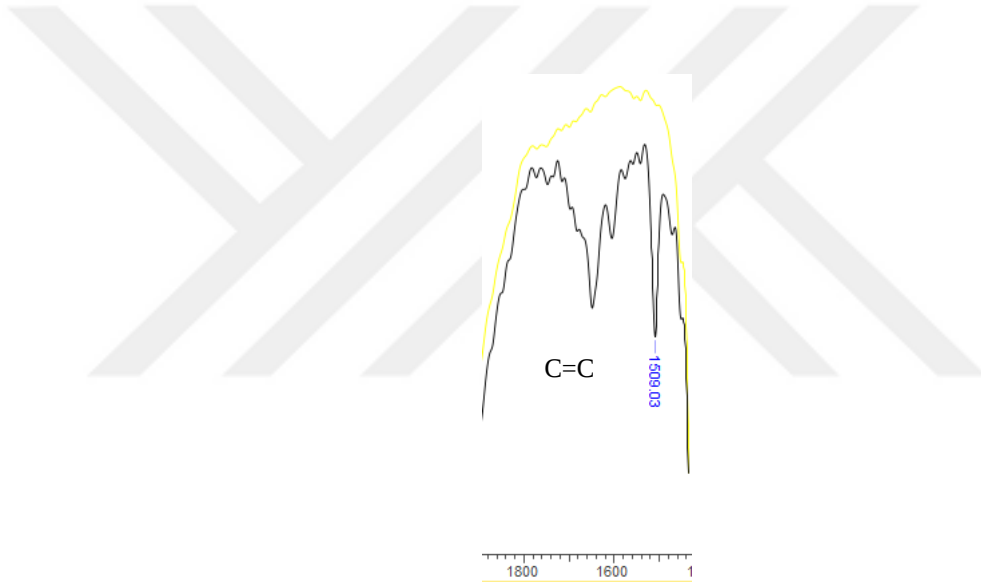
3024'de görülen bant DNA yapısında bulunan O-H ve N-H gibi esneme hareketlerini gösteren hidrojen bantlarıdır. 1105'te görülen bant C-N, C-C ve C-O gibi karbon bağ esneme hareketlerini, 1029'da görülen bant C-O ve P-O esnemelerini göstermektedir. Fosfat grubu bağlarının görülmesi DNA'nın membrana hibridize olduğunu göstermesi bakımından önemlidir.

Cmm ssDNA'sı içeren membrana BSP-3 kemosensörü eklenmiş ve FTIR ölçümü yapılarak NCM-DNA-CM olarak kaydedilmiştir. Bu durum siyah renkle gösterilmiştir (Şekil 3.13.). Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2983.34, 2870.52, 2159.88, 2028.75, 1975.71, 1509.03, 1405.85, 1182.15, 1067.41, 975.80, 875.52, 761.74 şeklinde saptanmıştır. Burada 1509 cm^{-1} 'de görülen bant BSP-3'ün içerdiği C=C çift bağını göstermesi bakımından önem taşımaktadır. Kemosensörün membrana hibridize olduğu bu bant aracılığıyla gösterilmiştir.



Şekil 3.13. Cmm ssDNA'sı ve DNA-Kemosensör hibritinin FTIR analiz sonucu

Sonucun vertikal yakınlaştırılmış görüntüsü de aşağıda verilmiştir.



Şekil 3.14. Cmm-BSP-3 kemosensör hibridizasyonunu gösteren C=C bantının yakınlaştırılmış görüntüsü

3.3. Aynı Bakteri (Cmm-Cmm) Türlerinin DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimi

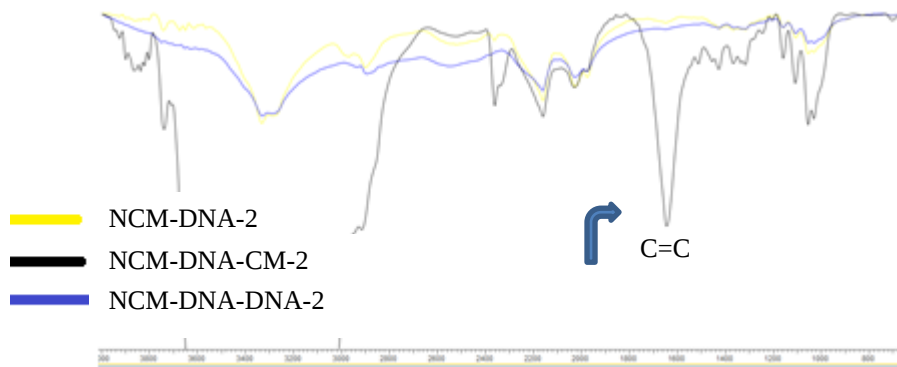
Kemosensörün membrana hibridizasyonunun denemelerinden sonra aynı türün DNA örnekleri arasındaki hibridizasyonun FTIR analizi için Cmm DNA'ları kalıp olarak görev almıştır.

Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 2917.73, 2848.79, 2159.56, 2027.17, 1404.86, 1181.52, 1066.47, 975.29, 875.25, 761.93 olarak kaydedilmiştir.

Cmm DNA'sı sıcaklıkla denatüre edilerek ssDNA'lar elde edilmiştir. Elde edilen Cmm ssDNA'sı nitroselüloz membrana sabitlenerek FTIR ölçümü yapılmış ve NCM-DNA-2 olarak kaydedilmiştir. Bu ölçüm sarı renkle gösterilmiştir (Şekil 3.15.). FTIR sonucunda görülen bantlar; 3330.91-105, 2897.83-106, 2160.06-98, 2026.23-98, 1314.98-100, 1157.83-99, 1106.25-96, 1053.27-94 şeklinde olmuştur. Yeni görülen bantlardan; 3330'da O-H ve N-H bantlarının esneme, 1314 ve 1157'de P=O bağlarının esneme, 1106'da C-O, C-N ve C-C esnemeleri 1053'te P-O esneme hareketleri bulunmaktadır.

Cmm ssDNA'sı içeren membrana BSP-3 kemosenörü eklenmiş ve FTIR ölçümü alınarak NCM-DNA-CM-2 olarak kaydedilmiştir. NCM-DNA-CM-2 grafiği siyah renkle gösterilmiştir (Şekil 3.15.). Dalga boyları sırasıyla; 3277.74, 2870.65, 2160.05, 2025.24, 1622.56, 1314.74, 1158.16, 1106.43, 1028.40 olarak görülmüştür. BSP-3 eklenmesi ile 1622 cm^{-1} 'de C=C çift bağı keskin bir bant olarak görülmüştür.

Blank + Cmm ssDNA + BSP-3 içeren membrana Cmm ssDNA'sı eklenmiş ve FTIR ölçümü alınarak NCM-DNA-DNA-2 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.15.'te mavi renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3330.60, 2894.75, 2161.90, 2026.90, 1427.13, 1315.27, 1029.84, şeklindedir. BSP-3 ile ortaya çıkan 1622 cm^{-1} 'deki bant bu örnekte kaybolmuştur.



Şekil 3.15. Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu ile oluşan FTIR görüntüleri

Cmm ssDNA'ları ile yapılan FTIR sonuçlarında; kemosensörün eklenmesinin ardından oluşan 1622 cm^{-1} dalga boyundaki sivri bantın, aynı türün DNA'ları ortamda olduğunda gözükmemesi, kemosensörün ortamdan ayrıldığı şeklinde yorumlanmıştır. Kemosensör sadece adenin bazı ile DNA'ya bağlandığından, aynı türün ssDNA'larının eşleşmesine göre son derece zayıf kalmış ve beklendiği üzere DNA'dan ayrılmıştır. Böylece Cmm ssDNA'larının eşleştiği ve Cmm teşhisinin yapılabildiği görülmüştür.

3.4. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri

Cmm'nin BSP-3 kemosensörü ile teşhisinde izolasyon kiti kullanımının rolünün ve teşhisin daha hızlı yapılabilirliğinin anlaşılması için kit (-) ve kitli izole edilmiş DNA'ların birbirleri ve kemosensörle yapacakları hibridizasyonun FTIR analizleri yapılmıştır.

3.4.1. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü

İzolasyon kiti kullanılmadan yapılan DNA izolasyonu için nutrient agar besiyerinde büyütülen Cmm izolatından kaynatma metodu ile DNA eldesi gerçekleştirilmiştir. Nutrient broth besiyerinde büyütülen Cmm izolatından Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası DNA örneklerinin spektrofotometrede A_{260} , A_{230} ve A_{280} dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür (Çizelge 3.1.).

Çizelge 3.1. İzole edilen Cmm DNA'larının konsantrasyon ve saflık ölçümü sonuçları

DNA Örnekleri	Cmm kit (-)	Cmm kit (+)	Cmm Kit (+) 2
Konsantrasyon (ng/μL)	402	28.9	1.76
A ₂₆₀ /A ₂₈₀	0.6	1.72	2
A ₂₆₀ /A ₂₃₀	0.17	2.44	0.2

Çizelgede görüldüğü üzere en yüksek DNA konsantrasyonu kit (-) izole edilen DNA'dan çıkmıştır. Cmm kit (+)'de elde edilen DNA miktarı kitle izolasyona göre ideal bir değerdedir. Cmm kit (+) 2'de ise istenen düzeyde DNA elde edilememiştir.

Spektrofotometre sonuçlarına bakıldığında beklendiği üzere kit (-) izolasyonda yüksek DNA konsantrasyonu ama safsızlık görülmüş, kitli izolasyonlarda düşük DNA konsantrasyonu fakat daha saf DNA örnekleri elde edilmiştir. Diğer bir sonuç olarak ideal değerlere daha yakın değerleri veren Cmm kit (+) DNA'sı sonraki aşamalar için seçilirken Cmm kit (+) 2 DNA'sı ile çalışılmamıştır.

3.4.2. Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) ssDNA'larının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, BSP-3 ile muamelesi ve FTIR analizleri

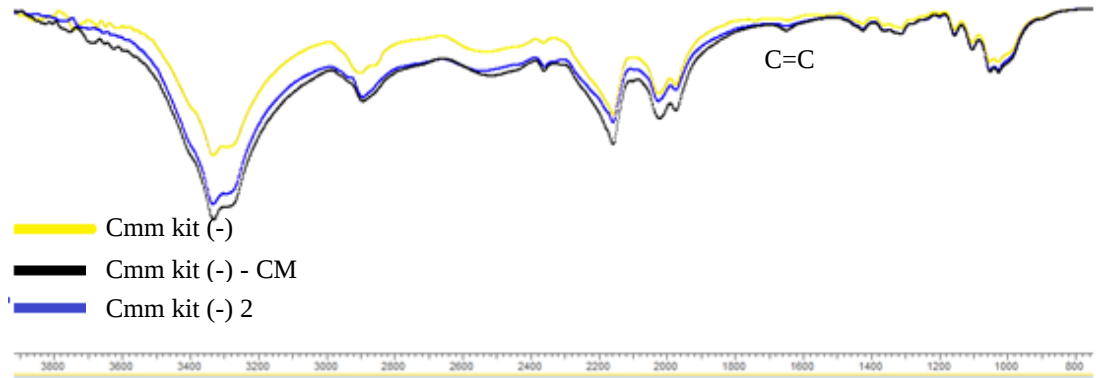
İzole edilmiş Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) DNA'ları sıcaklık kullanılarak denatüre edilmiştir. Elde edilen ssDNA'lar -20 °C'de saklanmıştır. Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 2917.73, 2848.79, 2159.56, 2027.17, 1404.86, 1181.52, 1066.47, 975.29, 875.25, 761.93 olarak görülmüştür.

Kitsiz izole edilmiş Cmm ssDNA'sı nitroselüloz membrana damlatılmış, FTIR ölçümü yapılarak Cmm kit (-) olarak kaydedilmiştir. Cmm kit (-) Şekil 3.16.'da sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.46, 2902.46 2364.40, 2159.97, 2026.90, 1427.13, 1315.27, 1029.84 olarak görülmüştür. 3334'de çıkan bant N-H ve O-H esnemelerini göstermektedir. 1315'de görülen bant DNA'da bulunan fosfat grubunun içerdiği P=O esnemesidir.

Cmm kit (-) ssDNA'sı içeren membran BSP-3 ile muamele edilmiş, FTIR ölçümü alınarak Cmm kit (-) -CM olarak kaydedilmiştir. Cmm kit (-) -CM Şekil 3.16.'da siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.46, 2896.68, 2362.47, 2161.90, 2024.98 1652.77, 1427.13, 1315.27, 1029.84 olarak görülmüştür. Burada önemli görülen bant oluşumu 1652'deki bant oluşumudur. Bu bant BSP-3'de bulunup DNA'da bulunmayan alifatik C=C veya aromatik C=C esnemelerini göstermektedir. BSP-3'ün vermiş olduğu bu bantın yoğunluğunun önceki denemelerden daha az yoğun olduğu görülmüştür.

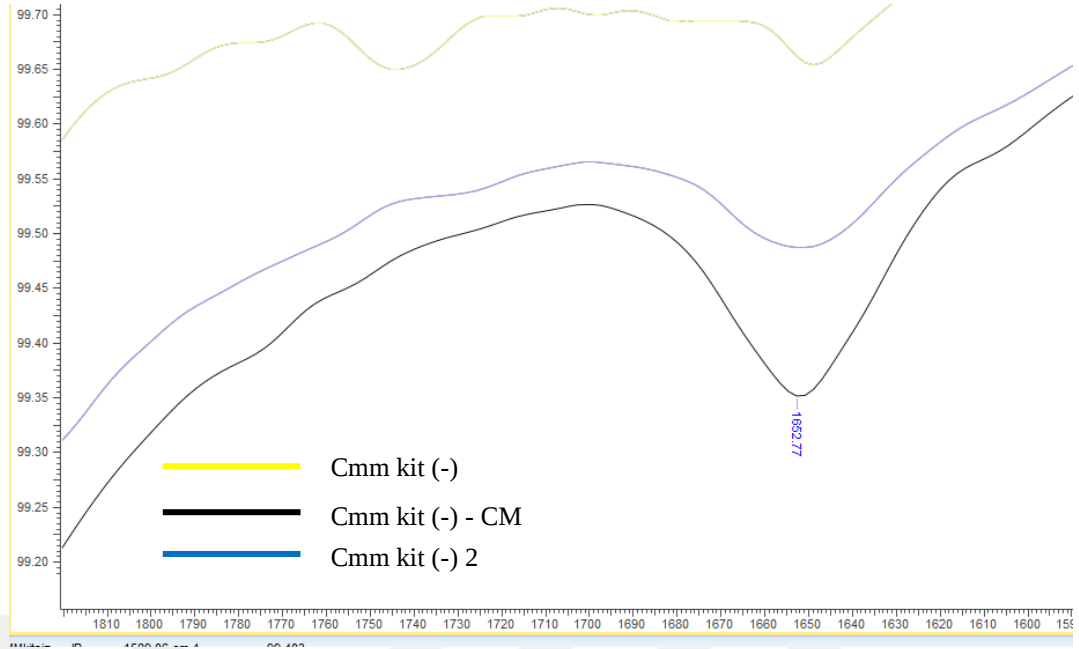
Kemosensörle muamele sonrası kitle izole edilmiş Cmm ssDNA'sı membrana damlatılmış, FTIR ölçümü yapılmış ve Cmm kit (-) 2 olarak kaydedilmiştir. Cmm kit (-) 2 Şekil 3.16.'da mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3336.39, 2896.68, 2362.47, 2159.97, 2028.83, 1427.13, 1315.27, 1052.99 olarak görülmüştür.

Bir önceki aşamada BSP-3 kemosensörü ile birlikte görülen 1652'deki bant, bu aşamada kaybolmuştur. Birbirine komplementer olan Cmm ssDNA'ları ortamda olduğunda kemosensör-DNA hibridizasyonu bozulmuş ve beklendiği üzere kemosensör ortamdan çıkmıştır. Fakat buradaki ayrım bir önceki Cmm-Cmm arasındaki ayrım kadar belirgin olmamıştır.



Şekil 3.16. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

Şekil 3.17.'de ise C=C esnemesinin oluşturduğu bantın yakınlaştırılmış görüntüsü gösterilmiştir.



Şekil 3.17. Kemosensör ayırımının yapılmasını sağlayan bant görünümünün odaklandırılmış hali

Aynı deney sonuçların doğrulanabilmesi ve daha belirgin bir ayırım yapabilmek için tekrarlanmıştır. Bu sefer, spesifik bağlanmaların giderilmesi için su ile yıkama da aşamalara eklenmiştir. Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Şekil 3.18.'de kırmızı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

Blank + Kit kullanılmadan izole edilmiş Cmm ssDNA FTIR ölçümü yapılarak Cmm kit (-) olarak kaydedilmiştir. Cmm kit (-) Şekil 3.18.'de sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3332.39, 2896.56, 2547.50, 2161.81, 2030.68, 1427.07, 1315.21, 1027.87 olarak görülmüştür. Bir önceki denemede olduğu gibi 1315 cm^{-1} dalga boyunda P=O bağ esnemesi Cmm ssDNA'sı ile birlikte ortaya çıkarken blankte görülen birçok pik kaybolmuştur.

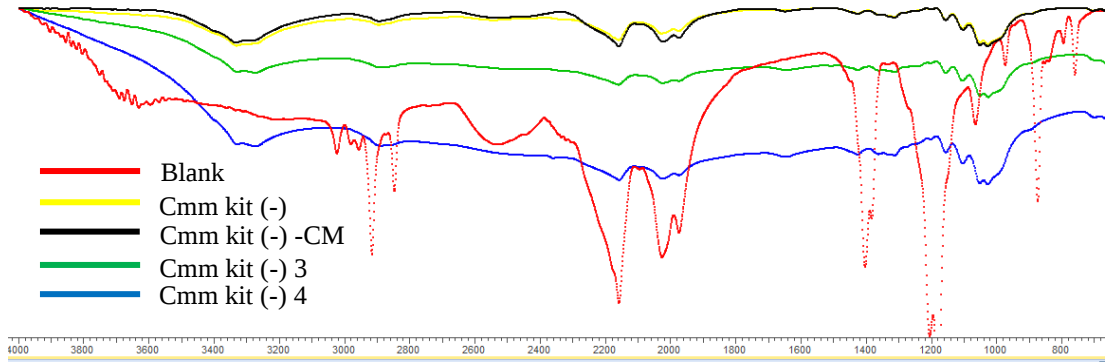
Blank + Kit kullanılmadan izole edilmiş Cmm ssDNA + BSP-3 FTIR ölçümü yapılmış, Cmm kit (-) -CM olarak kaydedilmiş ve Şekil 3.18.'de siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.32, 2896.56, 2535.93, 2159.88, 2026.82-99, 1650.77, 1427.07, 1315.21, 1158.12-98.5, 1029.80, 663.39 şeklindedir. 663 ve

1650 cm^{-1} 'de çok zayıf yoğunluğa sahip bantlar çıkmıştır. Kemosensörle birlikte gelen C=C bağı esnemesi burada da çok zayıf olarak görülmüştür.

Blank + Kit kullanılmadan izole edilmiş Cmm ssDNA + BSP-3 + Su ile Yıkama sonrası FTIR ölçümü alınmış ve Cmm kit (-) 3 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.18.'de yeşil renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3272.61, 2892.70, 2159.88, 2026.82, 1427.07, 1315.21, 1027.87 şeklindedir. BSP-3 ile birlikte gelen 1650 cm^{-1} 'deki bant kaybolmuştur. Yıkama sonucunda zayıf bağlanan kemosenörün yıkama etkisiyle çıktığı düşünülmektedir.

Blank + Kit kullanılmadan izole edilmiş Cmm ssDNA + BSP-3 + Su ile Yıkama + Kitle izole edilmiş Cmm ssDNA FTIR ölçümü yapılmıştır. Cmm kit (-) 4 olarak kaydedilmiş ve Şekil 3.18.'de mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3274.54, 2984.63, 2161.81, 2026.82, 1427.07, 1315.21, 1027.87, 663.39 olarak görülmüştür. Herhangi bir bant değişikliği görülmemiştir.

Bu denemede kemosenörün zayıf bağlanması ve yıkamanın etkisiyle, hibritten ayrıldığı düşünülmektedir. Bu nedenle kesin bir sonuca varılamamıştır.



Şekil 3.18. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

Genel itibariyle DNA izolasyon kiti kullanılmadan yapılan Cmm teşhisleri başarılı olsa da kit kullanılarak yapılan analizlere göre daha az belirgin gözükmemiştir.

3.5. *Bacillus thuringiensis* Türlerinin ssDNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimi

Teşhis yönteminin Cmm haricindeki farklı mikroorganizmalarda uygulanabilirliğinin gösterilmesi için farklı bir bakteri türü olan *Bacillus thuringiensis* seçilmiştir. *Bacillus thuringiensis* (Bt) türlerinin kendi arasında ve BSP-3 ile olan hibridizasyonlarına bakılmıştır.

3.5.1. İzole edilen Bt DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü

Nutrient brothta büyütülmüş Bt izolatlarından Thermo Scientific GeneJET Genomic DNA Purification Kiti kullanılarak DNA izolasyonu yapılmıştır. İzolasyon sonrası DNA örneklerinin spektrofotometrede A_{260} , A_{230} ve A_{280} dalga boylarındaki absorbans değerleri ölçülmüştür. Örnekler Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 olarak ifade edilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. İzole edilen Bt DNA'larının konsantrasyon ve saflık ölçümü sonuçları

DNA Örnekleri	Bt kit (+)	Bt kit (+) 2
Konsantrasyon (ng/ μ L)	18.1	38
A_{260}/A_{280}	1.47	1.75
A_{260}/A_{230}	1.39	1.48

İki örnekten de yeterli konsantrasyonda DNA elde edilmiştir. A_{260}/A_{280} oranlarına bakıldığında Bt kit (+)'de protein ya da fenol kontaminasyonu görülürken Bt kit (+) 2'in ideale yakın olduğu görülmüştür. RNA kontaminasyonunun olmaması iki örneğin de kullanılabilmesi için önemlidir. A_{260}/A_{230} oranları yine fenol ya da EDTA, guanidin HCL gibi izolasyon kiti bileşenlerinin kontaminasyonunu işaret

etmektedir. Bu kontaminasyonların kemosensörle oluşacak hibridizasyonda sıkıntı yaratacak bir derecede olmaması nedeniyle iki örnek de ileriki aşamalarda kullanılmak üzere seçilmiştir.

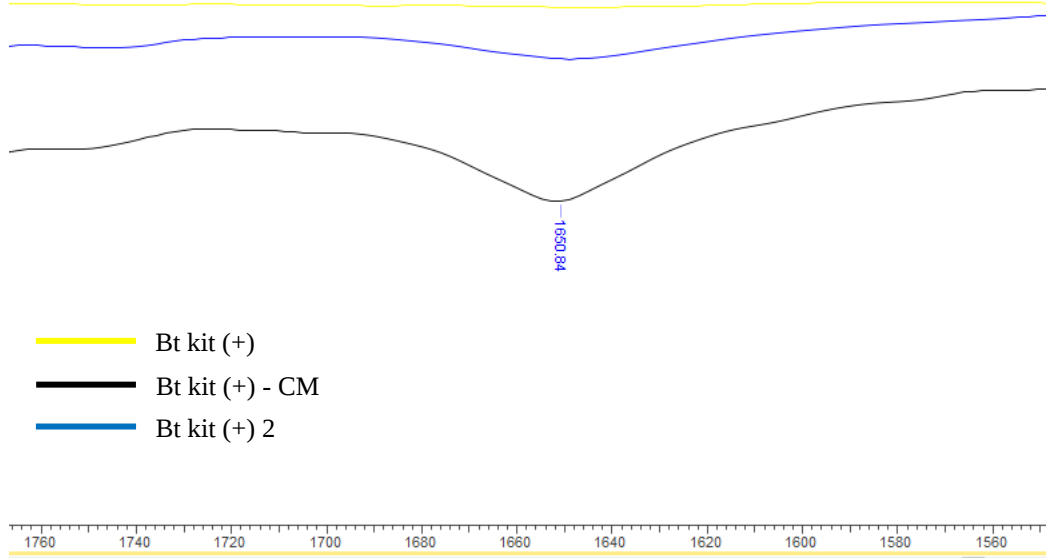
3.5.2. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile etkileşimi ve FTIR analizleri

İzole edilen Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 DNA'ları sıcaklık kullanılarak denatüre edilmiş ve -20 °C' de saklanmıştır. Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

Bt kit (+) ssDNA'sı nitroselüloz membrana damlatılmış ve FTIR sonucu alınarak Bt kit (+) olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.19.'da sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3866.74, 3745.24, 3338.32, 2894.75, 2522.54, 2362.47, 2161.90, 2028.83, 1427.13, 1315.27, 1027.92 olarak görülmüştür. 3000 üstünde bolca H bağlarının vibrasyonları görülmüştür. Önceki deneylerde olduğu gibi 1315 cm⁻¹'de P=O bağının varlığı belirlenmiştir.

Bt kit (+) ssDNA'sı içeren membrana BSP-3 damlatılmış ve FTIR sonucu alınarak Bt kit (+) -CM olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.19.'da siyah renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3837.81, 3625.67, 3336.39, 2898.61, 2362.47, 2161.90, 2026.90, 1652.77, 1427.13, 1315.27, 1052.99 olarak görülmüştür. Önceki deneylerde olduğu gibi BSP-3'ün eklenmesi ile 1652 cm⁻¹'de C=C veya aromatik C=C bantı belirlenmiştir.

Kemosensör muamelesi sonrası membrana Bt kit (+) 2 ssDNA'sı damlatılmış ve FTIR ölçümü yapılmıştır. Bt kit (+) 2 olarak kaydedilerek mavi renkle gösterilmiştir (Şekil 3.19.) Dalga boyları sırasıyla; 3334.46, 2898.61, 2360.54, 2159.97, 2026.90, 1315.27, 1052.99 olarak saptanmıştır. BSP-3 ile görülen 1652'deki bant beklendiği üzere burada gözükmemektedir. Komplementer Bt ssDNA'larının varlığı ile BSP-3 hibritten ayrılmıştır. Böylece Cmm teşhisinde uygulanan yöntemin başka bir bakteride de çalıştığı sonucuna varılmıştır.



Şekil 3.19. BSP-3 varlığına bağlı olarak FTIR tekniği ile *Bacillus thuringiensis* türlerinde yapılan ayırım

Aynı deney, sonuçların doğrulanabilmesi için tekrarlanmıştır. Bu sefer spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için su ile yıkama da aşamalara eklenmiştir.

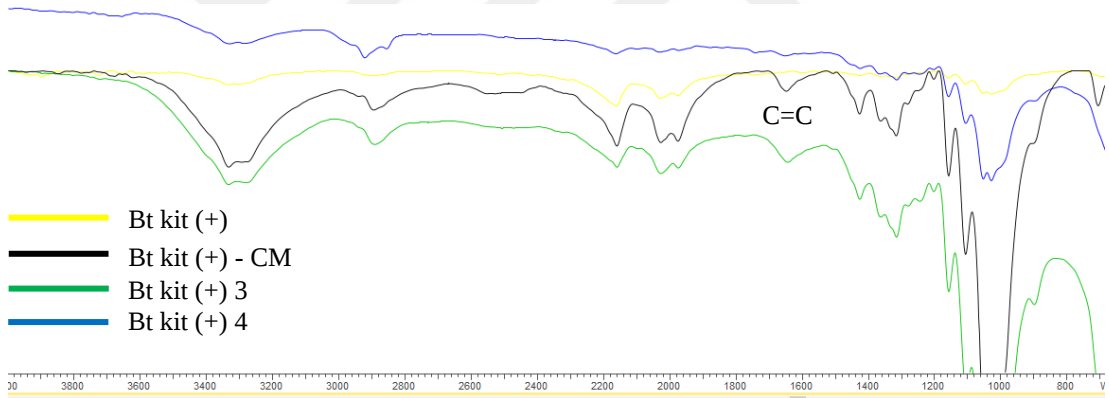
Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

Blank + *Bacillus thuringiensis* ssDNA'sının FTIR ölçümü yapılarak Bt kit (+) olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.20.'de sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3897.43, 3725.80, 3334.32, 2898.49, 2514.72, 2161.81, 2028.75, 1747.19, 1425.14, 1315.21, 1027.87, 611.32 olarak görülmüştür. Diğer örneklerden istisna olarak 1747 cm⁻¹'de C=O bağı esnemesi görülmüştür.

Blank + *Bacillus thuringiensis* ssDNA + BSP-3'ün FTIR ölçümü yapılmıştır. Bt kit (+) -CM olarak kaydedilerek Şekil 3.20.'de siyah renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3332.39, 2894.63, 2537.86, 2159.88, 2026.82, 1427.07, 1315.21, 1027.87 olarak saptanmıştır. Burada, kemosensörümüzün vermiş olduğu spesifik bant (1500-1650 aralığı) pik olarak düşük yoğunlukta görülmüştür.

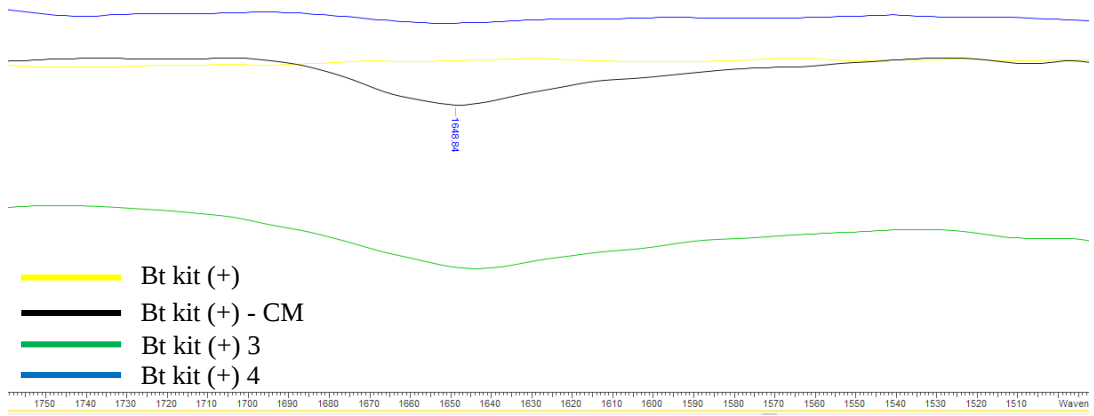
Blank + *Bacillus thuringiensis* ssDNA + BSP-3 + Su ile Yıkama sonrası FTIR ölçümü yapılmıştır. Bt kit (+) 3 olarak kaydedilerek Şekil 3.20.'de yeşil renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3334.32, 2892.70, 2159.88, 2028.75, 1644.98, 1427.07, 1315.21, 1027.87, 599.75 şeklindedir. BSP-3'ün bir önceki aşamada beklenen bant olan 1644 cm^{-1} , yıkama sonrası daha yoğun olarak görülmüştür. Yıkamanın bu deneyde pozitif bir katkı verdiği düşünülmüştür.

Blank + *Bacillus thuringiensis* ssDNA + BSP-3 + Su ile Yıkama + *Bacillus thuringiensis* ssDNA'sının FTIR ölçümü yapılarak Bt kit (+) 4 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.20.'de mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3329.88, 2921.47, 2162.94, 1314.47, 1157.78, 1105.79, 1052.76, 1028.58, 666.66 şeklindedir. Yıkama sonrası görülen 1644'deki bant, diğer Bt ssDNA'sı membrana eklendiğinde gözükmemektedir. FTIR bantları beklendiği gibi çıksa da yıkamanın analize nasıl etki ettiği kesin olarak anlaşılamamıştır.



Şekil 3.20. *Bacillus thuringiensis* türlerinin ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

C=C bağı ile kemosensörü gösteren ve sonrasında komplementer ssDNA'ların ortamda olması sonucu kemosensörün ayrıldığını anladığımız bölgenin odaklanmış görüntüsü Şekil 3.21.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.21. BSP-3 varlığına bağlı olarak FTIR tekniği ile *Bacillus thuringiensis* türlerinde yapılan ayırım

3.6. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA Örneklerinin Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimleri ve FTIR Analizleri

Farklı türlerin DNA'ları kullanılarak yöntemin negatif kontrolü yapılmıştır. Farklı türlerin DNA'ları kullanılarak bu DNA'ların hibridizasyonunda kemosenörün ortamdan çıkmaması ve negatif sonuç vermesi beklenmektedir.

Önceki deneylerde elde edilmiş -20 °C' de bulunan Cmm kit (+) ve Bt kit (+) olarak adlandırılmış ssDNA örnekleri kullanılmıştır. Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

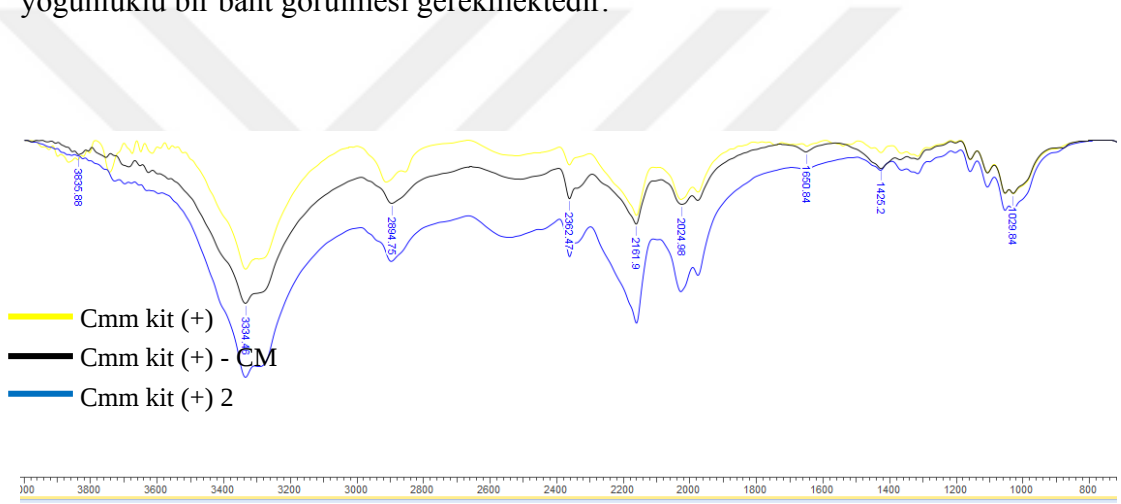
Cmm kit (+) ssDNA'sı nitroselüloz membrana damlatılmış ve FTIR sonucu alınarak Cmm kit (+) olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.22.'de sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3866.74, 3743.31, 3334.46, 2912.11, 2362.47, 2159.97, 2026.90, 1315.27, 1027.92 şeklinde saptanmıştır. DNA ile birlikte 1315'te P=O ve 1027'de P-O bantları gözükmemektedir.

Cmm kit (+) ssDNA'sı içeren membrana BSP-3 damlatılmış ve FTIR sonucu alınarak Cmm kit (+) -CM olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.22.'de siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.46, 2362.47, 2161.90, 2021.12, 1650.84,

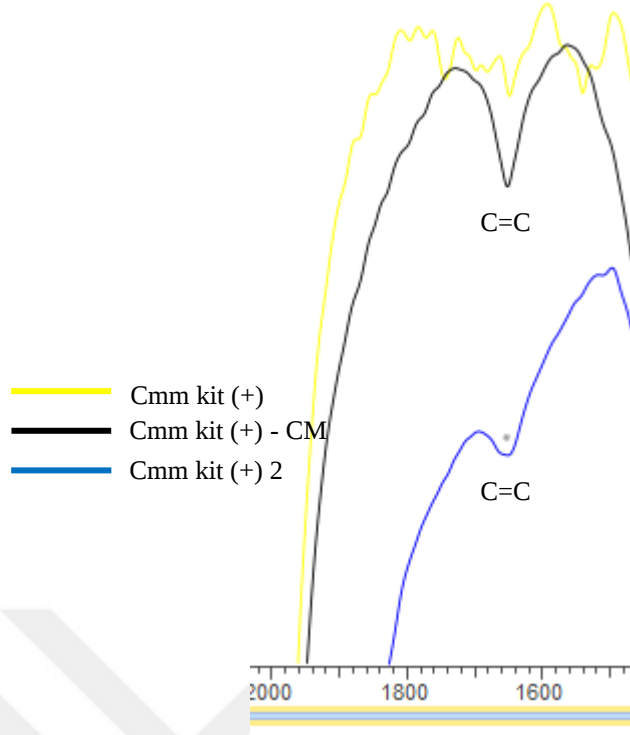
1425.20, 1315.27, 1027.92, 661.49 şeklindedir. BSP-3 ile birlikte 1650 cm^{-1} 'de beklenen C=C bandı görülmektedir.

Kemosensör muamelesi sonrası membrana Bt kit (+) ssDNA'sı damlatılmış ve FTIR ölçümü alınmıştır. Cmm kit (+) 2 olarak kaydedilerek Şekil 3.22.'de mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.46, 2896.68, 2362.47, 2159.97, 2026.90, 1427.13, 1315.27, 1052.99 şeklinde görülmüştür.

Burada farklı bakteri DNA'ları ortamda olduğunda BSP-3'ün çıkmaması ve 1650'de bant göstermesi beklenmekteydi. Fakat bu örnekte 1650'de görülen bant çok düşük yoğunluktadır ve Cmm kit (+) -CM ile karşılaştırıldığında anlamlı bir fark oluşturmamıştır. Kemosensörün çıkmadığını görmek için daha keskin ve yüksek yoğunluklu bir bant görülmesi gerekmektedir.



Şekil 3.22. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü



Şekil 3.23. Kemosensörün vermiş olduğu 1650 cm^{-1} 'deki C=C bantlarının yakın görünümü

Bu sebepten deney sonuçlarının daha belirgin çıkması için tekrarlanmıştır. Bu sefer spesifik olmayan bağlanmaların giderilmesi için su ile yıkama da aşamalara eklenmiştir.

Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

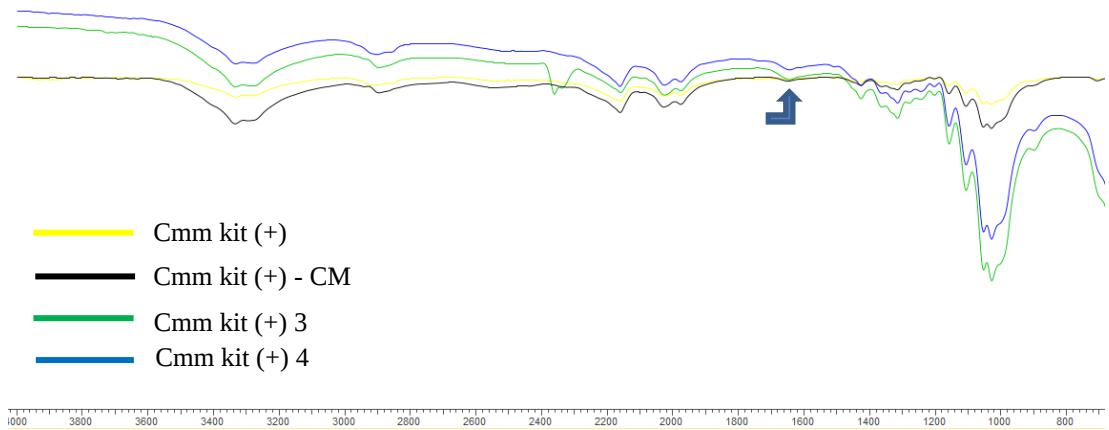
Blank + Cmm ssDNA'sının FTIR ölçümü yapılarak Cmm kit (+) olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.24.'te sarı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3332.39, 2919.70, 2549.43, 2159.88, 2028.75, 1427.07, 1315.21, 1029.80, 663.39 olarak saptanmıştır. Önceki sonuçlarla paralel sonuçlar görülmüştür.

Blank + Cmm ssDNA'sı içeren membrana BSP-3 kemosensörü eklenerek FTIR ölçümü yapılmıştır ve Cmm kit (+) -CM olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.24'te siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.32, 2894.63, 2159.88, 2026.82, 1648.84, 1427.07, 1315.21, 1029.80, 663.39 olarak görülmüştür. BSP-3 eklenmesi

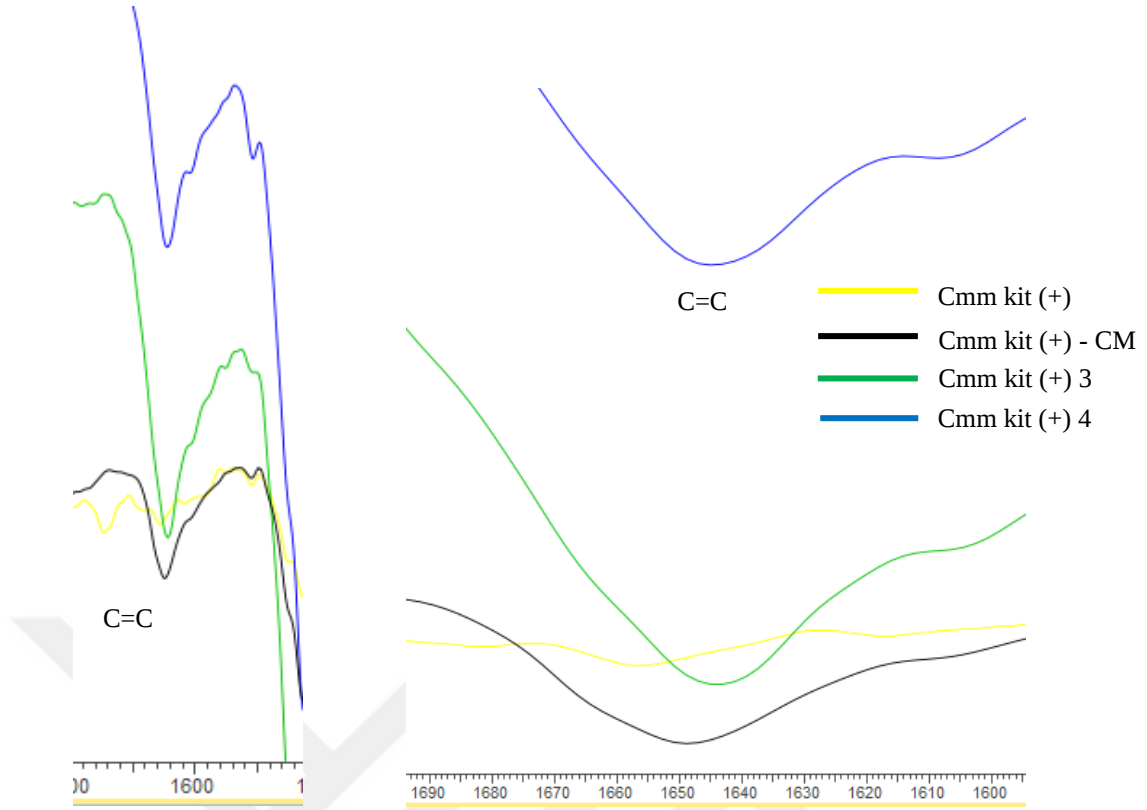
ile 1648 cm^{-1} 'de C=C bantı görülmüştür. Fakat bantın yoğunluğu yine çok düşük seviyede kalmıştır.

Kemosensör eklenmesinin ardından su ile yıkama yapılmış ve FTIR ölçümü alınmıştır. Cmm kit (+) 3 olarak kaydedilerek Şekil 3.24.'te yeşil renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3333.30, 2894.55, 2360.86, 2159.20, 2025.29, 1648.96, 1426.20, 1315.06, 1157.53, 1027.69 şeklindedir. Yıkama sonrası bant değişikliği olmamıştır. 1648'de görülen bant daha yoğun gözükmemektedir.

Son olarak membrana Bt kit (+) ssDNA'sı eklenerek FTIR ölçümü yapılmıştır ve Cmm kit (+) 4 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.24.'te mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3332.23, 2901.13, 2161.00, 2026.34, 1646.78, 1426.75, 1314.56, 1157.87, 1028.11 şeklindedir. Kemosensörle gelen bant düşük yoğunlukta da olsa gözükmemektedir. Bu sefer bantlar arasında ayrım anlamlı bir seviyededir. BSP-3 kemosensörünün farklı türlerin ssDNA'ları ortamda olduğunda ilk bağlandığı ssDNA'dan ayrılmadığı görülmüş ve sonuç negatif çıkmıştır. Böylece Cmm harici başka bir bakterinin DNA'sı ortamda olduğunda kemosensörün varlığı ile Cmm harici DNA varlığı saptanmış olmaktadır.



Şekil 3.24. Cmm ve Bt türlerinin ssDNA'larının birbirleri ve BSP-3 ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü



Şekil 3.25. BSP-3 ile 1648 cm⁻¹'de görülen C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri

3.7. Karbazol Kemosensörü Kullanılarak Yapılan Teşhis Çalışmaları

3.7.1. Karbazol kemosensörünün sentezi

Ticari olarak satın alınan 9H karbazol ile dibromopropan 1 gün boyunca karıştırılarak alkillemeye işlemi gerçekleştirilmiş ve TLC yapılmıştır. TLC'de referans olarak 9H karbazol kullanılmış ve P (product) olarak reaksiyon sonrası oluşan ürün kullanılmıştır. UV lamba altında reaksiyon sonrası oluşan karışımda üç farklı ürün görülmüştür.

Bu sebeple kolon kromatografisi yapılarak saflaştırma işlemi yapılmıştır. Kromatografi sonrası içerisinde kalıntı bulunan beherlerdeki ürünler ile referans 9H karbazol TLC yapılmıştır. UV lamba altında floresan özellik gösteren 3 ve 4

numaralı örnekler birleştirilmiştir. Birleştirilen örnekler ile adenin bazı reaksiyona sokularak karıştırılmış ve sonuç olarak turuncumsu bir renge sahip adenin içeren karbazol kemosensörü elde edilmiştir (Şekil 3.26.).



Şekil 3.26. Adeninli karbazol kemosensörünün görünümü

3.7.2. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile etkileşimleri, bunların FTIR analizleri

Önceki deneylerde kullanılan Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) ssDNA'ları DNA örneği olarak kullanılmıştır. Karbazol kemosensörünün BSP-3 kemosensörü ile karşılaştırılması, DNA-Karbazol, DNA-DNA hibridizasyonları sonucu oluşacak FTIR görüntülerinden faydalanarak Cmm teşhisinin yapılması amaçlanmıştır. Aynı zamanda karbazol kemosensörünün çıplak gözle görülür değişim yaratıp yaratmadığı da incelenmek istenmiştir. Aynı bakteri türünün DNA'ları güçlü bir şekilde birbirine bağlanacağından DNA ve adenin içeren karbazol kemosensörünün bağlantısı kesilecektir. Bunun sonucunda da karbazolun ortamdan çıkması beklenmektedir ki böylece Cmm teşhisi yapılmış olacaktır.

Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. FTIR ölçümü alınarak blank olarak kaydedilmiş ve Şekil 3.27.'de kırmızı renkle gösterilmiştir. Dalga boyları

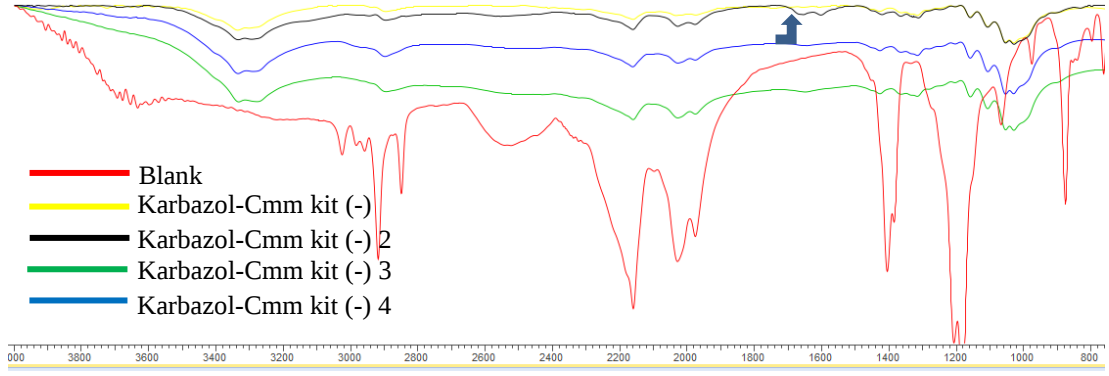
sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

Cmm kit (-) ssDNA örneğinden membrana damlatılarak FTIR ölçümü yapılmıştır. Karbazol-Cmm kit (-) olarak kaydedilerek Şekil 3.27.'de sarı renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3899.36, 3723.87, 3334.32, 2894.63, 2159.88, 2032.60, 1427.07, 1315.21, 1029.80, 661.46 şeklinde olmuştur. ssDNA ile birlikte 1315 ve 1029 cm^{-1} 'lerde P=O ve P-O esnemeleri görülmektedir.

Cmm kit (-) örneğini içeren membrana karbazol kemosensörü damlatılmış ve FTIR ölçümü alınmıştır. Karbazol-Cmm kit (-) 2 olarak kaydedilerek Şekil 3.27.'de siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.32, 2894.63, 2559.08, 2161.81, 2026.82, 1602.56, 1313.29, 1027.87, 663.39 şeklindedir. Karbazol kemosensörünün eklenmesi ile 1602 cm^{-1} 'de C=C ya da C=N bağları görülmüştür. Karbazol molekülünün yapısında çok fazla aromatik C=C bağları bulunurken DNA'da bu sadece bazlarda bulunmakta ve çok az sayıdadır. Bu nedenle karbazolün varlığı veya yokluğu da C=C bantlarının yoğunluğuna bakılarak tespit edilecektir.

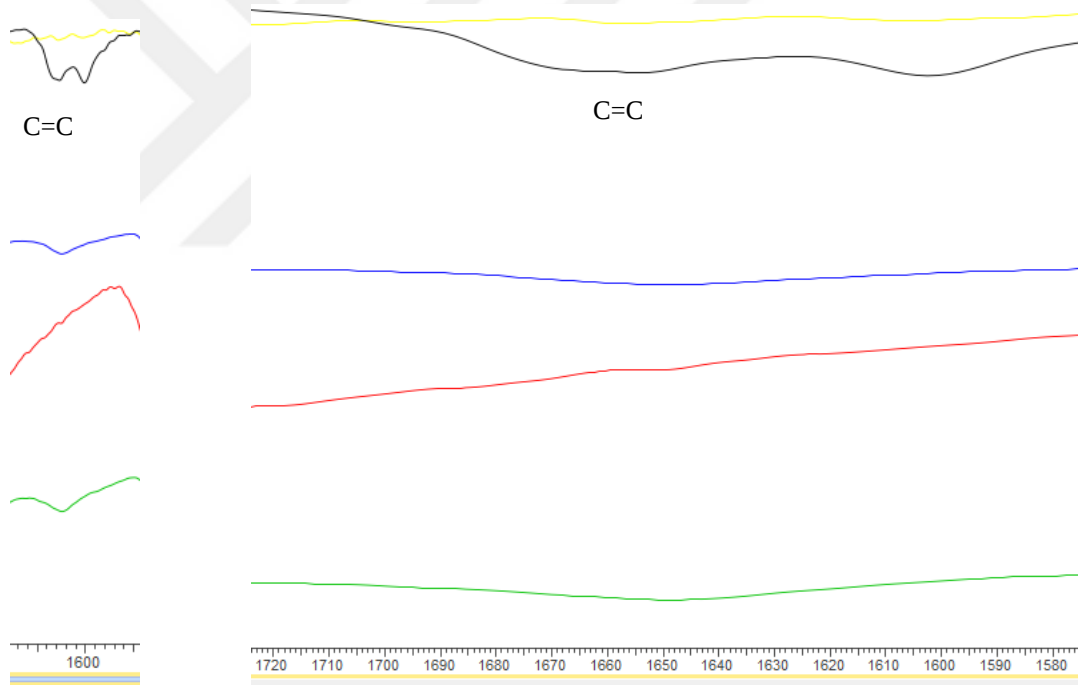
Kemosensörle muamele sonrası membran su ile yıkanarak tekrar FTIR ölçümü alınmış ve Karbazol-Cmm kit (-) 3 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.27.'de yeşil renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3332.39, 3278.39, 2894.63, 2159.88, 2026.82, 1648.84, 1427.07, 1315.21, 1029.80, 665.32, 601.68 şeklindedir. Yıkama ile birlikte C=C bantının yoğunluğu düşmüştür. Bunun kemosensörün ortamdan ayrılmasına etki etmediği konusu tartışmalıdır.

Son olarak membrana Cmm kit (+) ssDNA'sı damlatılmış ve Karbazol-Cmm kit (-) 4 olarak kaydedilmiştir. Şekil 3.27.'de mavi renkle gösterilmektedir. Dalga boyları sırasıyla; 3334.32, 2898.49, 2161.81, 2026.82, 1427.07, 1315.21, 1052.94, 663.39 şeklindedir. 1648'deki bant kaybolmuştur. Bu da beklendiği gibi komplementer Cmm ssDNA'larının ortamda olup birbirine bağlanmasıyla karbazol – ssDNA bağlanmasının bozulduğunu göstermektedir.



Şekil 3.27. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

Şekil 3.28.'de ise 1648 cm^{-1} 'de ayrımın yapıldığı bantın vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.28. Karbazol ile görülen 1648 cm^{-1} 'deki C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri

3.7.3. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosenörü ile etkileşimi ve FTIR analizleri

Cmm harici bir bakteride de karbazol kemosenörü ile teşhisin çalışıp çalışmadığı incelenmek istenmiş ve Bt kit (+), Bt kit (+) 2 ssDNA'ları DNA örneği olarak kullanılmıştır.

Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. FTIR ölçümü alınarak blank olarak kaydedilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

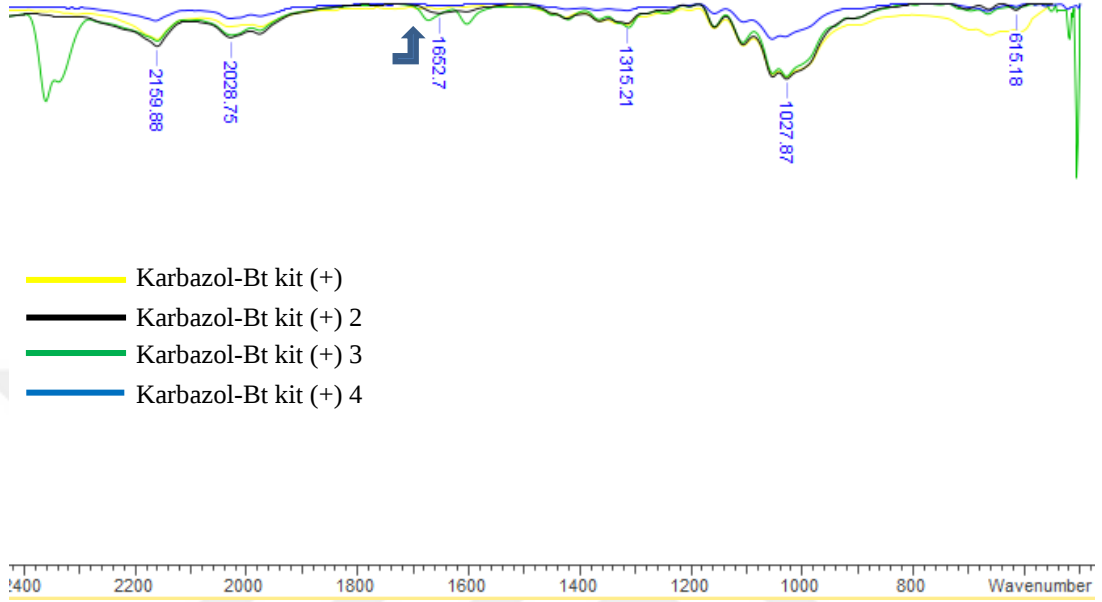
Bt kit (+) ssDNA örneğinden membrana damlatılarak FTIR ölçümü yapılmıştır. Karbazol-Bt kit (+) olarak kaydedilerek Şekil 3.29.'da sarı renkle gösterilmiştir. . Dalga boyları sırasıyla; 3899.36, 3334.32, 2896.56, 2159.88, 2030.68, 1974.75, 1425.14, 1315.21, 1027.87, 663.39 şeklindedir.

Bt kit (+) örneğini içeren membrana karbazol kemosenörü damlatılmış ve FTIR ölçümü alınmıştır. Karbazol- Bt kit (+) 2 olarak kaydedilerek Şekil 3.29.'da siyah renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3675.66, 3332.39, 2900.41, 2159.88, 2028.75, 1652.70, 1315.21, 1027.87, 615.18 olarak saptanmıştır. Diğer denemelerde olduğu gibi kemosenör ile 1652'de C=C bağı görülmektedir.

Membran su ile yıkanarak FTIR ölçümü tekrarlanmıştır. Karbazol-Bt kit (+) 3 olarak kaydedilerek Şekil 3.29.'da yeşil renkle gösterilmektedir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3289.96, 2898.49, 2360.44, 2159.88, 2026.82, 1671.98, 1602.56, 1421.28, 1313.29, 1027.87, 518.76, 505.26 şeklindedir. Yıkama ile birlikte C=C ve C=N bantlarının yoğunluğu artmıştır. Yıkama ile birlikte, tüm denemeler arasında kemosenörün görüldüğü en keskin bantlar bu denemede alınmıştır. Bu, karbazolün BSP-3'e göre daha fazla sinyal verdiğini göstermektedir.

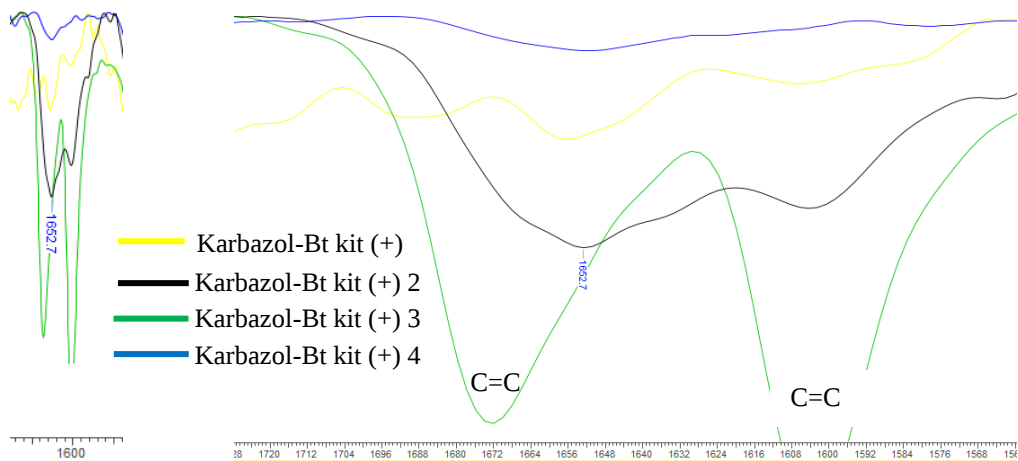
Son olarak membrana Bac-kit 2 ssDNA'sı damlatılarak FTIR ölçümü yapılmıştır. Karbazol- Bt kit (+) 4 olarak kaydedilmiş ve Şekil 3.29.'da mavi renkle gösterilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3677.59, 3334.32, 2917.77, 2163.74, 2028.75, 1315.21, 1052.94, 667.25, 520.69, 503.33 şeklinde ortaya çıkmıştır. Karbazol molekülünün içerdiği C=C bantlarının yoğunluğu azalmıştır. Komplementer

ssDNA'larının ortamda olması ile karbazol molekülü dışarda kalmaktadır. Ayrımın en net görüldüğü denemelerden biri olmuştur. Bu deneme ile karbazolün Cmm harici farklı bir bakterinin teşhisinde de kullanılabileceği gösterilmiştir.



Şekil 3.29. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

Şekil 3.30.'da ise 1652 cm^{-1} 'de ayrımın yapıldığı bantın vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri verilmiştir.



Şekil 3.30. Karbazol ile görülen C=C bantlarının vertikal ve horizontal yakınlaştırılmış görüntüleri

3.7.4. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA örneklerinin birbirleri ve karbazol kemosenörü ile etkileşimleri ve FTIR analizleri

Farklı türlerin DNA örneklerinin birbirleriyle ve karbazol kemosenörüyle olan hibridizasyonları incelenmesi amaçlanmıştır. Farklı türlerin DNA'larının tam olarak eşleşmemesi sonucunda DNA ve adenin içeren karbazol kemosenörünün bağlantısının kesilmemesi beklenmektedir. Böylece karbazol kemosenörü ortamdan ayrılmayacaktır.

Blank olarak boş nitroselüloz membran kullanılmıştır. FTIR ölçümü alınarak blank olarak kaydedilmiştir. Dalga boyları sırasıyla; 3024.80, 2917.77, 2849.31, 2159.88, 2028.78, 1975.71, 1404.89, 1181.19, 1066.44, 975.80, 875.52, 761.74 olarak görülmüştür.

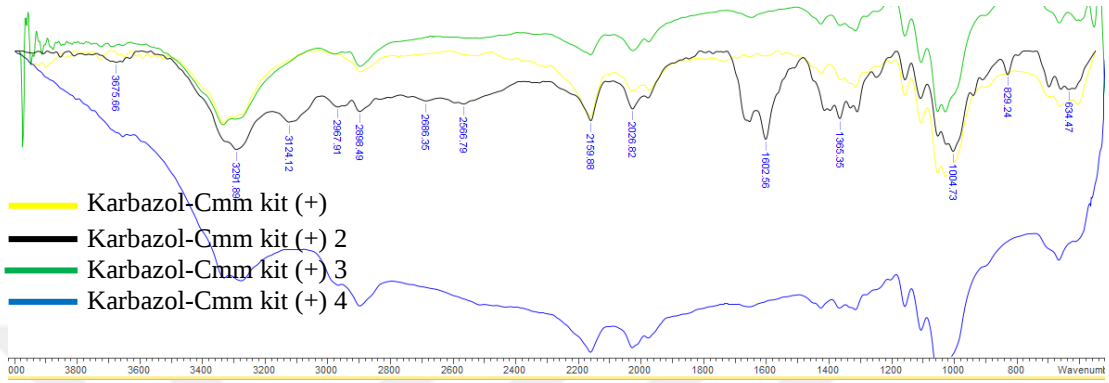
Cmm kit (+) ssDNA örneğinden membrana damlatılarak FTIR ölçümü yapılmıştır. Karbazol-Cmm kit (+) olarak kaydedilerek Şekil 3.31.'de sarı renkle gösterilmiştir. Görülen dalga boyları sırasıyla; 3899.36, 3334.32, 2896.56, 2161.81, 2028.75, 1427.07, 1315.21, 1027.87, 663.39, 605.54 şeklindedir.

Cmm kit (+) ssDNA örneği içeren membrana karbazol kemosenörü damlatılarak FTIR ölçümü alınmıştır. Karbazol- Cmm kit (+) 2 olarak kaydedilerek Şekil 3.31.'de siyah renkle gösterilmektedir. Dalga boyları sırasıyla; 3675.66, 3291.89, 3124.12, 2967.91, 2898.49, 2686.35, 2566.79, 2159.88, 2026.82, 1602.56, 1365.35, 1004.73, 829.24, 634.47 şeklindedir. Karbazol molekülünün eklenmesi N-H ve O-H bantlarını arttırmıştır. 1602'de C=C bağı keskin bir bant şeklinde gözükmektedir.

Membran su ile yıkanarak FTIR işlemi tekrarlanmıştır. Karbazol- Cmm kit (+) 3 olarak kaydedilerek Şekil 3.31.'de yeşil renk ile gösterilmiştir. Dalga boyları yüzdeleri sırasıyla; 3974.57, 3947.57, 3334.32, 2896.56, 1029.80, 516.83 olarak ölçülmüştür. Yıkama ile birlikte karbazolün spesifik bazı bantları kaybolmuştur. Karbazolün yıkama ile ortamdan çıktığı görülmüştür. Bu deneme, yıkamanın negatif etki gösterdiği tek karbazol denemesi olmuştur.

Son olarak membrana Bac-kit 1 ssDNA'sı damlatılarak FTIR ölçümü tekrarlanmıştır. Karbazol- Cmm kit (+) 4 olarak kaydedilerek Şekil 3.31.'de mavi renkle gösterilmiştir.

Dalga boyları sırasıyla; 3276.46, 2898.49, 2161.81, 2028.75, 1427.07, 1317.14, 1052.94, 667.25 olarak ölçülmüştür. Yıkama sonrası karbazol çıktığı için, bu denemede farklı DNA'ların kemosensörü çıkardığı veya çıkaramadığı sonucuna varılamamıştır.



Şekil 3.31. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile hibridizasyonu sonucu oluşan FTIR görüntüsü

Genel olarak karbazol kemosensörü BSP-3'e göre daha keskin bantlar vermiştir. Böylece daha iyi ayırım yapılması mümkün hale gelmiştir. Fakat yıkamanın farklı bakterilerle yapılan FTIR analizindeki negatif etkisi, karbazol ile ayırımın doğruluğunu düşürmektedir.

3.7.5. Karbazol kemosensörü ile çıplak gözle görülebilir teşhis denemeleri

Cmm tespiti için kendi sentezlediğimiz kemosensörün yanı sıra DNA ile hibridize olabilen karbazol kemosensörü de kullanılmıştır. Bu kemosensörün tercih edilme sebebi, FTIR analizine gerek duymadan çıplak gözle Cmm DNA'sının tespitinin yapılmak istenmesidir. Gözle görülebilir teşhis çalışmaları için aynı hibridizasyon işlemleri nitroselüloz membran yerine silika tabaka üzerinde TLC yapılarak yürütülmüştür. UV lamba altındaki görüntüleme sonucunda hiçbir hibridizasyon ve kontrol arasında değişim görülemediğinden gözle görülebilir teşhis yapılamamıştır.

Genel olarak bir değerlendirme yapıldığında, her iki kemosensör de Cmm DNA'sına hibridize olabilmektedir. Karbazolün BSP-3'e göre daha yoğun pikler vermesi

bakımından daha iyi hibridize olduğunu söylenebilir. Bazı sonuçların istenen seviyede çıkmamasının nedenlerinden birisi de budur. Bunun yanısıra kemosensörle muamele sonrası yapılan yıkama işlemleri genel olarak pozitif katkı verse de, kemosensörlerin hibridizasyonunu zayıflatması ve kemosensörün çıkmasına da neden olduğu görülmüştür.

Tüm bu sonuçlar değerlendirildiğinde, iki kemosensörün de Cmm tespitinde ve diğer bakterilerle ayırımında yüksek oranda doğruluk verdiğini göstermektedir. Bu sonuçların denemesi arttırılarak ve optimizasyonla % 100'e yakın bir doğrulukta teşhis yapabilecek bir hızlı tanı kiti prototipini oluşturması mümkün gözükmektedir.



4. TARTIŞMA VE ÖNERİLER

4.1. BSP-3 Kemosensörünün Sentezi

4.1.1. Williamson eter sentezi

Deneyin ilk aşamasında BSP-3 kemosensörünü sentezlemek amacıyla dimetilformamit, dihidroksibenzofenon, dibromopropan ve potasyum karbonat reaktifleri kullanılmıştır. Reaksiyonda çözücü görevini dimetilformamit üstlenmiştir. Reaksiyon sonrası 5 farklı ürün ortaya çıkmıştır. Bunun sebebi olarak, dimetilformamitin çok polar olması sonucunda yer değiştirme reaksiyonunun (SN2) seçiciliğini düşürmesi görülmüştür. Seçiciliği arttırmak için deney daha az polar olan aseton çözücüsü ve ısı (60 °C) kullanılarak tekrardan yapılmıştır. Asetonun organik olması ve deneyde zayıf baz olarak kullanılan potasyum karbonatın anorganik olması sebebiyle, potasyum karbonat aseton içerisinde aktif hale gelmektedir.

Elde edilmiş karışımdan kalan potasyum karbonat ayrılması için karışıma su eklenmiştir. Elde edilmiş BSP-1 maddesi suda çözülmemektedir. BSP-1 kloroform ile yıkanarak anorganik tuzların suya gitmesi, sentezlediğimiz organik maddenin organik faz olan kloroforma gitmesi amaçlanmıştır. Yıkamanın ardından altta kalan faz, beher içerisinde toplanmıştır. Çünkü kloroform sudan ağırdır ve beherin altında bulunmaktadır. Organik faz elde edildikten sonra üst faz kloroform ile üç kez yıkanmıştır. Böylece üst fazda kalma ihtimali olan organik maddelerin de elde edilmesi sağlanmıştır. Ardından huni içerisine filtre kağıdı yerleştirilmiş ve üzerine sodyum sülfat eklenmiştir. Sodyum sülfat, ürünün nemini almak ve kurutma işleminin iyi bir şekilde yapılmasını sağlamak için kullanılmıştır. Elde edilen solüsyon direkt güneş ışığını almayacak bir yerde kurutulmuştur. Güneş ışığı organik

maddelerin yapısını bozmaktadır. Son olarak elde edilen kuru madde $^1\text{HNMR}$ analizi için kullanılmıştır. NMR analizi deuterio-kloroform solvent içerisinde yapılmıştır.

$^1\text{HNMR}$ analizi H atomlarının yerleşimini anlama yoluyla spektral data üzerinden yapılan analizdir. Herhangi bir molekülün molekül mimarisini anlamak için günümüzde sıklıkla kullanılan ve hassasiyeti yüksek olan bir analizdir. BSP-1 molekülünün sentezlendiği, $^1\text{HNMR}$ analizinde görülen piklerden anlaşılmaktadır. Görülen ana piklerin yanı sıra çıkan küçük pikler BSP-1'in saf olmadığını göstermiştir. Bu yüzden saflaştırma amaçlı olarak, kolon kromatografi yöntemi kullanılmıştır.

4.1.2. Kolon kromatografisi ile saflaştırma ve ince tabaka kromatografisi

Elde edilen karışımdan sentezlenen maddeyi saf bir şekilde elde etmek amacıyla kolon kromatografisi gerçekleştirilmiştir. Moleküllerin polariteleri birbirinden farklı olduğu için farklı hızlı kolon içerisinde hareket etmektedirler. İlk başta polar bir solvent konulması durumunda ayırım yapılamayacak ve tüm bileşenler beherde toplanacaktır. Bu sebeple kolona ilave edilen solventlerde az polariteden başlanıp çok polariteye doğru gidilmiştir. Bu sayede kolon içerisindeki bileşenler birbirinden ayrılarak yavaş yavaş gelmiş ve ayırım iyi yapılmıştır. Kolon altında toplanan tüplere toplanan solüsyonlar etiketlenmiş ve çekilecek içerisinde çözücünün buharlaşması sağlanmıştır.

Kolon kromatografi sonrası ürünlerden hangisi ya da hangilerinin istenen ürün olduğunun anlaşılması için ince tabaka kromatografisi (TLC) yöntemi tercih edilmiştir. TLC'de görünen 1, 5, 6 ve 8 no'lu örnekler $^1\text{HNMR}$ analizi için seçilmiştir. $^1\text{HNMR}$ sonuçlarında BSP-1'in içerdiği 3 farklı CH_2 grubunun pikleri ve içerdiği aromatik grubun pikleri görülen 6 ve 8 no'lu örnekler McMurry reaksiyonu için seçilerek birleştirilmiştir. Örneklerin NMR analizinde çıkan diğer küçük pikler gürültü veya safsızlık olabileceğini göstermektedir. Safsızlık nispeten küçük pikler kaynaklı olması sebebiyle önemsenmemiştir.

4.1.3. McMurry reaksiyonu ile BSP-2 ürünü sentezi ve ¹HNMR analizi

BSP-1 sonrası yapılan işlemler, BSP-2 sentez reaksiyonu sonrasında da uygulanmıştır. Kolon kromatografi sonrası seçilen ürünler ¹HNMR analizine gönderilmiş ve NMR sonuçlarında hidroksibenzofenon ve benzofenon moleküllerinin pikleri görülmüştür. Alifatik CH₂ gruplarının piklerinin varlığı da saptantığından kemosensörün sentezlendiği sonucu tasdiklenmiştir. Bunun yanı sıra BSP-2'nin floresan ışıma yapması kemosensör olduğunun anlaşılması için son derece önemlidir. Bu nedenle UV lamba altında bakılmış ve ışıma gözlenmiştir. Kemosensörün fotofiziksel özelliklerinin nicel olarak değerlendirilmesi için floresan spektroskopi yöntemi kullanılmıştır. Floresan spektroskopi yöntemi, floresan ışıma yapabilen moleküllerin tespiti ve floresan özelliğinin ne kadar olduğunu anlamada kullanılan klasik ve güçlü bir yöntemdir. Eksitasyon ve emisyon değerleri arasındaki farktan kemosensörümüzün güçlü floresan özellikte olduğunu söyleyebiliriz.

4.1.4 Adenin bazının kemosensöre eklenmesi ile BSP-3 sentezi

BSP-3 sentezi projenin kemosensör sentez ayaklarından bir tanesidir. BSP-3'ün ssDNA'ya bağlanabilmesini sağlamak için, DNA bazlarından birinin eklenmesi gerekmektedir. Bu tez projesinde adenin bazı seçilmiş ve adenin eklenerek denemeler yapılmıştır. Adenin bazı yerine timin, guanin ya da sitozin kullanılarak da bu teknik uygulanabilir. Özellikle guanin ve sitozin bazları üçlü hidrojen bağı yaptıkları için, guanin ve sitozinin adenin ve timine kıyasla daha farklı sonuçlar verebileceği düşünülmektedir. Adenin yerine guanin ya da sitozin kullanılarak, optimal sonuçları veren bazla teşhis yöntemi spesifikleştirilebilir. Fakat hali hazırda kullanılan adenin bazının da yüksek doğrulukta sonuç verdiği görülmüştür.

Adeninle bağlandıktan sonra oluşturulan BSP-3'ün de BSP-2 gibi güçlü bir floresan özellikte olması elzemdir. Bu sebeple yapılan TLC sonrası örnek, UV lambada incelenmiştir. BSP-3, UV lamba altında yüksek floresan özellik göstermiş ve kemosensör olarak kullanılabilir olduğu kesinleşmiştir.

Kemosensör gibi kompleks moleküllerin sentezinde, her bir reaksiyon aşaması önem arz etmektedir. Her basamakta elde edilen ürünün saf ve hedeflenen molekül olup olmadığı detaylı olarak incelenmelidir. Bizim projemizde kemosensör sentezinin her aşaması, TLC -UV lambada görüntüleme ve NMR analizleriyle incelenmiştir. Bazı reaksiyonlar sonradan sorun oluşturmaması için tekrarlanmıştır. Böylece emin bir şekilde projeye devam edilmiştir.

4.2. Cmm ssDNA'larının BSP-3 ile Etkileşim Testleri

BSP-3 ile ön denemeler için *E. coli* ve *C. michiganensis* bakterileri ile çalışılmıştır. DNA seviyesinde hızlı tanı yapabilmek için, genomik DNA pürifikasyon kiti kullanılarak *E. coli* DNA'sı izole edilmiştir. Hibridizasyon, DNA tek zinciri ile kemosensör arasında gerçekleşeceğinden, DNA denatüre edilerek ssDNA formuna dönüştürülmüştür. *E. coli* DNA'sının denatürasyonu için, pH ile denatürasyon yöntemi tercih edilmiştir. Diğer tüm denemelerde ise sıcaklıkla denatüre etme işlemi uygulanmıştır. İki teknik de denenerek hem karşılaştırma yapmak hem de daha fazla farklı yöntem kullanmak istenmiştir. Her iki yöntemde de literatürdeki farklı bilgiler harmanlanarak optimum sonuçları verecek şekilde denatürasyon işlemleri yapılmıştır.

Denatüre edilen DNA'lar nitroselüloz membrana sabitlenmiştir. Kemosensörlerle hibridizasyon için DNA'ların bir yüzeye sabitlenmesi gerekmektedir. Sabitleme için literatürde bulunan tüm metotlar incelenerek, aralarından uygulaması kolay ve maliyeti düşük bir yöntem olarak nitroselüloza sabitleme yöntemi seçilmiştir. DNA'nın nitroselüloza bağlanması için 1 gün beklenilerek kuru membrandan FTIR ölçümleri alınmıştır.

Tüm denemelerde FTIR analizleri ile teşhis ve ayırım, moleküllerin içerdiği bazı bağların vibrasyonlarının ölçülmesi üzerinden yapılmıştır. İlk Cmm ssDNA'sı membrana sabitlendikten sonra blankten ayrı olarak DNA'da bulunan ama membranda bulunmayan fosfat gruplarının oluşturduğu vibrasyonların görülmesi beklenmiştir. Yaklaşık olarak 1000 ve 1300 cm^{-1} dalga boylarında fosfat gruplarının

oluşturduğu esneme hareketleri görülmektedir. Tüm denemelerde ilk olarak bu frekanslara bakılarak DNA'nın sabitlenip sabitlenmediği anlaşılmıştır.

Denemelerin ikinci kısmını kemosenör muameleleri oluşturmuştur. BSP-3 molekülü DNA molekülünden ayrı olarak alifatik C=C bağı içermektedir. Aynı zamanda hem BSP-3 hem karbazol molekülü fazla sayıda aromatik C=C bağları içermektedir. Kemosenörün DNA'ya bağlanıp bağlanmadığı bu bağların oluşturduğu bantların görülmesi ya da görülmemesi ile anlaşılmaktadır. Kemosenörün membrana eklenmesi ile 1622 cm⁻¹'de görülen bant C=C bandını göstermektedir.

Denemenin en önemli kısmı ise ikinci eklenen ssDNA'dır. Aynı türün ssDNA'ları komplementerlik oluşturduğunda, sadece adenin bazları ile ilk ssDNA'nın timin bazlarına zayıf bir şekilde bağlanmış kemosenörü çıkartmaktadır. Cmm ssDNA'ları ile yapılan çalışmada, kemosenörle birlikte gelen C=C bağı bu aşamada kaybolmuştur. Ayrımın belirgin ve anlamlı düzeyde olması sayesinde ortamda aynı DNA'ların olduğu belirlenmiştir. Böylece bilinmeyen DNA örneğinin Cmm DNA'sı olduğu hızlı bir şekilde tespit edilmiş olmaktadır.

4.3. Hazır Kitle ve Klasik Yöntemle Ekstrakte Edilmiş Cmm DNA'larının Birbirleriyle ve BSP-3 ile Etkileşimleri

Oluşturulacak bir DNA tanı kitinin, hassas ve yüksek doğrulukta tanı yapabilmesi kadar bunu hızlı bir şekilde yapabilmesi de çok önemlidir. DNA tanısı aşamalarından biri olan DNA izolasyonu, kit kullanılarak yapıldığında uzun bir süre almaktadır. Kitli izolasyona görece çok daha kısa olan klasik yöntemle izolasyon yapılarak, tanı süresinin kısaltılması istenmiştir. Klasik yöntem ve kitle izole edilen Cmm DNA'larının BSP-3'ü ortamdan çıkarması ile, klasik yöntemin de izolasyonda tercih edilebileceği anlaşılmıştır.

4.3.1. Kit (-) ve kit kullanılarak izole edilen Cmm DNA'larının spektrofotometrede saflık ve konsantrasyon ölçümü

A_{260}/A_{280} oranı elde edilen DNA'da RNA ve protein kontaminasyonu olup olmadığının anlaşılmasında kullanılır. 260 nm'de nükleik asitler maksimum absorbans verirken 280 nm'de proteinler maksimum absorbans vermektedir. Saf DNA için optimal A_{260}/A_{280} değeri 1.8' dir. 1.8 üzerindeki değerler RNA, altındaki değerler protein, fenol gibi kontaminantların kontaminasyonunu işaret eder. Spektrofotometre sonuçları Cmm kit (+)'de az bir protein ya da fenol kontaminasyonu olduğunu Cmm kit (+) 2'de RNA kontaminasyonu olabileceğini göstermektedir. Kit (-) izole edilen Cmm DNA'sında yüksek derecede protein kontaminasyonu bulunmaktadır. Sonraki aşamada DNA-kemosensör hibridizasyonunu için RNA kontaminasyonu sorun yaratacaktır. Çünkü adenin nükleotidinin RNA molekülündeki urasillere bağlanarak hatalı hibridizasyona neden olma olasılığı vardır. Bu sebepten RNA kontaminasyonu olduğu görülen Cmm kit-2 DNA'sı ileriki aşamalar için seçilmemiştir. Protein kontaminasyonu da istenen bir durum olmasa da kontaminasyonun adenin bağlı kemosensörle hibridizasyonunu ne kadar etkileyeceğini görmek için ihmal edilmiştir.

A_{260}/A_{230} oranı nükleik asit saflığı ölçümünde kullanılan bir diğer parametredir. Genellikle 2.0-2.2 arasındaki değerler kabul edilebilirdir. Bu aralığın altındaki değerler EDTA, fenol, karbohidratlar, guanidin HCL gibi bileşenlerin kontaminasyonunu işaret etmektedir. Yüksek değerler fenolik solüsyon içerisinde bulunan TRIzol bileşeninin kontaminasyonu olduğunu gösterir. A_{260}/A_{230} değerlerine bakıldığında Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) 2'de yüksek miktarda kontaminasyon görülmektedir. Cmm kit (+) 'de diğer örneklerle göre az bir kontaminasyon olduğu söylenebilir.

4.3.2. Cmm kit (-) ve Cmm kit (+) ssDNA'larının nitroselüloz membrana sabitlenmesi, BSP-3 ile muamelesi ve FTIR analizleri

Aynı deneme DNA izolasyon kiti kullanılmadan izole edilen Cmm DNA'sıyla yapılmıştır. BSP-3'ü gösteren bantın yoğunluğu bir önceki denemeye göre düşük

çıkıştır. Aynı DNA'lar ortamda olduğunda kemosensör yine ayrılmıştır. Fakat ayırım daha azdır. Kemosensörün verdiği C=C bandının düşük yoğunlukta olması bunun bir nedeni olarak gösterilebilir. Bunun yanı sıra DNA'nın saf olmaması ve kontaminasyonların olması nedeniyle kemosensör-DNA hibridinin istenen seviyede bağlanma gerçekleşmediği söylenebilir. Saf DNA molekülünün hibridizasyonlarda daha başarılı sonuçlar alınması için önemli olduğu düşünülmektedir.

Spesifik olmayan bağlanmaların engellenmesi için su ile yıkama yapılan denemede ise, yıkama sonrası kemosensörün bant vermemesi, zayıf olan kemosensör bağlanmasını tamamen bitirmiş olabilir. Bu nedenlerden dolayı kit (-) yapılacak izolasyonların optimize edilmesi için daha fazla deneme yapılması gerekmektedir. Teşhis tekniğinin, DNA izolasyon kiti kullanılarak elde edilen DNA'larda uygulanması öncelikli olacaktır.

4.4. *Bacillus thuringiensis* Türlerinin ssDNA'larının Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimi

Teşhis kiti Cmm'ye yönelik hazırlansa da diğer bakterilerde de kullanılabilmesi, kitin daha fazla uygulanabilir olması açısından önemli bulunmuştur. Cmm de olan işlemler Bt için de uygulanmıştır.

Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 olarak kaydedilen Bt DNA'ları ile yapılan çalışmada da Cmm denemelerine yakın sonuçlar görülmüştür. Yıkama ile yapılan denemede, BSP-3 yoğunluğu yıkama ile artmıştır. Yıkamanın bu denemede beklenen pozitif etkiyi yapması, ileriki denemelerde yıkama opsiyonunun kullanılabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte kemosensörün su harici aseton gibi farklı çözücülerle yıkanması da düşünülebilir. Bt deneyleri sonrası, teşhisin diğer bakterilerde uygulanabilirliği açısından ümit vermiştir.

4.5. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA Örneklerinin Birbirleri ve BSP-3 ile Etkileşimleri ve FTIR Analizleri

Yapılan her deneyde, pozitif sonuçların yanı sıra, negatif sonuçlar da test edilmelidir. Teşhisin negatif kontrolü olarak Cmm ile Cmm harici farklı bir bakteri DNA'sının BSP-3'ü çıkarıp çıkarmadığına bakılmıştır. Daha önceden izole ve denatüre edilmiş Bt DNA'sı bunun için kullanılmıştır.

Cmm DNA'sına Bt DNA'sı eklendiğinde BSP-3'ün çıkmaması teorik olarak beklenmektedir. İlk denemede BSP-3 seviyesi Cmm kit (+) 2'de istenen seviyede olmamıştır. Bunun birçok nedeni olabilir. Farklı DNA'larda da spesifik olmayan bazı bağlanmalar olabilir. Önceki denemelerde de olan BSP-3'ün konsantrasyon miktarı da bir etken olabilir. Bt kit (+) membrana eklendiğinde ise BSP-3 yoğunluğu düşmüştür. BSP-3'ün aynı yoğunluğunu koruması ve keskin bir bant vermesi beklenmekteydi. Fakat istenen seviyede olmadığı için deney su ile yıkama yapılarak tekrarlanmıştır.

BSP-3 kemosensörü Cmm kit (+)'e eklendiğinde ilk başta yine düşük yoğunlukta bant veriyse de yıkama sonrası bu bant güçlenmiştir. Sonrasında eklenen Bt kit (+) ile de bantın yoğunluğu değişmemiş ve BSP-3 ortamda kalmaya devam etmiştir. Bu sefer belirgin bir şekilde ayırım görüldüğü için yöntemin çalıştığına kanaat getirilmiştir.

BSP-3 ile yapılan FTIR analizleriyle hızlı tanının yüksek doğrulukta çalıştığı söylenebilir. BSP-3 genel olarak % 6-10 arasında değişen yoğunluklarda bantlar gösterdiğinden bazı denemelerde istenen fark yakalanamamıştır. Gürültü faktörü yüksek tutularak yanlış değerlendirmelere neden olacak bantlar engellenmiştir. Farkların daha belirgin olması için, daha önceden bahsedilen bazı optimizasyonların yapılması gerekli bulunmuştur. Böylece %100'e yakın doğrulukta bir teşhis kiti oluşturulabilecektir.

4.6. Karbazol Kemosensörü Kullanılarak Yapılan Teşhis Çalışmaları

Bu çalışmada, karbazol molekülünün renkli olması sebebiyle çıplak gözle görülebilen bir tanı kitinin oluşturulması amaçlanmıştır. Literatürde karbazol molekülünün insan telomerik G-dört katlı DNA'sına bağlanabildiği ve stabilize olabildiği belirtilmiştir (Gluszynska vd., 2018). UV-görünür, floresan spektroskopi gibi yöntemler kullanılarak incelenmiştir. Anti-kanserojen özellik göstermesi sebebiyle ajan olarak kullanılmıştır. Bu çalışmalardan yola çıkılarak karbazolün bakterilerde DNA tanısında kullanılma potansiyeli araştırılmak istenmiştir. Bununla birlikte karbazol molekülünün insan DNA'sı haricinde bir canlının DNA'sına bağlanıp bağlanmayacağı da bu çalışma ile ortaya konmuştur. Bu sebeple karbazol molekülü seçilmiş ve BSP-3 ile çalışan kitin bir aşama daha ileriye götürülmesi düşünülmüştür.

4.6.1. Karbazol kemosensörünün sentezi

BSP-3 kemosensöründen ayrı olarak başka bir kemosensörün de bu yöntemle çalışıp çalışmadığının anlaşılması için karbazol kemosensörü sentezlenmiştir. Bu kemosensörün çalışılmasının bir diğer nedeni çıplak gözle yapılabilecek bir ayırım ile teşhisin gerçekleşip gerçekleşmediğinin anlaşılmasıdır.

Karbazol kemosensörünün ana maddesi 9H karbazoldür. İlk aşama olarak alkilleme reaksiyonu yapılmış ve TLC yapılarak UV lambada bakılmıştır ve membranda üç farklı ürünün yürüdüğü görülmüştür. Saflaştırma için BSP-3 kemosensöründe olduğu gibi kolon kromatografi yöntemi seçilmiştir. Reaksiyon ürünleri arasındaki polarite farkından dolayı bu yöntemin kullanılması doğru bulunmuştur. Kolon kromatografi sonrası yapılan TLC sonuçlarında floresan gösteren örnekler bizim istediğimiz ürünlerdir. Yöntemin diğer basamağı olan adeninin karbazol kemosensörüne eklenmesinin ardından UV altında istediğimiz şekilde ürünün floresan verdiği görülmüştür. Saflaştırmaların ve her aşamada yapılan TLC kontrollerinin iki kemosensörün sentezinde de başarılı bir yol izlenmesinde önemli bir etkisi bulunmaktadır.

4.6.2. Cmm ssDNA'larının karbazol ile etkileşim testleri

BSP-3 ile yapılan teşhis yöntemine benzer bir yöntemle farklı bir molekül kullanılmak istemiştir. Karbazolün DNA'ya yüksek oranda entegre olabilmesi özelliğinden faydalanmak için bu molekül tercih edilmiştir. Karbazol ile teşhiste de BSP-3'te olduğu gibi aromatik C=C bağlarının hareketlerinden faydalanılmıştır. Aromatik C=C bağlarının DNA bazlarında da bulunması bir sorun teşkil etse de bant yoğunluklarına bağlı olarak karbazolün hibritten ayrılıp ayrılmadığı tespit edilebilir.

Cmm ssDNA'ları ile yapılan denemede, beklendiği gibi karbazol – DNA hibriti bozulmuştur. Fakat burada olan sorun, yıkamanın karbazol yoğunluğunu düşürmüş olmasıdır ve bu da sonucu tartışmalı kılmaktadır. BSP-3 ile yapılan Cmm kit (-) denemeleriyle karşılaştırıldığında, kemosensör yoğunluğu burada da sıkıntı olmuştur ve ayırım belirgin değildir. Bu nedenle kit (-) izole edilen ve kitli izole edilen DNA'ların kemosensörle etkileşimlerinin doğru değerlendirilmesi için daha fazla çalışma ve optimizasyon gerektiği düşünülmektedir.

4.6.3. Bt kit (+) ve Bt kit (+) 2 ssDNA'larının birbirleri ve karbazol kemosensörü ile etkileşimi ve FTIR analizleri

Karbazol molekülünün Bt DNA'ları ile yapılan denemeler, karbazolün en iyi çalıştığı denemeler olmuştur. Bunun hem Bt DNA'larının izolasyon kiti kullanılarak izole edilmesi hem de karbazolün verdiği sinyal gücünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Karbazol BSP-3'e göre daha fazla sinyal vermiştir. Karbazolün membrana eklenmesinin ardından keskin ve geniş bir bant göstermesi ayırımın net yapılabilmesi için çok önemlidir. Kemosensörle muamele sonrası yapılan yıkamanın pozitif veya negatif etkisinin de, kemosensörün bağlanma gücüne bağlı olarak değiştiği düşünülmektedir.

Bt kit (+) 2'nin membrana eklenmesi ile C=C bantları kaybolmuş ve karbazol ortamdan uzaklaşmıştır.

4.6.4. Cmm kit (+) ve Bt kit (+) ssDNA örneklerinin birbirleri ve karbazol kemosensörü ile etkileşimleri ve FTIR analizleri

Karbazolle yapılan denemelerin negatif kontrolü Cmm (Cmm kit (+)) ve Bt (Bt kit (+)) DNA'larının test edilmesiyle gerçekleştirilmiştir. Karbazol membrana eklendiğinde 1602 cm^{-1} 'de bant göstermiştir fakat yıkama ile birlikte bu bant ortadan kaybolmuştur. Yıkama sonrası bantın kaybolması bu denemenin değerlendirilmesini engellemiştir. Karbazol ile denemelerin yıkama olmadan tekrarlanması, karbazolle teşhis yönteminin çalıştığını göstermek için elzemdir.

4.6.5. Karbazol kemosensörü ile çıplak gözle görülebilirliği testi

Karbazol molekülü, turuncu bir renge sahip olmasından dolayı DNA tanısının çıplak gözle yapıp yapılamayacağı test edilmiştir. Nitroselüloz membran yerine silika kullanılarak DNA'lar sabitlenmiştir. DNA'nın silikaya da tutunabildiği bilinmektedir. FTIR'da nitroselüloz membrana uygulanan işlemler silikaya uygulanmış fakat sonuç alınamamıştır. Teşhis, DNA bazında yapılan moleküler bir teşhis olduğundan çıplak gözle görülebilecek bir renk değişimi oluşturmamıştır. Hem hassas hem de çıplak gözle görülebilecek bir değişim için floresan boyaların kemosensör olarak bu teşhis yöntemiyle kullanılabilirliği incelenebilir.

Karbazol BSP-3'e göre daha güçlü sinyaller göstermişse de teşhisin doğruluğundan emin olmak için daha fazla denemeye ihtiyaç vardır. BSP-3 karbazole göre çok daha fazla çalışılmış ve genel olarak daha doğru DNA teşhisleri vermiştir. Hem BSP-3 hem karbazolde daha önceden de bahsedilen optimizasyonlar yapılarak daha net ayrımlar yapılması mümkündür.

4.7. Tanı Kitinin Literatürdeki Bakteriyel DNA Kitleriyle Karşılaştırılması

Bakteriyel DNA hızlı tanı kiti sentez çalışmaları birçok farklı yöntemle gerçekleştirilmektedir. Toprak vd. (2019), bakteriyel menenjit etkenlerinin tespitinde

klasik kültür ve PZR tekniklerini kullanmıştır. Horuz ve Aysan (2018), kabakgil tohumlarında enfeksiyona neden olan *Acidovarax citrulli* patojeninin teşhisinde türe spesifik BIO-PZR yöntemlerini kullanmışlardır. Saklı (2018) sığır coronavirüsü ve sığır rotavirüsünün tanısında RT-PZR yöntemini kullanmıştır. PZR ve RT-PZR moleküler tanı teknikleri en fazla kullanılan yöntemler olarak öne çıkmaktadır. Bu moleküler teknikler spesifitesi ve hassasiyeti yüksek olan güvenilir tekniklerdir. Fakat zaman alıcı ve görece daha pahalı tekniklerdir. Bizim tanı kiti yöntemimiz,

PZR ve RT-PZR'ye göre çok daha pratik bir yöntemdir. Fakat doğruluk oranı ve hassasiyeti bu yöntemlere göre daha düşüktür. Tanı kitimizin bu yöntemlerden ayrılan bir diğer yönü olarak, hibridizasyona dayalı ve DNA'nın tümünü kalıp olarak alması gösterilebilir.

Bununla birlikte, son dönemlerde DNA bazlı biyosensörler kullanılarak yapılan tanı çalışmaları artış göstermektedir (Khater vd., 2017). Çoğu DNA biyosensör tekniği, DNA'nın elektroluminesans, floresan veya kalorimetrik olarak tespit edildiği hibridizasyon tekniklerine dayanmaktadır (Khater vd., 2017). Bu çalışmalarda DNA biyosensör reseptörü olarak kullanılmaktadır. Biyosensörler ve kemosensörler kullanılarak yapılan teşhis yöntemleri, geleneksel olarak yapılan PZR gibi yöntemlere iyi bir alternatif yöntem olarak görülmektedir (Khater vd., 2017). Bizim çalışmamızda uygulanan kit tekniği, kemosensör kullanılması, DNA zincirinin bir yüzeye sabitlenmesi gibi işlemler içermesinden dolayı bu tekniklere benzer bir tekniktir. Fakat bizim teşhis kitimiz, kemosensöre bağlanan DNA'nın tespiti şeklinde değil, komplementer ssDNA'ların bağlanması neticesinde ortamdan ayrılan kemosensörün tespiti ile çalışmaktadır. Bu yöntem kullanılarak yapılan bir teşhis bulunmamaktadır. Geliştirdiğimiz yeni yöntemin, DNA tanı yöntemlerine çeşitlilik kazandırması ve farklı yöntemlere fikir vermesi bakımından önemli olduğu düşünülmektedir. Tez sonunda literatüre yeni bir kit yöntemi kazandırılmıştır.

4.8. Geliştirilen Tanı Kitine Yapılabilecek Farklı Yaklaşımlar

Tezdeki veriler ışığında, geliştirilen teşhis kitinin doğru ve güvenilir sonuçlar vermesi, ileriki çalışmalar için umut vericidir. Yeni bir teknikle hızlı ve hassas bir

şekilde DNA tanısı yapabilen bu kitin, sonraki çalışmalarda daha da kapsamlı hale gelmesi mümkündür. Örneğin adenin bazı yerine üçlü hidrojen bağı yapan guanin ya da sitozin bazının kullanımı da bir opsiyondur.

Eklenen DNA ve kemosensörlerin konsantrasyonları, hibridizasyon sıcaklıkları, membranların kuruma süreleri gibi birçok değişken bulunmaktadır. Bu gibi faktörler, standartlara oturtularak teşhisin %100'e yakın bir doğrulukta çalışması için öncelikli yapılacaklar olarak değerlendirilebilir. Bunun yanı sıra şu anki haliyle prototipini oluşturduğumuz bakteriyel DNA tanı kitinin geliştirilerek ticari bir ürüne dönüştürülmesi mümkün gözükmemektedir. Tarım alanında, çiftçilerin patojenlerle mücadelede hızlı tespitle hızlı karar alabilmesini sağlayacaktır. Böylece hastalığın yayılmasının önüne geçilebilecektir.

Günümüzde her türlü patojenle mücadele, teşhis çok önemli bir yer tutmaktadır. DNA bazlı yapılan hızlı teşhisler ve tanı kitleri, hem hastalıkların ilerlemeden başlangıç evresinde tespit edilebilmesinde hem de yayılarak geniş çevrelere ulaşamamasında önemli bir koruyucudur. Yerli tanı kitlerinin sentezi, dışarıdan alınacak kitlerin de önüne geçecektir. Böylelikle bu alanda dışa bağımlılık ve ithalat azalacaktır. Tüm bu nedenler, DNA tanı kiti çalışmalarına önem verilmesi ve bu alanda daha fazla çalışma yapılması gerekliliğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

- Baysal, Ö., Mercati, F., İkten, H., Yıldız, R.Ç., Carimi, F., Aysan, Y. ve Teixeira da Silva, J.A. (2011) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: Tracking strains using their genetic differentiations by ISSR markers in Southern Turkey, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 75 (3): 113-119.
- Bergin, P.F., Doppelt, J.D., Hamilton, W.G., Mirick, G.E., Jones, A.E., Sritulanondha, S., Helm, J.M., Tuan, R.S. (2010) Detection of periprosthetic infections with use of ribosomal RNA-based polymerase chain reaction, *J Bone Joint Surg Am*, 92 (3): 654-663.
- Birmingham, P., Helm, J.M., Manner, P.A., Tuan, R.S. (2008) Simulated joint infection assessment by rapid detection of live bacteria with real-time reverse transcription Polymerase chain reaction, *J Bone Joint Surg Am*, 90 (3): 602-608.
- Chang, C.C., Wu, J.Y., Chien, C.W., Wu, W.S., Liu, H., Kang, C.C., Yu, L.J., Chang, T.C. (2003) A Fluorescent Carbazole Derivative: High Sensitivity for Quadruplex DNA Binding Study of the Fluorescent Carbazole Derivative with Human Telomeric G- Quadruplexes, *Anal Chem*, 75 (22): 6177-6183.
- Choe, H., Inaba, Y., Kobayashi, N., Miyamae, Y., Ike, H., Fujimaki, H., Tezuka, T., Hirata, Y., Saito, T. (2014) Evaluation of the time period for which real-time Polymerase chain reaction detects dead bacteria, *Pol J Microbiol*, 63 (4): 393-398.
- Choe, H., Deirmengian, C.A., Hickok, N.J., Morrison, T.N., Tuan, R.S. (2015) Molecular Diagnostics, *J Am Acad Orthop Surg*, 23 (0): 26-31.
- Coates, J. (2000) Interpretation of infrared spectra, a practical approach, 10815-10837, Meyers, R.A. (editör) *Encyclopedia of analytical chemistry*, John Wiley & Sons Ltd, Chichester, 14344s.
- Çankaya, G. (2011) *Yeni Bir Yaşayan Kontrollü Radikal Başlatma Sistemi: Çinko-Alkil Halojenür*, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Teknik Üniversitesi, İstanbul, 59s.
- Davis, M.J., Gillaspie Jr., A.G., Vidaver, A.K., Harris, R.W. (1984) *Clavibacter*: a new genus containing some phytopathogenic coryneform bacteria, including *Clavibacter xyli* subsp. *xyli* sp. nov., subsp. nov. and *Clavibacter xyli* subsp.

cynodontis subsp. nov., pathogens that cause ratoon stunting disease of sugarcane and Bermudagrass stunting disease, *Int. J. Syst*, 34: 107-117.

Eichenlaub, R. ve Gartemann, K.H. (2011) The *Clavibacter michiganensis* Subspecies: Molecular Investigation of Gram-Positive Bacterial Plant Pathogens, *Annual Review of Phytopathology*, 49: 445-464.

Elphinstone, J. ve O'Neill, T. (2010) Bacterial wilt and canker of tomato, *Tomato Factsheet*.

Falkow, S. (2004) Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity-a personal recollection 15 years later, *Nat Rev Microbiol*, 2: 67-72.

Fan, M., Dai, D., Huang, B. (2012) Fourier Transform Infrared Spectroscopy for Natural Fibres, 45-68, Salih, S.M. (editör) *Fourier transform-materials analysis*, InTech, Shanghai, 260s.

Fredericks, D.N. ve Relman, D.A. (1996) Sequence-based identification of microbial pathogens: a reconsideration of Koch's postulates, *Clin Microbiol Rev*, 9: 18-33.

Gartemann, K.H., Kirchner, O., Engemann, J., Grafen, I., Eichenlaub, R., Burger, A (2003) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*: first steps in the understanding of virulence of a Gram-positive phytopathogenic bacterium, *Journal of Biotechnology*, 106 (2-3): 179-191.

Gleason, M.L., Gitaitis, R.D. ve Ricker, M.D. (1993) Recent Progress in Understanding and Controlling Bacterial Cancer of Tomato in Eastern North America, *Plant Dis*, 77 (11): 1069- 1076.

Gluszynska, A., Juskowiak, B., Rubis, B. (2018) Binding Study of the Fluorescent Carbazole Derivative with Human Telomeric G-Quadruplexes, *Molecules*, 23 (12): 3154

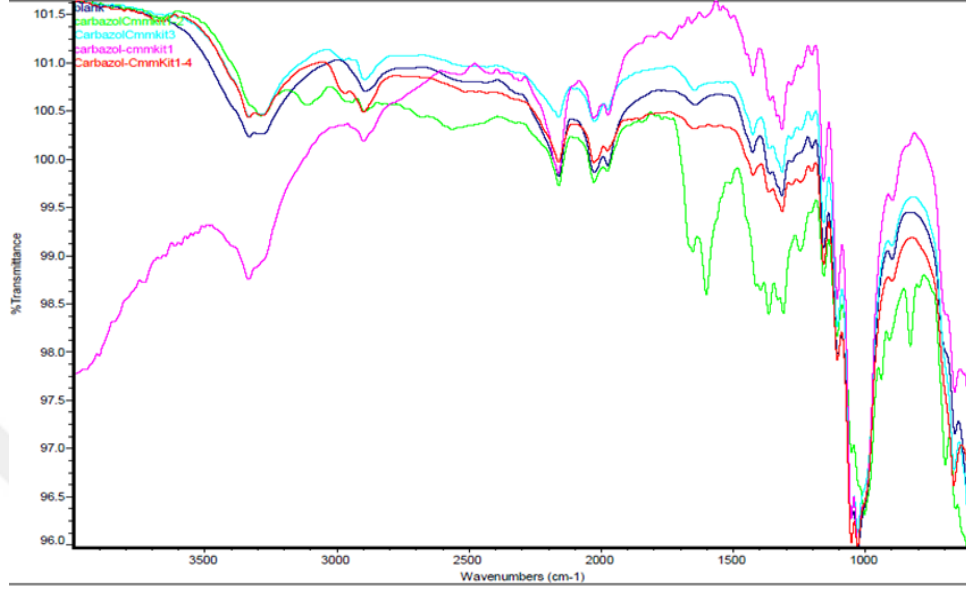
Gültekin A., (2018) *Sulu Ortamda Şeker Seviyesini Ölçmek İçin Kemosensör Sentezi*, Yüksek Lisans Tezi, Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi, Muğla, 72s.

Hahn, S., Mergenthaler, S., Zimmermann, B., Holzgreve, W. (2005) Nucleic acid based biosensors: The desires of the user, *Bioelectrochemistry*, 67: 151-154.

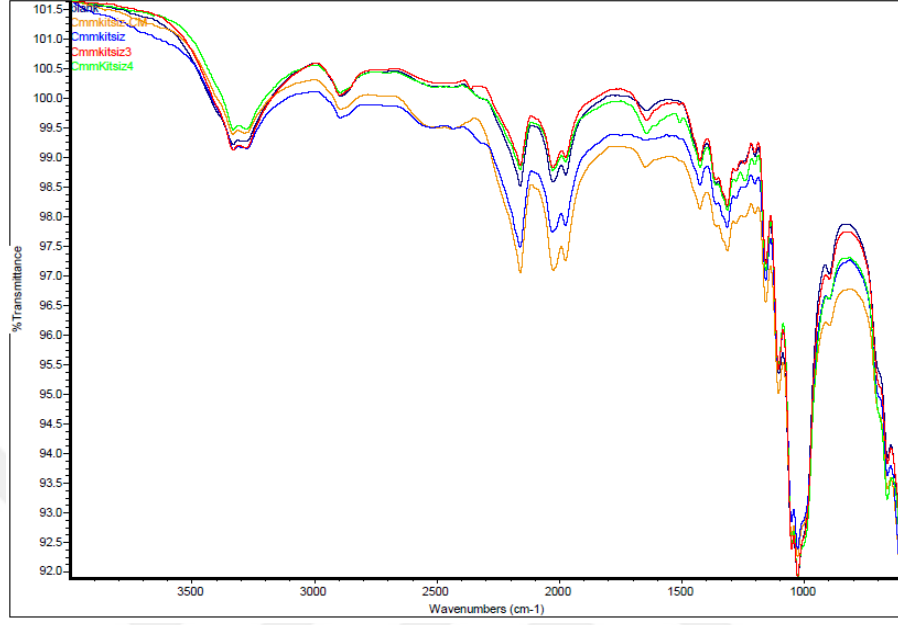
- Hansen, M.A. (2007) Bacterial canker and wilt of tomato, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Horuz, S. ve Aysan, Y. (2018) Kabakgil Tohumlarında Karpuz Bakteriyel Fide Yanıklığı ve Meyve Lekesi Hastalığı Etmeni *Acidovorax citrulli*'nin Varlığının Belirlenmesinde Kullanılabilecek Uygun Yöntem(ler)in Saptanması, *Tekirdağ Ziraat Fakültesi Dergisi*, 15 (03): 36-43.
- Hufnagel, T. ve Hetschko, M. (1982) *Process for the manufacture of a violet organic pigment, C.I. Pigment Violet 23*, US4345074A.
- Jaggi, N. ve Vij, D. (2006) Fourier transform infrared spectroscopy, 411-450, Vij, D. (editör), *Handbook of Applied Solid State Spectroscopy*, Springer, Boston, 741s.
- Khan, B., Minhaz, A., Ali, I., Nadeem, S., Yousuf, S., Ishaq, M., Shah, M.R. (2014) Fluorescent supramolecular tweezers for selective recognition of cephadrine, *Tetrahedron Letters*, 56 (4): 581-585.
- Khater, M., de la Escosura-Muniz, A. ve Merkoçi, A. (2017) Biosensors for plant pathogen detection, *Biosensors and Bioelectronics*, 93: 72-86.
- Kirk, R.E. ve Othmer, D.F. (2004) *Encyclopedia of Chemical Technology*, 5. Baskı, Wiley, New York, 864s.
- Meletzus, D., Bermpohl, A., Drier, J., Eichenlaub, R. (1993) Evidence for plasmid encoded virulence factors in the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* NCPPB382, *J Bacteriol*, 175 (7): 2131-2136.
- Minunni, M., Tombelli, S., Mariotti, E., Mascini, M., Mascini, M. (2001) Biosensors as new analytical tool for detection of Genetically Modified Organisms, *Fresenius J Anal Chem*, 369: 589 – 593.
- Muthukumar, A., Zitterkopf, N.L., Payne, D. (2008) Molecular Tools for the Detection and Characterization of Bacterial Infections: A Review, *Lab Medicine*, 39 (7): 430-436.
- Nakamura, H. ve Karube, I. (2003) Current research activity in biosensors, *Anal Bioanal Chem*, 377: 446-468.

- Nandiyanto, A.B.D., Oktiani, R., Ragadhita, R. (2019) How to Read and Interpret FTIR Spectroscopy of Organic Material, *Indonesian Journal of Science & Technology*, 4 (1): 97-118.
- Odenthal, K.J. ve Gooding, J.J. (2007) An introduction to electrochemical DNA biosensors, *Analyst*, 132: 603-610.
- Öktem, Y.E. (1985) Studies on Determination of Susceptibility of Tomato Varieties Against *Corynebacterium michiganense* pv. *michiganense*, *IV. Türkiye Fitopatoloji Kongresi*, 8-11 Ekim 1995, İzmir, 79-106.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, *Science*, 239 (4839): 487-491.
- Saklı Uyunmaz, G. (2017) *İshalli Buzağı Dışkılarında Sığır Coronavirüsü ve Sığır Rotavirüsünün Hızlı Tanı Kiti ve RT-PCR ile Araştırılması*, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi, Konya, 118s.
- Schmittgen, T.D. ve Livak, K.J. (2008) Analyzing real-time PCR by the comparative method, *Nat Protoc*, 3 (6): 1101-1108.
- Sherf, A.F. ve Macnab, A.A. (1986) *Vegetable diseases and their control*, 2. Baskı, John Wiley and Sons, New York, 728s.
- Silverstein, R.M., Bassler, G.C. ve Morrill, T.C. (1991) *Spectrometric Identification of Organic Compounds*, 5. Baskı, Wiley, New York, 432s.
- Smith, E.F. ve Jensen, H.L. (1982) Data sheets on Quarantine Organisms *Corynebacterium michiganense*, *Eppo Bulletin*, 12 (1): 13-18.
- Toprak, S., Can, K., Çalışkan, R., Şengöz, G., Habip, Z., Tokuç, E., Demirci, M., Taner, Z., Mamal Torun, M., Kocazeybek, B.S., Tokman, H.B. (2019) Menenjit tanısı almış hastalarda, bakteriyel menenjit etkenlerinin kültür ve PZR ile belirlenmesi, *Türk Mikrobiyoloji Cem Derg*, 49 (4): 191-196.
- Wang, J. (2002) Electrochemical nucleic acid biosensors, *Anal Chim Acta*, 469: 63-71.

Ek A. Karbazol- Cmm ssDNA Etkileşimlerinin Ham FTIR Görüntüsü



Ek B. BSP-3 – Cmm ssDNA’larının Etkileşimlerinin Ham FTIR Görüntüsü



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Ad Soyad : Burak Şener
Uyruk : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Lefkoşa - 13/02/1995
Medeni Hali : Bekar
Telefon : 0 541 264 1678
E-posta : senerburak2014.bs@gmail.com

Eğitim

Alınan Derece	Kurum / Bölüm	Giriş – Mezuniyet Tarihleri
Yüksek Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı	2017 - 2020
Lisans	Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi – Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü	2013 - 2017
Lise	İzmir Kız Lisesi	2009 - 2013

İş Tecrübesi

Yıl	Yer	Pozisyon / Görev
2015 - 2018	İzmir	Ofis Görevlisi

Yabancı Dil

İngilizce	Başlangıç	Orta	İleri
Yazma		X	
Konuşma		X	
Dinleme			X
Okuma			X

Alınan Sertifika / Belgeler

British Street Yabancı Dil Kursu – B2 Seviyesi

Muğla Sıtkı Koçman Üniversitesi Şeref Mezunu Belgesi

İlgi Alanları

Tiyatro, satranç, video oyunları

