

**TETRASİKLİN TAYİNİNE YÖNELİK APTAMER BAĞLI  
PEROKSİDAZ BENZERİ MİKROPARTİKÜLLERİN  
GELİŞTİRİLMESİ**

**DEVELOPMENT OF APTAMER-LINKED PEROXIDASE-  
LIKE MICROPARTICLES FOR TETRACYCLINE  
DETECTION**

**SENA KILIÇ**

**DOÇ. DR. EDA ÇELİK AKDUR**

**Tez Danışmanı**

**PROF. DR. S. ALİ TUNCEL**

**Eş Danışmanı**

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyomühendislik Anabilim Dalı için Öngördüğü

YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2021

## ÖZET

# TETRASİKLİN TAYİNİNE YÖNELİK APTAMER BAĞLI PEROKSİDAZ BENZERİ MİKROPARTİKÜLLERİN GELİŞTİRİLMESİ

**SENA KILIÇ**

**Yüksek Lisans, Biyomühendislik Anabilim Dalı**

**Tez Danışmanı: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR**

**Eş Danışman: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**

**Ocak 2021, 55 sayfa**

İnsan güvenliğini ve sağlığını korumak için gıdalarda ve sularda biriken antibiyotik kalıntılarının tayinine yönelik hassas ve seçici yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Kullanımı yaygın olan tetrasiklinin kalıntılarının tayini için kullanılan geleneksel yöntemlerin zaman alıcı olması, profesyonel çalışma becerisi gerektirmesi ve tayin için yüksek maliyetli cihazlar kullanılması gibi dezavantajları vardır. Sunulan tez kapsamında, sulu çözeltilerde tetrasiklin antibiyotiğinin tayini için peroksidaz benzeri aktivite gösteren manyetik mikropartikül ve aptamerden oluşan bir biyosensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmada kullanılan peroksidaz benzeri aktivite gösteren manyetik mikropartiküller, son yıllarda kullanılan tetrasiklinin tayin yöntemlerine alternatif oluşturmak için geliştirilmiştir.

Bu kapsamda, (3-glisidiloksipropil) trimetoksisilan (GLYMO)-bağlı manyetik silika ( $\text{MagSiO}_2$ ) mikropartiküller ve (3-aminopropil)trietoksisilan (APTES)-bağlı mikropartiküller sentezlenmiştir. GLYMO-bağlı  $\text{MagSiO}_2$  mikropartiküllerin sentezi için,  $\text{MagSiO}_2$  mikropartikülleri, tolüen ve GLYMO ile  $110^\circ\text{C}$ 'de reflux sisteminde 8 saat boyunca reaksiyona girmiştir. Mikropartiküller sırasıyla etanol, ddH<sub>2</sub>O ve sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ile yıkandıktan sonra etilendiamin ve  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ile  $60^\circ\text{C}$ 'de t=24 st boyunca reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyonun ardından mikropartiküller sırasıyla fosfat tampon çözeltisi (PB) ve ddH<sub>2</sub>O ile yıkandıktan sonra gravimetrik analiz ile partikülün yoğunluğu belirlenmiş ve mikropartiküller tekrar PB ile yıkanmıştır. APTES-bağlı  $\text{MagSiO}_2$  mikropartiküllerin sentezi için APTES,  $\text{MagSiO}_2$  mikropartikülleri, tolüen ve tris-etilamin ile de benzer bir sentez yöntemi izlenmiştir. Mikropartiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesini ölçmek için o-fenilendiamin (OPD) kullanılmıştır. GLYMO-bağlı  $\text{MagSiO}_2$  mikropartiküllerin, APTES-bağlı  $\text{MagSiO}_2$  mikropartiküllerden daha fazla absorbands değeri verdiği görülmüştür.

Gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile GLYMO-bağlı  $\text{MagSiO}_2$  mikropartiküller 18-24 saat süre aralığında, oda sıcaklığında ve karanlıkta reaksiyona girmiş, sonrasında partiküller PB ile yıkanmıştır. Aptamerler ise 5 dakika boyunca  $95^\circ\text{C}$ 'de denature edildikten sonra 10 dk buzun üzerinde bekletilmiş; aptamer çözeltisi ve mikropartiküller oda sıcaklığında t=2 st boyunca reaksiyona bırakılmıştır. Aptamer tutuklanmış mikropartiküller, PB ile yıkandıktan sonra tetrasiklin çözeltisi (100-200-500-1000-2000 ng/ $\mu\text{l}$ ) ile karanlıkta t=30 dk boyunca reaksiyona girmiştir. Partikül-aptamer-tetrasiklin PB ile yıkandıktan sonra OPD ile oda sıcaklığında ve karanlıkta, t=45-75 dk zaman aralığında reaksiyona bırakılmıştır. Farklı iyon ve derişimlere sahip tampon çözeltiler kullanılarak değişen aptamerin katlanma şeklinin ve aptamer yoğunluğunun tetrasiklin tayinine olan etkisi de incelenmiştir. OPD çözeltisi hazırlanırken pH, ortam tampon çözeltisi, çözeltinin derişimi ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarının optimizasyonu yapılmıştır. Plaka okuyucuda OD=450 nm'de yapılan ölçümler sonucunda pH=7 olan fosfat sitrat tampon çözeltisi ile hazırlanmış 10 mM OPD solüsyonu kullanıldığında en yüksek  $\Delta A$  değerine ulaşılmış ve t=60 dk'nın optimum reaksiyon süresi olduğu

sonucuna varılmıştır. OPD'nin reaksiyonunu durdurmak için 3 M HCl kullanılmış, OD=492 nm'de yapılan ölçümler sonucunda HCl miktarı arttıkça absorbanans değerinin arttığı, ancak  $\Delta A$  değerinin azaldığı tespit edilmiştir.

Yapılan tüm optimizasyon çalışmaları neticesinde tetrasiklin derişimi taranmış, alt tespit limiti LOD=100 ng/ $\mu$ l olarak bulunmuştur. Sütte izin verilen tetrasiklinin maksimum kalıntı limitleri ise Avrupa Birliği'nde 200 ng/ $\mu$ l'dir. Sonuç olarak bu çalışmada, tetrasiklini tayinine yönelik kullanımı kolay, düşük maliyetli, enzim benzeri özellik gösteren mikropartiküller ile aptamer-bağlı bir biyosensör geliştirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** Aptamer, Tetrasiklin, Peroksidaz Benzeri Aktivite, Manyetik Partikül, o-Fenilendiamin

## **ABSTRACT**

### **DEVELOPMENT OF APTAMER-LINKED PEROXIDASE-LIKE MICROPARTICLES FOR TETRACYCLINE DETECTION**

**Sena KILIÇ**

**Master of Science, Department of Bioengineering**

**Supervisor: Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR**

**Co- Supervisor: Prof. Dr. S. Ali TUNCEL**

**January 2021, 55 pages**

Sensitive and selective methods are needed for the determination of antibiotic residues accumulated in food and water sources to protect human safety and health. Traditional methods used for determination of tetracycline residues, which are widely used, have disadvantages such as being time consuming, requiring professional working skills, and using expensive devices for determination. A biosensor including aptamer and a magnetic microparticle with peroxidase-like activity was developed for tetracycline detection in aqueous solutions. In this study, magnetic microparticle with peroxidase-like activity was developed as an alternative to tetracycline determination methods currently used.

Within this scope, (3-glycidyloxypropyl)trimethoxysilane (GLYMO)-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles and (3-aminopropyl)triethoxysilane (APTES)-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles were synthesized. For the synthesis of GLYMO-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles, magnetic silica microparticles MagSiO<sub>2</sub>, toluene and

GLYMO were reacted under reflux at 110°C for t=8 hours. Microparticles were washed with ethanol, ddH<sub>2</sub>O and sodium carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), respectively. After that, microparticles were reacted with ethylenediamine and Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> at 60°C for t=24 h, washed with phosphate buffer (PB) and ddH<sub>2</sub>O. After determination of particle density by gravimetric analysis, microparticles were washed with PB again. For the synthesis of APTES-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles, (APTES), magnetic silica microparticles (MagSiO<sub>2</sub>), toluene and tris-ethylamine were used in a similar synthesis protocol. O-phenylenediamine (OPD) was used as substrate in the peroxidase-like activity measurements. Measurements showed that the absorbance value of GLYMO-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles was greater than APTES-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles.

GLYMO-linked MagSiO<sub>2</sub> microparticles and glutaraldehyde crosslinker were reacted in the dark, at room temperature for 18-24 hours. After the reaction, microparticles were washed with PB. Aptamers were denatured at 95°C for t=5 min, followed by a cooling step on ice for t=10 min. After that, aptamers and microparticles were reacted at room temperature for t=2 h. After the mixture of aptamer and microparticles were washed with PB, the mixture was reacted with tetracycline solutions (100-200-500-1000-2000 ng/μl) at room temperature for t=30 min and than washed with PB. Thereafter, the mixture was reacted in the dark with OPD at room temperature for t=45-75 min. The effect of aptamer concentrations and aptamer folding within buffer solutions having different ions and ion concentrations on tetracycline determination was also studied. Amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution, medium buffer solution and it's pH value were optimized for the OPD solution. Absorbance values were measured at 450 nm in a plate reader, and 10 mM OPD solution prepared with phosphate citrate buffer solution with pH=7 had greater ΔA than other OPD solutions. The optimum reaction time was obtained for t=60 min. To stop the reaction of OPD, 3 M HCL was used. According to absorbance values measured at 492 nm, as the amount of HCl was increased, the absorbance values increased, but ΔA values decreased.

After all the optimizations, tetracycline concentrations were scanned and a limit of detection LOD=100 ng/μl was obtained, while the maximum residue limits of tetracycline allowed in milk are 200 ng/μl in the European Union. Overall, an easy, inexpensive, aptamer-linked, enzyme-like magnetic particle based biosensor has been developed towards tetracycline detection.

**Keywords:** Aptamer, Tetracycline, Peroxidase-Like Activity, Magnetic Particle, o-Phenylenediamine

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tez sürecinde bana yol gösteren, destek olan kıymetli hocam Sayın Doç. Dr. Eda ÇELİK AKDUR'a,

Engin bilgi birikiminden faydalanma olanağı bulduğum eş danışmanım Sayın Prof. Dr. Ali TUNCEL'e,

Tez çalışmam boyunca deneylerimde yardımlarını esirgemeyen Sayın Dr. Öğr. Üyesi F.Çiğdem KİP'e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve tez boyunca her türlü desteği gördüğüm değerli arkadaşlarım Arş.Gör.İlkay Koçer KULOĞLU'na, Arş.Gör.Murat AKDOĞAN'na, Dilek ŞAHİNBAŞ'a, Batuhan DOĞAN'a, Selen CİLASUN'a ve Emine ALTUN'a,

Yüksek lisans eğitim hayatımın büyük bir bölümünde bana burs imkanı sağlayan Sayın Nilgün SAĞYAŞAR'a,

Hiçbir konuda desteğini esirgemeyen, neşesi ile hayatıma enerji veren, yardıma ihtiyaç duyan herkesin "Gülnur Ablası" olan, aramızdan erken ayrılan ailemin iyilik meleği Gülnur KAN'a,

Her zaman genç bilim kadınlarının destekçisi olan, gençlerin fikirlerini dinleyen, önem veren, yol gösteren, abim Sayın Doç. Dr. Özgür KAN'a,

Eğitim hayatıma yön veren, akıl hocam, kendime örnek aldığım, ailemin yokluğunu hissettirmeyen, canım dayım Sayın Prof. Dr. Ali GÜRSEL'e,

Hayatım boyunca yanımda olup beni bugünlere getiren, eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, çocukları olmaktan gurur ve mutluluk duyduğum annem Bedriye KILIÇ'a, babam Kemal KILIÇ'a,

En içten dileklerle teşekkürlerimi sunarım.



# İÇİNDEKİLER

ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	iv
TEŞEKKÜR.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	xi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER .....	3
2.1. Antibiyotikler .....	3
2.2. Tetrasiklinler.....	4
2.2.1. Tetrasiklin Kalıntısının Limitleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri.....	5
2.2.2. Tetrasiklin Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Metotlar .....	6
2.3. Aptamerler .....	8
2.3.1 SELEX .....	9
2.3.2. Aptamerlerle Antikorların Karşılaştırılması .....	11
2.3.3. Aptamer Modifikasyonları .....	12
2.4. Aptamerlerin Uygulaması.....	13
2.4.1. Tanı ve Teşhis Aracı Olarak Aptamerler .....	14
2.4.2 Terapötik Aptamerler .....	14
2.4.3. Aptamer Bazlı Biyosensörler.....	15
2.5. Aktif Yüzeylerde Modifiye Aptamerlerin İmmobilizasyonu .....	17
2.6. Manyetik Partiküller.....	18
2.7. Peroksidaz Benzeri Aktivite .....	19
3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR .....	21
3.1. Kimyasallar .....	21

3.2. Deneysel Kısım.....	21
3.2.1. Mikropartiküllerinin Sentezi .....	22
3.2.1.1. GLYMO-Bağlı Mag-SiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Sentezi.....	22
3.2.1.2. APTES-Bağlı Mag-SiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Sentezi.....	23
3.2.2. Mikropartikül Seçimi.....	23
3.2.3. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin ve Aptamer Bağlı GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Karakterizasyonu .....	24
3.2.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü .....	24
3.2.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi.....	24
3.2.4 Gluteraldehit Çapraz Bağlayıcı Çözeltisi ile GLYMO-bağlı Mag-SiO <sub>2</sub> ..	24
3.2.5. Tetrasiklin Aptamerlerinin Mikropartiküller ile Etkileşimi.....	25
3.2.6. Aptamer-Mikropartikül Karışımının Tetrasiklin ile Etkileşimi.....	25
3.2.7. Mikropartiküllerin Peroksidaz Benzeri Aktivite Özelliği Kullanılarak Tapon Ortamında Tetrasiklin Tayini .....	26
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	28
4.1. GLYMO- ve APTES-Bağlı MagSiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Peroksidaz Benzeri Aktivite Ölçümü ve Partikül Seçimi .....	28
4.2. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> Mikropartikülleri ile Tetrasiklin Aptamerinin Bağlanması .....	29
4.3. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin ve Aptamer Bağlı GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Karakterizasyonu .....	30
4.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü .....	30
4.3.2. Aptamer Moleküllerinin, GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> @Aptamer Mikropartiküllerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi.....	32
4.4. Aptamer Bağlanan Mikropartikül ile Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayini .....	34
4.5. Aptamer Bağlanan Mikropartiküllerin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayininde Reaksiyon Tampon Çözeltisinin Belirlenmesi .....	35
4.6. Değişen Ortam Tuz İyon Değerlerinin Tetrasiklin Aptamerinin Katlanmasına Etkisi .....	36
4.7. Aptamer Derişiminin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayinine Etkisi.....	38

4.8. Değişen Substrat Derişimi ve Ortam pH Değerleri için Aptamer Bağlı Mikropartiküllerin Peroksidaz Benzeri Aktivite Özelliği ile Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayini .....	39
4.9. OPD Reaksiyon Süresinin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayinine Etkisi.....	41
4.10. HCl Miktarının ve Reaksiyon Süresinin $\Delta A$ Değerine Etkisi .....	41
4.11. Tampon Ortamında Farklı Derişimlerde Tetrasiklin Tayini .....	43
5. SONUÇLAR .....	45
KAYNAKLAR.....	47
ÖZGEÇMİŞ .....	56

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. Farklı hayvan türlerinin dokularında biriken maksimum tetrasiklin kalıntı limitleri [19].....	6
Çizelge 2.2. Tetrasiklin tayini için kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları [26].....	7
Çizelge 2.3. Aptamer ve antikoru karşılaştırılması [36] .....	12
Çizelge 2.4. Aptamerler manyetik partiküller, altın kaplı nanapartiküller (AuNPs), kuantum noktaları (QD'ler), karbon noktaları (CD'ler) ve europium iyonlarının karşılaştırılması [20, 70].....	19
Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan, amin ile modifiye edilmiş aptamer dizini [94] .....	21
Çizelge 3.2. OPD çözeltisi hazırlanırken kullanılan OPD miktarı (mg/ml), tampon çözelti çeşidi, tampon çözeltinin pH değeri ve H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı (µl/ml) .	27
Çizelge 4.1. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> @Aptamer mikropartiküllerinin yüzey ve gözenek özellikleri .....	31
Çizelge 5.1. Aptasensörlerin tayin edebildiği tetrasiklin derişiminin alt limit değerlerinin karşılaştırılması .....	46

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Tetrasiklinin kimyasal yapısı [18] .....	5
Şekil 2.2. A) Aptamerin ikincil yapısı, B) Aptamerin kristal yapısı [34].....	8
Şekil 2.3. SELEX (Üssel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi) yöntemi.....	10
Şekil 2.4. Şeker halkalarının 2' ucunda bulunan H ile 2'-floro (2'-F), 2'-amino (2'-NH <sub>2</sub> ) ya da 2p-O-metil (2p-OMe) gruplarının yer değiştirmesi sonucu meydana gelen aptamer modifikasyonları [47].....	13
Şekil 3.1. GLYMO-Bağlı Mag-SiO <sub>2</sub> mikropartikül sentezi .....	22
Şekil 4.1. GLYMO- ve APTES-bağlı MagSiO <sub>2</sub> mikropartiküllerinin peroksidaz benzeri aktivitelerinin OD=492 nm'deki absorbands değerleri. Mikropartikül miktarı: 5 mg, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi, pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl. ....	29
Şekil 4.2. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> mikropartikül bağı -NH <sub>2</sub> -modifiye tetrasiklin aptameri tabanlı aptasensörün sentez protokolü.....	30
Şekil 4.3. Azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile elde edilen GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> @Aptamer mikropartilüllerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi .....	31
Şekil 4.4. Aptamer moleküllerinin FTIR spektrumları .....	33
Şekil 4.5. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> mikropartiküllerinin FTIR spektrumları .....	33
Şekil 4.6. GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> @Aptamer mikropartiküllerinin FTIR spektrumları	34
Şekil 4.7. Mikropartikül bağı aptamer tabanlı aptasensör ile sulu çözelti içerisindeki tetrasiklin tayinine yönelik OD=492nm'deki absorbands değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M f fosfat tampon çözeltisi pH 7,0, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl. ....	35

- Şekil 4.8. Farklı tampon çözeltilere sahip reaksiyon ortamlarında tetrasiklin tayinine yönelik OD=492 nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l. .... 36
- Şekil 4.9. TET aptamerlerinin katlanma şekilleri..... 37
- Şekil 4.10. A) Tez çalışmasında kullanılan TET-aptamer dizinin mfold programı yardımıyla 100 mM NaCl tuzlu çözeltisi içerisindeki katlanma şekli; B) Tez çalışmasında kullanılan TET-aptamer dizinin mfold programı yardımıyla 100 mM NaCl + 4 mM MgCl<sub>2</sub> tuzlu çözeltisi içerisindeki katlama şekli ..... 37
- Şekil 4.11. Farklı iyonlara ve iyon derişimlerine sahip çözeltilerin aptamerin katlanmasına etkisinin tayinine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0 HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l..... 38
- Şekil 4.12. Değişen aptamer derişiminin tetrasiklin tayinine etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0 HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l. .... 39
- Şekil 4.13. Farklı OPD tampon çözeltisine, derişimine ve pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında tetrasiklin tayinine yönelik OD=450nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, Fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanan OPD çözeltisi OPD olarak adlandırılmıştır. Fosfat sitrat tampon çözeltisi ile hazırlanan OPD çözeltisi OPDc olarak adlandırılmıştır..... 40
- Şekil 4.14. Değişen OPD reaksiyon süresinin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik OD=450 nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin

derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltilisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltilisi pH 7,0..... 41

Şekil 4.15. Değişen HCl hacminin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltilisi: 0, 1 M fosfat sitrat tampon çözeltilisi pH 7,0..... 42

Şekil 4.16. Değişen HCl reaksiyon süresinin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri, mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltilisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltilisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl. 43

Şekil 4.17. Değişen tetrasiklin derişimlerinde OD=492nm'deki Δabsorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 10 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltilisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltilisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl. .... 44

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

### Simgeler

kg	Kilogram
L	Litre
$\mu$	Mikro
$\mu\text{g}$	Mikrogram
$\mu\text{L}$	Mikrolitre
$\mu\text{M}$	Mikromolar
mL	Mililitre
mg	Miligram
mM	Milimolar
M	Molar
nM	Nanomolar
pmol	Pikomol
pM	Pikomolar



## Kısaltmalar

AuPN	Altın Nanopartikül
APTES	(3-Aminopropil) Trietoksisilan
BET	Brunauer-Emmett-Teller
CE	Kılcal Elektroforez
CE-MS	Kılcal Elektroforez-Kütle Spektrometresi
CD	Karbon Noktaları
CL	Kemilüminesans
ddH <sub>2</sub> O	Distile Su
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
EDA	Etilendiamin
ELISA	Enzime Bağlı İmmünosorbent Deneyi
ELAA	Enzime Bağlı Aptamer Testi
EtHO	Etanol
FRET	Floresan Rezonans Enerji Transferi
FTIR	Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi
GA	Glutaraldehid
GLYMO	(3- Glisidiloksipropil) trimetoksisilan
HCl	Hidroklorik Asit
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Hidrojen Peroksit
HRP	Yaban Turpu Peroksidaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LC-MS	Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi
MagSiO <sub>2</sub>	Manyetik Silika Mikropartikül
MP	Manyetik Partikül
MRL	Maksimum Kalıntı Limiti
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Sodyum Karbonat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Sodyum Dibazik

NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Sodyum Monobazik
OPD	o-Fenilendiamin
PB	Fosfat Tampon Çözelti
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribo Nükleik Asit
SARS	Şiddetli Akut Solunum Sendromu
SELEX	Üstel Zenginleştirme ile Ligantların Sistemik Evrimi
SERS	Yüzeyi Arttırılmış Raman Spektroskopisi
SPR	Yüzey Plazmon Rezonans
TET	Tetrasiklin
tRNA	Taşıyıcı Ribo Nükleik Asit
QD	Kuantum Noktası

# 1. GİRİŞ

Antibiyotikler, mikroorganizmaları öldürmek veya engellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır. Antibiyotiklerin yanlış kullanımı insanlarda çeşitli yan etkilere ve antimikrobiyal dirençli mikroorganizmaların ortaya çıkmasına neden olmuştur. Antibiyotiklerin tıp alanında insan ve hayvan sağlığını korumak için kullanılması, antibiyotiklerin çevrede istenmeyen birikimiyle sonuçlanmaktadır [1].

*Streptomyces Rimous* adı verilen bir bakteri tarafından üretilen tetrasiklin, protein sentezini inhibe eden, geniş spektrumlu bir antibiyotik çeşididir [2]. Tetrasiklin antibiyotikleri insanlar ve hayvanlardaki enfeksiyonların tedavisinde, hayvan yemlerinde büyüme arttırıcı olarak ve tarımsal faaliyetlerde kullanılmaktadır. İlaç tedavisinden sonra, tetrasiklin antibiyotiklerinin %70'inden fazlası vücuttan atılır; insan ve hayvanlardan idrar ve dışkı yoluyla aktif olarak çevreye salınır. Tetrasiklinler, hidrofilik yapısı nedeniyle su ortamında (atık su, yüzey suyu, içme suyu, yer altı suyu, çamur, toprak ve tortular) uzun süre kalabilmektedir. Hayvanların tetrasiklin katkılı yemlerle beslenmesi, hayvansal gıdalarda tetrasiklin birikmesine yol açmaktadır. Tetrasiklin kalıntısı hayvansal gıdalarla beslenen insanların sağlığını tehdit etmektedir. Tetrasiklin, besin zinciri ile insan vücudunda birikebilir ve düşük dozlarda olsa bile, organlarda toksisiteye veya işitme kaybına neden olabilmektedir [3].

İnsan güvenliğini ve sağlığını korumak için gıdalarda, serum ve sularda biriken tetrasiklin kalıntılarını tayin etmek için hassas ve seçici yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. Tetrasiklin kalıntılarının tayini için kullanılan geleneksel yöntemlerin zaman alıcı olması, profesyonel çalışma becerisi gerektirmesi ve tayin için pahalı cihazlar kullanılması gibi dezavantajları vardır. Tetrasiklin tayinine yönelik geliştirilen yeni yöntemlerin ise karmaşık numune ön işlem süreci ve yüksek eğitimli teknik personel gereksinimi gibi dezavantajları bulunmaktadır [4, 5].

Aptamerler, 1990 yılında spesifik hedeflere yüksek etkinlik ve özgünlükte bağlanabilen DNA veya RNA'nın tek iplikli oligonükleotidleri olarak, "Üstel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi" (SELEX) yöntemi ile büyük bir rastgele dizilim havuzundan seçilerek üretilmiştir. Aptamerler, antikörlara veya diğer biyolojik tanıma elemanlarına kıyasla bazı üstün özelliklerinden dolayı, alternatif bir tanıyıcı ajan olarak son zamanlarda önem kazanmaktadır. Aptamerler, çeşitli partiküller ile immobilize edilerek hem tayin hem de tedavi için kullanılmaktadır [6].

Manyetik partiküller, biyomolekül ile kolayca kaplanabilir ve analitik amaçlar için kullanılabilirler; ayrıca peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olabilmektedirler.

Tez kapsamında, peroksidaz gibi aktivite gösteren manyetik partiküller sentezlenip, -NH<sub>2</sub> ucu ile modifiye edilmiş, tetrasikline özgü olan aptamer ile etkileştirilip; sıvı ortamda bulunan tetrasiklin miktarını ölçebilecek bir aptasensörün geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu sayede, süt gibi numunelerde, yüksek hassasiyet ve düşük maliyetli, operasyonel basitliği olan bir biyosensörün kullanımı mümkün olabilecektir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Antibiyotikler

'Antibiyotik' terimi ilk olarak 1940'larda ciddi bakteriyel enfeksiyonları tedavi etmek amacıyla Pasteur tarafından kullanılmıştır. Antibiyotiklerin hücre duvarını yok etmesi, sitoplazmik zarın geçirgenliğini değiştirmesi, DNA veya RNA sentezini engellemesi ve protein sentezini durdurması gibi etki mekanizmaları sayesinde mikroorganizmaları öldürmek veya engellemek için yaygın olarak kullanılmaktadır [7].

Antibiyotiklerin kullanımı hem tıp alanında hem de veterinerlik alanında günden güne artmaktadır. Antibiyotikler hayvancılıkta büyüme takviyesi olarak balık çiftliklerinde yem katkı maddesi olarak ve bakteriler tarafından ürünlerin zarar görmesini önlemek amacıyla hayvancılık, sanayi ve modern tarım alanlarında yaygın şekilde kullanılmaktadır [8].

Hayvanlarda, hastalıkları önlemek veya tedavi amaçlı kullanılan antibiyotikler, insan vücuduna doğrudan veya dolaylı olarak farklı şekillerde girebilirler. Antibiyotiklerin %60'a yakını hayvancılık ve tarım alanlarında kullanılmaktadır. Bu alanlardaki üreticilerin daha yüksek verim elde etmek için kullandıkları antibiyotiklerin kontrolsüz kullanımı insan sağlığını tehdit etmektedir [9].

Antibiyotikler, hayvanlarda başta böbrek ve karaciğer olmak üzere organlarda birikerek, süt, yumurta ve bal gibi hayvansal gıdalarda kalıntı oluşturmaktadırlar [10]. İlaç kalıntısı içeren gıdaları tüketen insanlarda, alerji, zehirlenme, üreme bozuklukları, bağırsak florasında değişiklikler ile dirençli bakterilerin gelişimi gözlenebilmektedir [11]. Antibiyotik kalıntılarının en önemli olumsuz etkisi, direncin mobil özelliklerinden dolayı insanlara transfer olan antibiyotiğe dirençli bakterilerdir.

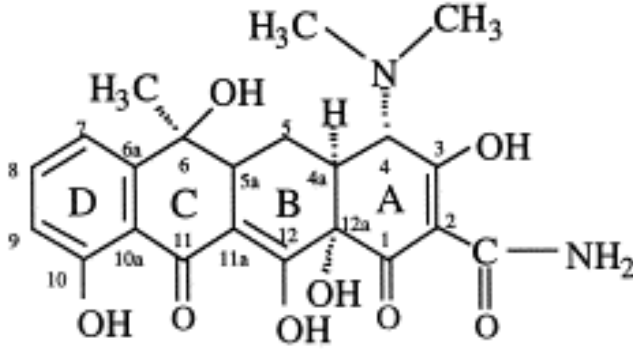
## 2.2. Tetrasiklinler

1940'larda keşfedilen tetrasiklinler, aminoasil-tRNA'nın ribozomal alıcı bölgesine bağlanmasını önleyerek protein sentezini inhibe eden bir antibiyotik ailesidir. Tetrasiklinler, çok çeşitli gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere, atipik organizmalara ve protozoan parazitlere karşı aktivite sergileyen geniş spektrumlu ajanlardır. Bu ajanların elverişli antimikrobiyal özellikleri, insan ve hayvan enfeksiyonlarının tedavisinde geniş kullanımlarına yol açmıştır [12].

Tetrasiklin (TET), *Streptomyces Rimous* adı verilen bir bakteri tarafından üretilen bir antibiyotiktir [2, 10] (Şekil 2.1). İlk tetrasiklin türevi antibiyotik, *streptomyces aurefaciens*'ten izole edilen klortetrasiklidir [13].

Tetrasiklin, bakteri ribozomlarının 30S alt ünitelerine bağlanarak tRNA'nın ribozoma bağlanmasını önlemekte, bu sayede protein sentezini önleyerek hücre çoğalmasını engellemektedir [14]. Tetrasiklin, insan ve hayvan enfeksiyonlarının profilaksisi ve tedavisinde, ayrıca hayvan yeminde subtöröpötik seviyelerde yaygın olarak büyüme arttırıcı olarak kullanılmıştır [15]. Tetrasiklin, kloroform benzeri organik çözücülerde çözünmezken; asit, baz ve alkol içeren çözücülerde çözünebilmektedir [16].

Tetrasiklinler, diğer antibiyotiklere kıyasla, geniş aktivite spektrumları ve düşük maliyetlerinden dolayı sıklıkla kullanılmaktadır. Tetrasiklin, U.V.'de okunduğunda 270 ve 360 nm' de güçlü absorpsiyon göstermektedir. Halen 20'nin üzerinde tetrasiklin türevi mevcuttur; ancak, tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin ve doksisisiklin en çok bilinen tetrasiklin çeşitleridir [17].



Şekil 2. 1. Tetrasiklinin kimyasal yapısı [18]

### 2.2.1. Tetrasiklin Kalıntısının Limitleri ve İnsan Sağlığı Üzerine Etkileri

Hayvansal gıdalarda bulunan antibiyotik kalıntılarının, insan sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle hayvansal dokularda analizlerinin yapılması son yıllarda önem kazanmaktadır. Tetrasiklinin, tarım ve hayvancılıktaki geniş kullanımı nedeniyle, gıda ve gıda maddelerinde bu antibiyotiğin doğru kullanımının ve dozajının ayarlanması önemi büyüktür. Bu nedenle gıda numunelerindeki muhtemel kalıntıların (Çizelge 2.1) değerlendirilmesi için antibiyotik analizinde ilerleme kaydedilmelidir.

Son yıllarda hem Amerika Birleşik Devletleri, hem Çin, hem de Avrupa Birliği kurumları tarafından tetrasiklinin kullanımına yönelik ve gıda ile ilgili uygulamalarını düzenleyen yasaklar ve kısıtlamalar getirilmiştir [19].

AB içinde, gıda maddelerinde yetkili veteriner ilaçlarının maksimum kalıntı limitleri (MRL) Konsey Tüzüğünde belirtilmiştir. Sütte TET'in maksimum kalıntı limitlerini (MRL) Avrupa Birliği 225 nM (200 ng/ml) ve Çin 100 µg/kg olarak belirlemiştir [20].

Çizelge 2.1. Farklı hayvan türlerinin dokularında biriken maksimum tetrasiklin kalıntı limitleri [19]

<b>Türler</b>	<b>Doku</b>	<b>Maksimum Kalıntı Limiti (µg/kg)</b>
<b>Sığır</b>	Süt (µg/L)	100
<b>Kümes Hayvanları</b>	Kas	200
<b>Koyun</b>	Karaciğer	600
<b>Domuz</b>	Böbrek	1200

Tetrasiklin kalıntısının insan vücudunda fazla miktarda birikmesinin insan sağlığı üzerinde olumsuz etkileri vardır. Bunlar;

- Gastrointestinal yan etkiler
- Dişlerde ve kemiklerde renk bozukluğu
- Karaciğer üzerinde toksik etki
- Böbreklerle ilgili yan etkiler
- Alerjik belirtiler
- Hematolojik bozukluklar
- Fototoksisite

### **2.2.2. Tetrasiklin Kalıntılarının Tespitinde Kullanılan Metotlar**

İnsan güvenliğini ve sağlığını korumak için gıda, serum ve sudaki tetrasiklinin izlenmesi için hassas ve seçici tespit yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (LC-MS) [21], yüksek performanslı sıvı



kromatografi (HPLC) [22] ve ince tabaka kromatografi (TLC) [23] dahil, kromatografik yöntemler TET kalıntılarının tayini için kullanılan geleneksel yöntemlerdendir. Ancak kromatografik yöntemlerin zaman alıcı olması, profesyonel çalışma becerisi gerektirmesi ve tayin için pahalı cihazlar kullanılması gibi dezavantajları vardır. Tetrasiklinin yüksek hassasiyette tespiti için kromatografik yöntemler hariç, kılcal elektroforez (CE) [24], kılcal elektroforez kütle spektrometresi (CE-MS) [25] ve ayrıca enzimlere bağlı immünosorbent deneyi (ELISA) [25] gibi yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemlerin de karmaşık numune ön işlem süreci ve yüksek eğitilmiş teknik personel gereksinimi gibi bazı dezavantajları (Çizelge 2.2) bulunmaktadır [4].

Çizelge 2.2. Tetrasiklin tayini için kullanılan yöntemlerin avantajları ve dezavantajları [26]

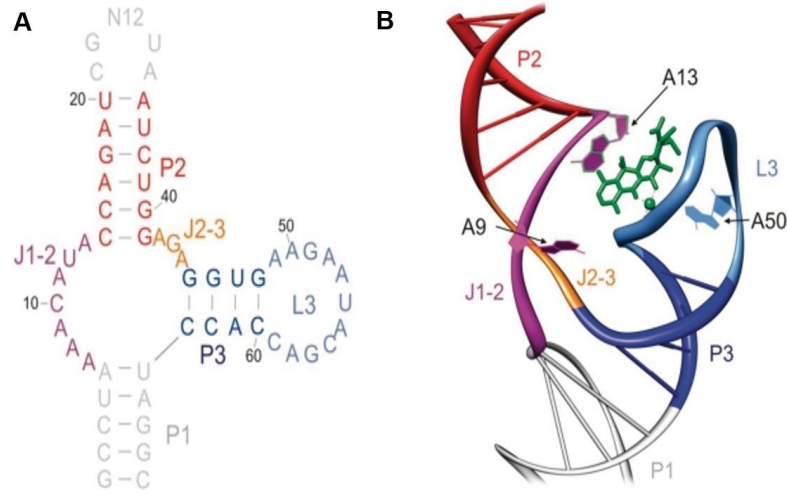
Yöntem	Avantajlar	Dezavantajlar
<b>Kolorimetrik</b>	Görsel algılama, Hızlı algılama, Basit cihaz	Düşük hassasiyet, Dış ortamdaki kolay etkilenme
<b>Floresan</b>	Yüksek verimlilik, Kolay kullanım	Fluoroforun kısa kullanım ömrü
<b>SERS</b>	Basit. Hızlı, Yüksek Hassasiyet	Yüzeylerin stabilitesi zayıf
<b>CL</b>	Düşük maliyet, Kolay kullanım	Gerçek zamanlı algılama yok
<b>SPR</b>	Gerçek zamanlı algılama	Cihaz maliyeti yüksek

Tetrasiklin tayini için basit, kullanışlı, sağlam ve hızlı ancak aynı zamanda hassas ve seçici algılama yöntemleri de talep edilmektedir. Bu kapsamda aptamer, enzim, moleküler-baskılı polimerler, küçük moleküller ve makromolekül gibi

tanıma elemanlarını kullanan optik tabanlı sensörler geliştirilmiştir [4]. Tetrasiklin sensörlerini oluşturmak için altın nanopartiküller [27], grafen [28], manyetik partiküller [29], kuantum noktaları [30] ve karbon noktaları [31] gibi nanomalzemelerin ve tanıma elemanlarının entegrasyonundan da yararlanılmıştır.

### 2.3. Aptamerler

Aptamerler spesifik hedeflere (küçük organik moleküllerden proteinlere kadar çeşitli hedeflere) yüksek etkinlik ve yüksek özgünlükte bağlanabilme potansiyeline sahip tek zincirli oligonükleotidlerdir [32]. Aptamer iki farklı sözcüğün birleşmesinden meydana gelmektedir: Apt- “uyumlu olan” ve mer- “birim” anlamlarından aptamer-“uyumlu olan birim” anlamına gelmektedir [33]. RNA ve DNA aptamerleri kısa oligonükleotidler içerirken, peptit aptamerleri kısa ve değişken peptit domainler içermektedir.



Şekil 2.2. A) Aptamerin ikincil yapısı, B) Aptamerin kristal yapısı [34]

Aptamerlerin katlanarak 3 boyutlu bir yapı oluşturmaktadır. Aptamerler bu özelliği sayesinde hedeflerine yüksek özgünlükte bağlanmaktadır. Aptamer ve hedef

molekül arasındaki etkileşim geniş bir yüzey alanında gerçekleşmektedir. Geniş yüzey alanından dolayı hedef molekülde meydana gelebilecek en küçük değişiklik bile aptamerin bağlanmasını engelleyebilmektedir [32].

Aptamerler düşük derişimlerde (( $\mu\text{M}$ ) seviyesinden pikomolar (pM) seviyesine kadar) bile hedef moleküllerine yüksek özgünlükte bağlanma afinitesi göstermektedirler. Aptamerler, benzer özelliklere sahip olan hedef moleküllerine bağlanırken iki molekül arasındaki tek bir kimyasal grup farklılığını tespit ederek şekil farklılıkları olan aynı molekülü bile ayırt edebilmektedir.

Aptamerler, çeşitli partiküller ile immobilize edilerek hem tayin, hem tedavi için kullanılmaktadır. Aptamerleri tanıma elemanı olarak kullanan biyosensörler, aptasensör olarak adlandırılırlar. Son zamanlarda, yeni aptamer bazlı biyosensör (aptasensör), iz elementlerdeki çeşitli maddelerin tespitinde basitlik, duyarlılık ve özgüllük gereksinimlerini karşılayabilecek güçlü bir araç olarak ortaya çıkmıştır [15].

Aptamerler, kanser ve tromboz dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen ilaçlar için umut verici ajanlar olarak görülmektedir [35].

### **2.3.1 SELEX**

Aptamerler, ilk kez 1990 yılında Tuerk, Gold, Ellington ve Szostak tarafından SELEX (Üssel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi- Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) adlı bir *in vitro* eleme/seçim yöntemi ile üretilmiştir. Bu yöntem sayesinde, büyük bir rastgele dizilim havuzundan (bir oligomer kütüphanesinden) hedef moleküle yüksek afinite ve spesifite ile bağlanabilen RNA/DNA moleküllerinin belirlenebilmesi sağlanır [36].



Şekil 2.3. SELEX (Üssel Zenginleştirme ile Ligandların Sistemik Evrimi) yöntemi

SELEX yönteminde ilk adım bir oligonükleotid kütüphanesi hazırlamaktır. Bu kütüphane rastgele dizilmiş 40 ila 80 nükleotid uzunluğunda bir merkez bölgeye sahip olan DNA ya da RNA parçalarıyla hazırlanır. Daha sonra bu kütüphane polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yardımıyla çoğaltılır ve hedefe uygulanır. Uygulamadan sonra seçilen hedefe bağlanmayan DNA ortamdan uzaklaştırılır. İlk aşamada hedefe bağlanan DNA, PZR yöntemi ile tekrar çoğaltılarak hedefe uygulanır. İkinci uygulama sonrasında da yine hedefe bağlanmayan DNA ortamdan uzaklaştırılır. Bu işlem 5-12 arasında tekrarlanarak hedef moleküle en sıkı bağlanan aptamer seçilmiş olur [36]. Son aşamada elde edilen bu DNA dizileri dizilerek belirlenir. SELEX yöntemiyle elde edilen bu aptamerler özgünlüklerinden dolayı çeşitli biyoteknolojik araştırmalarda, gıda endüstrisinde, hastalıkların tanı ve tedavi aşamalarında çok önemli görevler üstlenebilir.

Tetrasiklini tanıyan aptamerler de çeşitli çalışmalarda SELEX yöntemi ile belirlenmiş [37, 38] ileriki çalışmalarda da TET'i tanıyan biyolojik ajanlar olarak kullanılmıştır [38-41].

### **2.3.2. Aptamerlerle Antikorların Karşılaştırılması**

Aptamerler hedef çeşitliliği, yüksek reaktiviteye sahip kararlı seçiciliği ve özgüllüğü, kolay üretim ve hedef moleküller üzerinde uyarlanabilir katlanma, yapısal modülasyon [20, 42], maliyet etkinliği ve stabilite gibi avantajlara sahiptir.

Antikorların üretilmesi için canlı bir yapıya gereksinim duyulmaktadır. Bu durum alerjik tepkime sorunlarının yaşanmasına neden olabilmektedir. Aptamerlerin üretiminde ise herhangi bir canlı yapıya ihtiyaç duyulmadığından, alerjik tepkime gibi bir sorun yaşanmamaktadır [43].

Aptamerler, protein bazlı bileşikler olan antikorların aksine nükleotid bazlı bileşiklerdir. Aptamerler, antikordardan yaklaşık olarak 20-25 kat daha küçüktür. Bu sayede iyon gibi daha küçük hedeflere bağlanabilmektedir [44].

Aptamerlerin yapısı oligonükleotitlerden oluştuğu için, pH ve sıcaklık gibi değişen çevresel koşullara karşı daha dirençlidirler. Antikorlar aşırı koşullarda denatüre olurken, aptamerler koşullar tersine çevrildiğinde yapılarını yeniden kazanmaktadır [45].

Aptamerler yapılarında buldukları nükleotitler sayesinde nükleazlara karşı hassastır. Aptamerlerin yapısında meydana gelen nükleotid değişiklikleri, aptamerlerin nükleazlara karşı direncini arttırmaktadır [46]. Tüm bu özellikler Çizelge 2.3'te karşılaştırmalı olarak özetlenmiştir.

Çizelge 2.3. Aptamer ve antikorun karşılaştırılması [36]

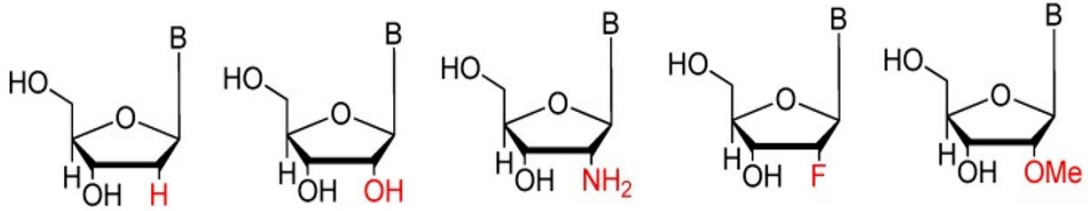
Özellikler	Antikor	Aptamer
Yapı	Protein	Nükleik Asit
Özgünlük	Yüksek	Yüksek
Afinite	Yüksek	Yüksek
İmmünojenisite	Yüksek	-
Maliyet	Yüksek	Düşük
Kararlılık	Kararsız	Kararlı
Hedefler	İmmünojenik moleküller	Peptidler, vitaminler, iyonlar vb.
Üretim	<i>In vivo</i>	Laboratuvar Ortamı
Üretim Zamanı	6 ay	3-7 hafta
Modifikasyon	Kısıtlı	Uygun

### 2.3.3. Aptamer Modifikasyonları

Nükleik asit aptamerleri, antikorlarla karşılaştırıldığında minimum immünojenisiteye, yüksek kimyasal sentez üretimine, düşük maliyete ve yüksek kimyasal stabiliteye sahiptir. Bununla birlikte aptamerlerin nükleaz bozunmasına yatkınlığı, renal filtrasyon yoluyla hızlı ekskresyonu ve yetersiz bağlanma afinitesi gibi özellikleri aptamerlerin pratik kullanımını ciddi şekilde sınırlamaktadır [47]. Aptamerlerin nükleaz yıkımına direnmesi [48, 49], hedef bağlanma afinitelerini iyileştirmesi [16, 50, 51] ve renal filtrasyona direnmesi [52, 53] için kimyasal modifikasyon stratejileri geliştirilmiştir. Bu kapsamda, nükleik asit aptamerlerinin

terminallerinde, fosfodiester bağlantısında, şeker halkasında ve bazlarda kimyasal birtakım modifikasyonlar yapılmıştır [47].

Aptamer ve hedef protein arasındaki etkileşimin kesilmesi afinitenin azalmasına neden olmaktadır [54, 55]. Şeker halkalarının 2' ucunda bulunan H ile 2'-floro (2'-F), 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>) ya da 2p-O-metil (2p-OMe) gurplarının yer değiştirmesi sonucunda meydana gelen modifikasyonlar, aptamerlerin hem yarı ömrünü uzatmış hem de affinitesini arttırmıştır (Şekil 2.4) [47]. Son yıllarda -NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş aptamerler tayin işlemlerinde kullanılmaya başlanmıştır [56].



Şekil 2.4. Şeker halkalarının 2' ucunda bulunan H ile 2'-floro (2'-F), 2'-amino (2'-NH<sub>2</sub>) ya da 2p-O-metil (2p-OMe) gurplarının yer değiştirmesi sonucu meydana gelen aptamer modifikasyonları [47]

#### 2.4. Aptamerlerin Uygulaması

Aptamerlerin, hedeflerini spesifik olarak tanıyıp onlara bağlanabilme özelliği sayesinde, son yıllarda aptamerler araştırma alanlarında kullanılmaya başlanmıştır. Aptamerler teşhis, tanı aracı olarak moleküler biyoloji, biyoteknoloji ve biyotıp içindeki çeşitli alanlarda kullanılmıştır. Ayrıca aptamerler biyosensörler ve hedef inhibitörler gibi terapötik uygulamalarda da oldukça kullanılmaya başlanmıştır. [57].

### 2.4.1. Tanı ve Teşhis Aracı Olarak Aptamerler

Monoklonal antikolar gibi aptamerler de ilgili hedef moleküllerin tanınması için kullanılabilir. Aptamerler klinik tanı yöntemlerinde, çevresel kirliliğin ve gıda güvenliğinin izlenmesi için kullanılan yöntemlerde antikoların yerini alma potansiyeline sahip teşhis ajanlarıdır.

Aptamerler, hepatit C virüsü [58], Şiddetli Akut Solunum Sendromu (SARS) koronavirüsü [59], herpes simpleks virüsü [60] gibi viral enfeksiyonların saptanması için moleküler problemlerin üretilmesinde kullanılmıştır. Ayrıca SELEX ile üretilen aptamerler *Trypanosoma spp* gibi bir takım parazitlerin tespit edilmesinde kullanılmıştır [61].

Aptamerler canlı kanser hücrelerinde kansere bağlı biyobelirteçlerin saptanması için kullanılmıştır. Ayrıca aptamerler, lenfoma, adenokarsinom, lösemi, glioblastom ve diğer kanser tiplerinin *in vivo* görüntülenmesinde de başarılı bir şekilde kullanılmıştır [62].

Aptamerler çevresel kirleticileri ve bunların neden olduğu hastalıkları tespit edilmesinde kullanılmaktadır. Antibiyotikler, ağır metaller, toksinler ve patojenler insan sağlığı için oldukça tehlikelidir. Antibiyotikler çiftlik hayvanlarında büyüme takviyesi olarak ya da tedavi amacıyla oldukça sık kullanılmaktadır. Bu sayede antibiyotikler hayvan dokularında birikebilir ve daha sonra insana geçebilir. Bu sorunu ele almak için, kloramfenikol ve tetrasiklin gibi bazı antibiyotiklere karşı aptamerler geliştirilmiştir [63, 64].

### 2.4.2 Terapötik Aptamerler

Aptamerler küçük moleküller ve protein ligandları ile rekabet edebilme ve hedeflerini inhibe edebilme [65] gibi özelliklere sahip olduklarından dolayı terapötik olabilme potansiyeline de sahiptirler. Ayrıca aptamerler, hedef reseptörlerin fonksiyonunu aktive edebilir veya terapötik ajanların hedef hücrelere veya dokuya verilmesinde taşıyıcı olarak işlev görebilirler [66].



### 2.4.3. Aptamer Bazlı Biyosensörler

Aptamerler, çeşitli partiküller ile immobilize edilerek hem tayin hem tedavi için kullanılmaktadır. Aptamerleri tanıma elemanı olarak kullanan biyosensörler, aptasensör olarak da adlandırılırlar [67].

Elektrokimyasal aptasensörler, analiti seçici olarak bağlamak için elektrot yüzeyinde hareketsizleştirilmiş bir aptamer kullanan afinite biyosensörleridir. Lokalize yüzeylerdeki akımlarda meydana gelen değişimler sayesinde aptamerin bağlanma sinyali tespit edilmektedir. Elektrokimyasal aptasensörlerde amaç, kimyasal bilginin ölçülebilir bir sinyale dönüştürülmesidir. Çalışma prensiplerine dayanarak, elektrokimyasal biyosensörlerin potansiyometrik, amperometrik, impedimetrik ve kondüktometrik gibi farklı teknikleri bulunmaktadır [68].

Aptamerlerin hedefe bağlı olarak konformasyonel değişim göstermesi aptamer bazlı yeni analizlerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Basit ve düşük maliyetli elektrokimyasal aptasensör bu yeni analiz yöntemlerinden biridir. Elektrokimyasal aptasensörlerde aptamerlerin hedeflere basit bir şekilde bağlanabilmesi için farklı stratejiler geliştirilmiştir. Bu kapsamda etiketli bir aptamerin hedefiyle olan etkileşimi incelenmiştir [69]. Elektrokimyasal sinyali çoğaltmak için AuNP'ler veya manyetik nanopartiküller gibi nanoparçacıkların biyosensörlerin yapısına dahil edilmektedir [70]. Zhan ve arkadaşları yaptıkları çalışmada tetrasiklin tayini için  $Fe_3O_4$  manyetik nano partikül içeren elektrot ve aptamer kullanarak, elektrokimyasal bir biyosensör geliştirmiştir [69]. Başka bir çalışma da ise tetrasiklin tayini için geliştirilen aptamer bazlı elektrokimyasal biyosensörde sinyal iletimini sağlaması için altın nanopartikül kompozitler kullanılmıştır [70].

SPR bazlı aptasensörler etiketsiz algılama ve gerçek zamanlı nicel bir analiz sunar. SPR, moleküler bağlanma sayesinde yüzeydeki kırılma endeksindeki değişikliklerle ilişkili kütle değişikliklerini tespit eden kütleye duyarlı bir biyosensördür [67]. Wang ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada bal numunelerindeki tetrasiklini tayin etmek için tetrahedron nanoyapı ile üretilmiş SPR aptasensör geliştirmişlerdir [71].

Florometrik analizler yüksek duyarlılığa sahiptir. İçerdiği çok sayıda floresan söndürme materyalleri ile aptamerlere konjügasyon kolaylığı açısından avantajlar sunmaktadır. Aptamer bazlı floresan rezonans enerji transferi (FRET) analizinde, aptamerlerin hedefe bağlı olarak konformasyonel değişim göstermesi ve hem bir söndürücü hem de bir florofor ile etiketlenmesi sayesinde çözeltilerde hedefin varlığı izlenebilmektedir [72].

AuNP'ler, süper-söndürme özellikleri nedeniyle florometrik aptasensörlerde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca, kuantum noktaları (QD'ler), karbon noktaları (CD'ler), evropiyum ( $\text{Eu}^{3+}$ ) gibi TET'leri tespit etmek için bazı floresan probalar kullanılmıştır. Antibiyotik tayini için kullanılan floresan sensörler yüksek verimlilik ve hassasiyet, kolay kullanım gibi avantajlara sahip olmasına rağmen, floroforun kısa kullanım ömründen dolayı sahada kullanıma elverişli değildir [73].

Tayin işlemlerine yönelik kullanılan kolorimetrik yöntemin temel prensibi, renk değişikliğine dayanmaktadır [74]. Altın ve gümüş nanoparçacıklar gibi metalik nanoparçacıklar, mesafeye / boyuta bağlı optik özelliklerden dolayı kolorimetrik sensörlerde sıklıkla kullanılmaktadır [75]. Kolloid altın nanopartikülleri (AuNPs), çeşitli elektronik ve optik özelliklerinden dolayı geniş anlamda moleküler algılama için bir etiket olarak düşünülmüştür [67]. Yüksek verimliliği ile ışığı emer ve dağıtır, güçlü söndürücüler olarak bilinmekte ve geniş bir renk yelpazesi sergilemektedir [76].

AuNP ve TET aptamerinin kullanıldığı 2020 yılındaki bir çalışmada Sheng ve arkadaşları baldaki tetrasiklin kalıntılarını belirlemek için AuNP'lere bağlı bir aptamer deneyini rapor etmiştir. AuNP'ler peroksidaz benzeri aktiviteleri sayesinde TMB ile reaksiyona girerek renkli ürünler sergilemiştir. Bu çalışma ile basit materyallerle hazırlanan, yüksek özgünlüğe ve düşük maliyete sahip, karmaşık cihaz gerektirmeyen, enzim içermeyen ELISA benzeri bir aptasensör geliştirilmiştir [77].

AuNP bazlı kolorimetrik yöntemlerde, AuNP'ler karmaşık biyolojik sıvılar içinde mevcut olan tuz ve diğer moleküllerin varlığında spesifik olmayan bir şekilde

kümelenme eğilimidir [78]. AuNP bazlı biyosensörler nispeten yüksek maliyetlidir ve hedef ile aptamerler arasındaki yakınlığı zayıflatabilir. Aynı zamanda AuNP bazlı kolorimetrik saptamanın tuzla oluşturulan birleşimi, algılama ortamlarına (asit, iyonik güç, vb.) karşı hassastır ve potansiyel olarak yanlış pozitif sinyal okunmasına neden olabilir [79].

## **2.5. Aktif Yüzeylerde Modifiye Aptamerlerin İmmobilizasyonu**

Aptamer tabanlı biyosensörler, testler ve teşhisler tıbbi, gıda güvenliği ve çevresel analizlerdeki uygulamalar için büyük bir potansiyele sahiptir. Bu yeni analitik araçların başarılı bir şekilde geliştirilmesinde kritik bir parametre, aptamerlerin ilgili yöntem için uygun yüzey üzerinde etkili bir şekilde bağlanmasıdır. İmmobilizasyon stratejileri güvenilir ve basit olmalıdır. Ayrıca aptamerlerin biyofiziksel özelliklerini ve bağlanma yeteneklerini korumasına izin vermelidir [80].

Modifiye edilmiş aptamerin immobilizasyonu için aktifleştirilmiş yüzeylerin kullanılması, hem aptamer tabanlı biyosensörlerin özgünlüğünü artırır, hem de spesifik olmayan adsorpsiyonu azaltır. Yüzey aktivasyon stratejisinin türü, aptamer ile bağlantılı terminal fonksiyonel grupların tipine bağlıdır. Yüzeyler, sıfır uzunluklu çapraz bağlayıcılar ya da iki işlevli çapraz bağlayıcılar kullanılarak etkinleştirilebilirler [80].

Sıfır uzunlukta çapraz bağlayıcılar, yüzey uzaması veya aptamerlerin yüzeye "doğrudan bağlanması" için kullanılan moleküllere herhangi bir zincir uzaması veya birleşmesi olmaksızın yüzeylerdeki fonksiyonel grupları aktive eden reaktif moleküllerdir. Sıfır uzunluklu çapraz bağlayıcıların en yaygın fonksiyonel grupları arasında, bir  $-NH_2$  grubu içeren modifiye aptamerlerle reaksiyona giren hidroksil ( $-OH$ ), amin ( $-NH_2$ ), karboksil ( $-COOH$ ) ve aldehit ( $-CHO$ ) bulunur. Aptamerlerin yüzeye dolaylı yoldan bağlanması durumunda iki işlevli olan homofonksiyonel çapraz bağlayıcılar kullanılır. Bu çapraz bağlayıcılar hem aptamer hem de yüzey için de aynı reaktif gruba sahiptir. Aptamer problemlerini birleştirmeden önce, homofonksiyonel bağlayıcılar önce yüzeyle reaksiyon girmelidir. Bunun sebebi

ise oluşabilecek aptamer dimerlerini inhibe etmektir. En sık kullanılan iki işlevli çapraz bağlayıcılar 1,4-fenilen diizotiyosiyanat, glutaraldehid, 1,4-bütandiol diglisidil eter, disüksinimidil karbonat, dimetilsüberimidat ve karbonildiimidazoldür [80].

## **2.6. Manyetik Partiküller**

Moleküler algılama alanı, yıllar içinde biyo-fonksiyonelleştirilmiş malzemelerdeki ilerlemelerle artmıştır. Özellikle, sentez kimyasında kaydedilen ilerleme, kontrollü boyutlar, şekiller ve bileşimlerden oluşan partiküllerin oluşturulmasına izin vererek malzeme özelliklerini hassas bir şekilde manipüle etmek için etkin bir yol sağlamaktadır [81]. Özellikle nano- ve mikro-metre boyutundaki manyetik parçacıkların, harici bir alanın etkisi altında mıknatıslanma ve geniş yüzey / hacim oranı gibi benzersiz özellikleri nedeniyle değerli oldukları kanıtlanmıştır [82].

Manyetik parçacıklar tipik olarak bir manyetik çekirdek ve manyetik olmayan bir kabuktan oluşur. Biyolojik tahlil gelişimi için, bu dış kabuk, biyomoleküllerin bağlanmasına veya adsorpsiyonuna izin vermek için kimyasal olarak aktive edilmektedir. Manyetik partiküllerin fonksiyonelleştirilmesi, genellikle biyomolekülün partikülün aktif yüzeyine kovalent bağlanmasıyla, yaygın olarak iki işlevli çapraz bağlayıcılara dayanan biyo-konjugasyon kimyaları kullanılarak gerçekleşir [83].

Manyetik partiküller (MP), biyosensörlerin yapısı için de uygundur. Biyomolekül ile kolayca kaplanabilir ve analitik amaçlar için kullanılabilirler. Ayrıca, enzim mimetikleri veya taklitçileri, yapay enzimler veya enzim benzeri bileşikler olarak kullanılabilir [84]. Enzim mimetikleri, enzim benzeri reaksiyonları katalize etmek için doğal enzimlere benzer katalitik aktiviteye sahiptir. Doğal protein enzimleriyle karşılaştırıldığında, enzim mimetikleri daha basit sentez, daha yüksek stabilite, daha düşük maliyet, daha kolay modifikasyon gibi çeşitli avantajlar sunmaktadır [85]. Manyetik partiküller, peroksidaza bağlanmadan doğrudan kullanılmasına izin veren peroksidaz benzeri aktiviteye sahip olabilmektedir [84].

MP'ler, aptamerler, proteinler, antikolar gibi yüksek afiniteli ligandları hareketsiz hale getirmek için kullanılan aminler, karboksiller, epoksiller ve tosiller gibi çeşitli reaktif gruplar ile modifiye edilebilmektedir [86].

Öte yandan aptamerler, manyetik partiküller, altın kaplı nanapartiküller (AuNPs), kuantum noktaları (QD'ler), karbon noktaları (CD'ler) ve europium iyonları ile immobilize edilerek (Çizelge 2.4), hem tayin, hem tedavi için kullanılmaktadır [67].

Çizelge 2.4. Aptamerler manyetik partiküller, altın kaplı nanapartiküller (AuNPs), kuantum noktaları (QD'ler), karbon noktaları (CD'ler) ve europium iyonlarının karşılaştırılması [20, 70]

Partiküller	Avantajları	Dezavantajları
<b>AuNPs</b>	Geniş yüzey alanı; Yüksek hassasiyet; Biyouyumlu	Algılama ortamlarına karşı hassas; Yüksek maliyetli
<b>QD'ler, CD'ler ve Evropiyum iyonları</b>	Yüksek verimlilik; Kolay kullanım	Floroforun kısa kullanım ömrü
<b>Manyetik Partiküller</b>	Peroksidaz benzeri aktivite; Biyomolekül ile kolayca kaplanabilme, Yüksek tekrarlanabilirlik; Yüksek stabilite	

## 2.7. Peroksidaz Benzeri Aktivite

Peroksidaz aktivite organik substratların oksidasyonunu katalize ederek renk değişikliğine neden olmaktadır. Bu özelliğinden dolayı tespit aracı olarak kullanılmaktadır. Peroksidaz hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) bileşiği ile hidrojen alış-verişi yapan bileşiklerin reaksiyonunu katalizleyen bir enzimdir.  $H_2O_2$ 'nin geniş uygulanabilirliği ve basit yöntemleri nedeniyle gıda, ilaç, klinik, çevre ve diğer sektörlerde çok kullanılan bir madde haline gelmiştir [87].

Günümüzde MP'ler, kaplanmış MP'ler, bakır nanokümler, CuS nanopartiküller, CuInS<sub>2</sub> nanokristaller veya polioksometalatlar gibi malzemeler peroksidaz benzeri özelliklerinden dolayı kolorimetrik biyosensörlerde HRP'nin yerini alacak kadar güçlü hale getirilmiştir [84]. Yan ve arkadaşlarının, yaptıkları çalışmada üç farklı boyutta Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> manyetik nanopartikül, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, TMB, DAB ve OPD kullanılmıştır. Substrat olarak kullanılan TMB, DAB ve OPD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> varlığında okside olarak kolorimetrik ürünler ortaya çıkarmıştır [87].

Aptamerler biyosensörlerin geliştirilmesinde gelecek vaat eden malzemelerden birisidir. Aptamerlerin antikora kıyasla düşük maliyet, hızlı sentezlenebilme ve modifikasyon kolaylığı, daha stabil olması gibi avantajlarından dolayı kolorimetrik, elektrokimyasal ve floresans tabanlı algılama yöntemlerinde oldukça kullanılmaktadır. Diğer bir gelecek vaat eden malzeme ise enzim mimetikleridir. Doğal protein enzimleriyle karşılaştırıldığında enzim mimetikleri daha basit sentez, daha yüksek stabilite, daha düşük maliyet, daha kolay modifikasyon gibi avantajlara sahiptirler. Ayrıca peroksidaz benzeri aktiviteye sahiptirler. Gıda güvenliğini ve halk sağlığını korumak amacıyla gıdalarda bulunan ağır metalleri incelemek için kapsamda aptamer bağlı enzim mimetik tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir [88]. Gıdalarda bulunan tetrasiklin kalıntısının tayini için ise aptamer bağlı peroksidaz benzeri aktiviteye sahip AuNP tabanlı biyosensörler geliştirilmiştir [77, 89]. Manteyik partiküler ya da manyetik kompozitlerle kaplı AuNP'ler ile geliştirilen aptamer tabanlı biyosensörler tetrasiklin [90] dahil birçok antibiyotiği tayin etmek için kullanılmaktadır [91, 92].

### 3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

#### 3.1. Kimyasallar

Bu tez çalışmasında tetrasiklin, sodyum klorür (NaCl), sodyum monobazik ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ), sodyum dibazik ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ), sitrik asit, hidroklorik asit (HCl), etanol (EtOH), hidrojen peroksit ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), 3-glisidiloksipropil trimetoksisilan (GLYMO), etilendiamin (EDA), gluteraldehit (GA-%50 sulu çözeltisi), sodyum karbonat ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), O-fenilendiamin (OPD), tolüen ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$ ) yüksek saflıkta kullanılmıştır.

Manyetik silika (Mag-SiO<sub>2</sub>) mikropartikülleri [93] ve GLYMO-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikülleri Prof. Dr. S. Ali Tuncel'in grubu ile sentezlenmiştir. Çalışmada kullanılan tetrasiklin antibiyotigine özgü, -NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş aptamer dizini [94] Çizelge 3.1'de verilmiş, 100 µM derişiminde ve tuzdan arındırılmış olarak temin edilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışmada kullanılan, amin ile modifiye edilmiş aptamer dizini [94]

---

#### Amin ile modifiye edilmiş aptamer dizini

---

5'-NH<sub>2</sub>-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-CGT ACG GAA TTC GCT AGC CCC CCG GCA GGC CAC  
GGC TTG GGT TGG TCC CACTGC GCG TGG ATC CGA GCT CCA CGT  
G-3'

---

#### 3.2. Deneysel Kısım

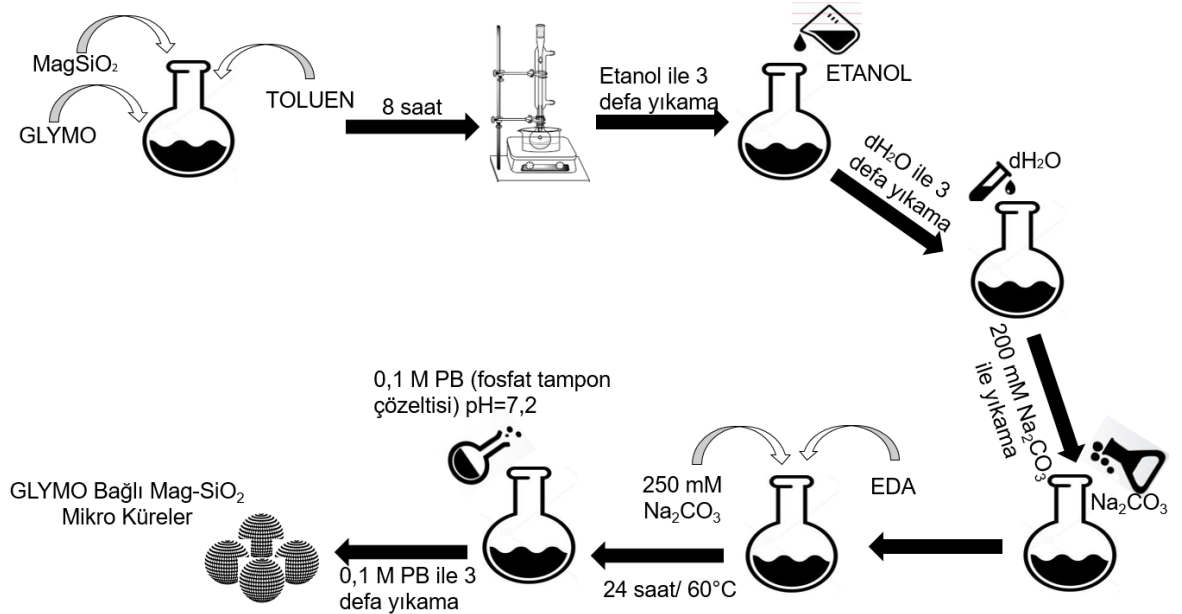
Mikropartikülerin sentezi Salimi vd. [95]'nin yönteminden uyarlanmıştır. Temel olarak, sentezlenen mikropartiküller gluteraldehit çapraz bağlayıcısı ile tetrasiklin aptamerine bağlanmıştır. Peroksidaz benzeri aktivite gösteren mikropartiküller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizlor aracılığı ile OPD'nin (o-fenilendiamin) oksidasyonuna neden olmaktadır. Bu sayede OPD flüoresan emisyonlu renkli ürünler sunmaktadır [96].

Mikropartiküllerin peroksidaz benzeri aktivite özelliği kullanılarak tapon ortamında farklı derişimlerdeki tetrasiklin tayini yapılmıştır.

### 3.2.1. Mikropartiküllerinin Sentezi

#### 3.2.1.1. GLYMO-Bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerin Sentezi

GLYMO bazlı partiküllerin sentezi Salimi vd. [95]'nin yönteminden uyarlanmıştır (Şekil 3.1). Sırasıyla 10 ml Tolüen, 2 ml GLYMO ve 0,4 g Mag-SiO<sub>2</sub> eklendikten sonra 8 saat boyunca reflux sistemi (110°C) yardımıyla karıştırılmıştır. Elde edilen karışım, mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra önce etanol (tolüeni ortamdaki uzaklaştırmak için), sonra da ddH<sub>2</sub>O (etanolü ortamdaki uzaklaştırmak için) ile birer kez yıkanmıştır. 200 mM, 20 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> sulu çözeltisi hazırlanarak GLYMO-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikül karışımı 2 defa yıkanmıştır. Elde edilen karışım mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra 250 mM, 30 ml Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ve 2 M, 4 ml EDA çözeltisi ile 60°C'de 24 saat süresince tepkimeye sokulmuştur. Önce 0,1 M PB (fosfat tampon çözeltisi) pH 7,2 ile 3 defa, sonra da ddH<sub>2</sub>O ile 3 defa yıkanmıştır.



Şekil 3.1. GLYMO-Bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikül sentezi



Elde edilen karışım mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra üzerine 10 ml' ye kadar ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Gravimetrik analiz için daha önce boş ağırlığı tartılmış olan 2 ayrı kabın içine karışımdan 250'şer µl alınarak 70°C'de t=24 st boyunca etüvde bekletilmiştir. Gravimetrik analiz ile partikülün yoğunluğu belirlenmiştir. Geriye kalan partikül mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra 0,1 M fosfat tamponu (PB) pH 7,2 ile 3 defa yıkanmıştır. Karışım mıknatıs ile çöktürüldükten sonra üzerine 9,5 ml'ye kadar PB eklenmiştir.

### **3.2.1.2. APTES-Bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerin Sentezi**

APTES-bağlı partiküllerin sentezi Salimi vd. [95]'nin yönteminden uyarlanmıştır. Sırasıyla, 10 ml Tolüen, 2 ml APTES, 0,4 g Mag-SiO<sub>2</sub> ve 0,2 ml Tris-Etilamin kimyasalları eklendikten sonra 110°C'de 8 saat süresince reflux sistemi yardımıyla karıştırılmıştır. Elde edilen karışım mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra önce etanol (tolüeni ortamdaki uzaklaştırmak için), sonra da ddH<sub>2</sub>O (etanolü ortamdaki uzaklaştırmak için) ile yıkanmıştır. Elde edilen karışım mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra üzerine 10 ml' ye kadar ddH<sub>2</sub>O eklenmiştir. Gravimetrik analiz için daha önce boş ağırlığı tartılmış olan 2 ayrı kabın içine karışımdan 250'şer µl alınarak 70°C'de t=24 st boyunca etüvde bekletilmiştir. Gravimetrik analiz ile partikülün yoğunluğu belirlenmiştir. Geriye kalan partikül mıknatıs yardımıyla çöktürüldükten sonra 0,1 M fosfat tamponu (PB) pH 7,2 ile 3 defa yıkanmıştır. Karışım mıknatıs ile çöktürüldükten sonra üzerine 9,5 ml'ye kadar PB eklenmiştir.

### **3.2.2. Mikropartikül Seçimi**

Sentezlenen GLYMO- ve APTES-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikülleri, peroksidaz benzeri aktivite gösteren partiküllerdir. Peroksidaz aktivitesi gösteren substrat konjugatları tayin etmek için OPD kullanılmıştır. Peroksidaz aktivitesi gösteren partiküller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizör aracılığı ile OPD'nin oksidasyonuna neden olmaktadır. Partiküllerin peroksidaz aktivitesinin ölçülmesi için OPD ile reaksiyonundan sonra plaka okuyucuda OD=450 nm'de ölçüm alınmıştır.

### **3.2.3. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerinin ve Aptamer Bağlı GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Karakterizasyonu**

#### **3.2.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü**

Azot adsorpsiyonu ile GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin ve aptamer bağlı GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin yüzey alanını ve gözenek boyutunu hesaplamak için Brunauer-Emmett-Teller (BET) (Quantochrome, Nova 2200e, ABD) cihazı kullanılmıştır. Analiz için iki farklı örnek hazırlanmıştır; i) 0.1 g GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri ve ii) 0.1 g GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri ile 0,1 nmol/µl aptamer reaksiyona girdikten sonra 70°C'ye ayarlanmış etüvde kurutulmuştur. BET hücresine ilave edilen örnek, nemin 6 saat azotla çıkarıldığı bir vakum odasına yerleştirilmiştir. Vakumdan sonra ölçüm bölgesine yerleştirilen örnek azot adsorpsiyon-desorpsiyonu işlemine tabi tutulmuştur. Adsorplanmış ve desorplanmış azot hacmi sayesinde gözenek boyutu ve yüzey alanı elde edilmiştir.

#### **3.2.3.2. Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi**

Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) kullanılarak GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin, tetrasiklin aptamerinin ve aptamer bağlı GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin fonksiyonel grupları tayin edilmiştir. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri ve aptamer bağlı GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri 1 gün boyunca 70°C etüvde kurutulmuştur. Aptamer örneği, 100 mM NaCl-PB çözeltisi ile seyreltilip 0,1 nmol/ µl derişimde hazırlanmıştır.

#### **3.2.4 Gluteraldehit Çapraz Bağlayıcı Çözeltisi ile GLYMO-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub>**

Gluteraldehit, beş karbonlu bir zincirin her iki ucunda bir aldehit molekülü içeren homobifonksiyonel bir çapraz bağlayıcıdır. Birincil reaktivitesi amin gruplarına doğrudur. Gluteraldehit, büyük moleküler boyutu nedeniyle nüfuz etmesi yavaştır ve nüfuz ettikçe çapraz bağlanır [97].

GA %50 sulu çözeltisi, 0,1 M PB pH 7,2 ile %1 v/v seyreltikten sonra GLYMO-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikülleri ile t=18-24 st süre aralığında, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda reaksiyona bırakılmıştır. GA %1 v/v çözeltisi her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

Mikropartiküller, reaksiyondan sonra 3 defa PB ile yıkanarak tetrasikline özgü -NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş aptamer ile reaksiyona hazır hale getirilmiştir.

### **3.2.5. Tetrasiklin Aptamerlerinin Mikropartiküller ile Etkileşimi**

Tetrasiklin aptameri 0,1 M PB (fosfat buffer) pH 7,2 ile çözünerek 100 µM stok çözeltisi hazırlanmıştır. Daha sonra, tek seferde kullanılmak üzere, 10-15-20 µl olacak şekilde steril santrifüj tüplerine aktararak -20°C de saklanmıştır. Aptamerler mikropartiküller ile etkileşmeden önce stok aptamer çözeltisi 100 mM NaCl-PB ile 10-2-1-0,5-0,1 nmol/µl olacak şekilde seyreltilmiştir.

Aptamer örnekleri t=5 dk boyunca 95°C derecede denature edildikten sonra t=10 dk buzun üzerinde bekletilmiştir. 100 µl aptamer çözeltisi partikülün üzerine eklenerek oda sıcaklığında, 300 rpm'de t=2 st boyunca karıştırılmıştır.

Gluteraldehit çapraz bağlayıcısı sayesinde, GLYMO-bağlı Mag-SiO<sub>2</sub> mikropartikül ile -NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş aptamer birbirine bağlanmıştır.

### **3.2.6. Aptamer-Mikropartikül Karışımının Tetrasiklin ile Etkileşimi**

0,1 M PB pH 7,2 ile 0,2 µg/ml tetrasiklin stok çözeltisi hazırlanmış, 100-200-500-1000-2000 ng/ml çözeltilerine seyreltilmiştir. Tetrasiklin çözeltileri her deney için taze olarak hazırlanmıştır.

Hazırlanan tetrasiklin çözeltilerinden (100-200-500-1000-2000 ng/ml) 100 µl alınarak aptamer-mikropartikül karışımının üzerine eklenmiştir. Karanlıkta ve oda sıcaklığında t=30 dk süresince reaksiyona girmiştir.

Tepkimeden sonra karışım mıknatıs yardımıyla çöktürülüp 0,1 M PB pH 7,2 ile 3 defa yıkanmıştır.

### 3.2.7. Mikropartiküllerin Peroksidaz Benzeri Aktivite Özelliği Kullanılarak Tapon Ortamında Tetrasiklin Tayini

GLYMO-bazlı mikropartiküllerin peroksidaz benzeri aktivite göstermesinden dolayı, OPD ile etkileşimi plaka okuyucu ile ölçülmüştür.

OPD konsantrasyonundaki artışla, flüoresan yoğunluğu önemli ölçüde artış göstermektedir [98]. OPD'nin çözündüğü tampon çözeltinin pH değerinin ayarlanması için çalışma yapılmıştır. Asidik tapon çözelti kullanıldığı zaman OPD'deki amino grupları protonlanabilmektedir. Bazik tapon çözelti kullanıldığı zaman ise ortamda bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bozunmaya uğrayarak floresan yoğunluğun azalmasına neden olabilmektedir. Peroksidaz aktivitesi göseren partiküller H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> katalizör aracılığı ile OPD'nin oksidasyonuna neden olur. Bu sayede OPD flüoresan emisyonlu renkli ürünler sunmaktadır [96].

Bu kapsamda OPD çözeltisi hazırlanırken kullanılan OPD miktarı (mg/ml), tampon çözelti çeşidi, tampon çözeltinin pH değeri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (µl/ml) parametreleri incelenmiştir (Çizelge 3.2).

OPD çözeltisi hazırlandıktan sonra, partikül-aptamer-tetrasiklin karışımının üzerine 200 µl eklenip karanlık ortamda, oda sıcaklığında tepkimeye sokulmuştur. Bu tez çalışması sırasında OPD'nin zaman taraması da t=45-75 dk arasında yapılmıştır. Reaksiyon sonunda karışımdan 150 µl alınarak plaka okuyucuda OD=450 nm' de okuma yapılmıştır. Okuma yapıldıktan sonra alınan 150 µl karışıma tekrar eklenerek t=60 dk'ya kadar reaksiyon devam ettirilmiştir. Aynı işlemlere t=75 dk sonuna kadar devam edilmiştir.

Reaksiyonu durdurmak amacıyla 3 M HCl çözeltisinden 2-10-15-20 µl OPD'li partikül karışımına eklenip, plaka okuyucuda OD= 492 nm'de ölçüm alınmıştır.

Çizelge 3.2. OPD çözeltisi hazırlanırken kullanılan OPD miktarı (mg/ml), tampon çözelti çeşidi, tampon çözeltinin pH değeri ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> miktarı (µl/ml)

OPD miktarı (mg/ml)	Tampon Çözelti	Tampon Çözeltinin pH Değeri	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> miktarı (µl/ml)
1,0	0,1 M Fosfat	7,2	1,0
0,4	0,1 M Fosfat	7,2	0,4
1,0	0,1 M Fosfat	7,2	0,6
1,0	0,05 M Fosfat Sitrata	5,0	1,0
0,4	0,05 M Fosfat Sitrata	5,0	0,4
1,0	0,1 M Fosfat Sitrata	7,0	1,0
1,0	0,1 M Fosfat Sitrata	7,0	0,6
0,4	0,1 M Fosfat Sitrata	7,0	0,4
1,0	0,1 M Fosfat Sitrata	5,0	1,0
0,4	0,1 M Fosfat Sitrata	5,0	0,4
1,0	0,1 M Fosfat Sitrata	5,0	0,6

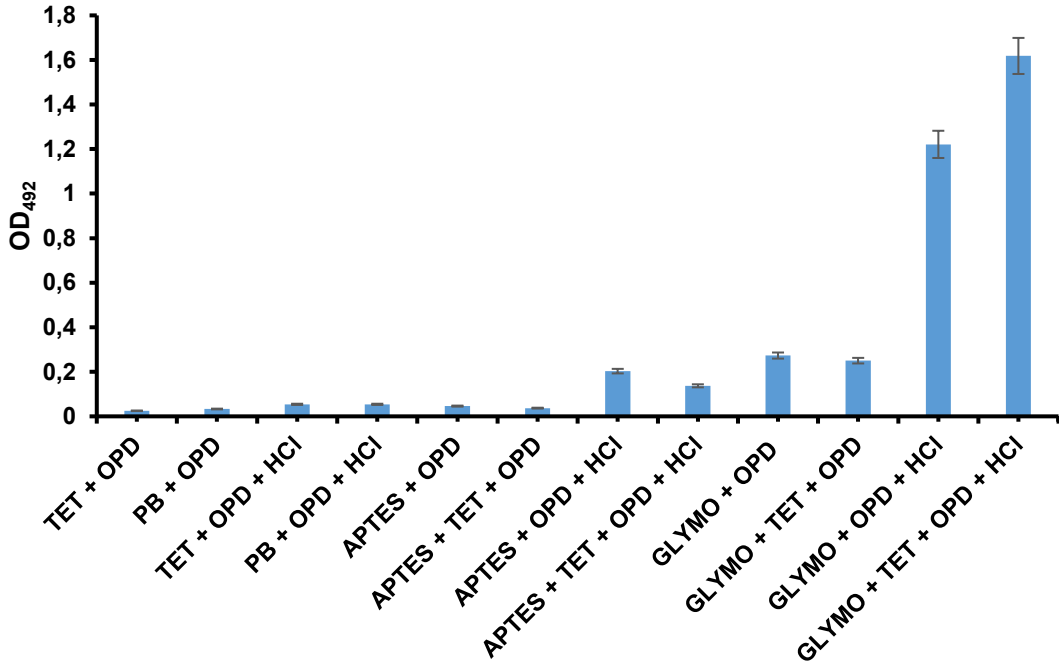
## 4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tez kapsamında tetrasiklin tayinine yönelik, GLYMO- ve APTES-bağlı MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri sentezlenmiş, partiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesi ve OPD substratı kullanılarak kolorimetrik bir aptasensörün geliştirilmesi için ilk olarak, tetrasiklin aptameri ile mikropartiküllerin optimal reaksiyon çözeltisi belirlenmiş; farklı derişime sahip tuzlu çözeltilerin tetrasiklin aptamerinin katlanma şekline olan etkisi incelenmiştir. Tetrasiklinin kolorimetrik tayininde, aptamer ve OPD derişimlerinin, ortam pH değerinin, reaksiyonu durdurmak için kullanılan asit miktarı ve OPD ile reaksiyon süresinin tetrasiklinin tayinine etkileri de sistematik olarak incelemiştir.

### 4.1. GLYMO- ve APTES-Bağlı MagSiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Peroksidaz Benzeri Aktivite Ölçümü ve Partikül Seçimi

Tez kapsamında manyetik silika mikropartikülleri GLYMO ve APTES ile türevlendirilmiş, bu sayede NH<sub>2</sub> uçlu aptamerin kovalent olarak bağlanması hedeflenmiştir. Türevlendirilmiş partiküllerin peroksidaz aktivelerinin kıyaslanması amacıyla ilk etapta OPD substratı ile olan reaksiyonu spektrofotometrik olarak incelenmiştir. OPD, ELISA prosedürlerinde peroksidaz aktivitesi gösteren substrat konjugatları tayin etmek için yaygın olarak kullanılan bir kimyasaldır. Substratın peroksidaz benzeri aktivitesi varsa, OPD ile etkileşime girdiğinde turuncu-kahverengi renk vererek ve plaka okuyucuda OD=450 nm'de spektrofotometrik olarak okunmaktadır [96].

Mikropartiküllerin OPD ile olan reaksiyonu sonucunda, GLYMO-bağlı mikropartiküllerinden, APTES-bağlı mikropartiküllere kıyasla daha fazla absorbans değeri alınması sebebiyle tez çalışmasına bu partikül ile devam edilmiştir (Şekil 4.1). Tek başına tetrasiklin veya fosfat tampon çözeltisinin OPD ile olan reaksiyonundan ise, beklenildiği gibi, bir absorbans değeri elde edilememiştir.

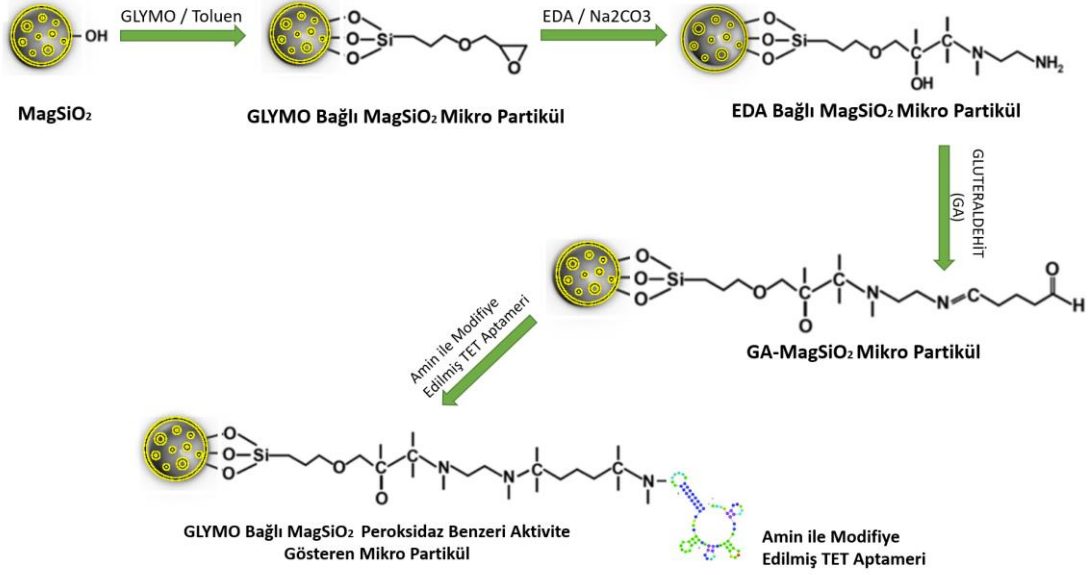


Şekil 4.1. GLYMO- ve APTES-bağlı MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin peroksidaz benzeri aktivitelerinin OD=492 nm'deki absorbans değerleri. Mikropartikül miktarı: 5 mg, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi, pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl.

#### 4.2. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> Mikropartikülleri ile Tetrasiklin Aptamerinin Bağlanması

GLYMO ile türevlendirilen manyetik silika mikropartikülleri EDA ile reaksiyona sokularak -NH<sub>2</sub> ucuna sahip mikropartiküller elde edilmiştir (Şekil 4.2).

NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş tetrasiklin aptameri ile mikropartikülleri birbirine bağlamak için 5 karbonlu bir zincirin her iki ucunda bir aldehit kalıntısı içeren homobifonksiyonel bir çapraz bağlayıcı olan gluteraldehit kullanılmıştır. Gluteraldehitin birincil reaktivitesi amin gruplarına yönelmesidir [97].



Şekil 4.2. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikül bağlı -NH<sub>2</sub>-modifiye tetrasiklin aptameri tabanlı aptasensörün sentez protokolü

### 4.3. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerinin ve Aptamer Bağlı GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> Mikropartiküllerinin Karakterizasyonu

#### 4.3.1. Brunauer-Emmett-Teller (BET) ile Gözenek Boyutu ve Yüzey Alanı Ölçümü

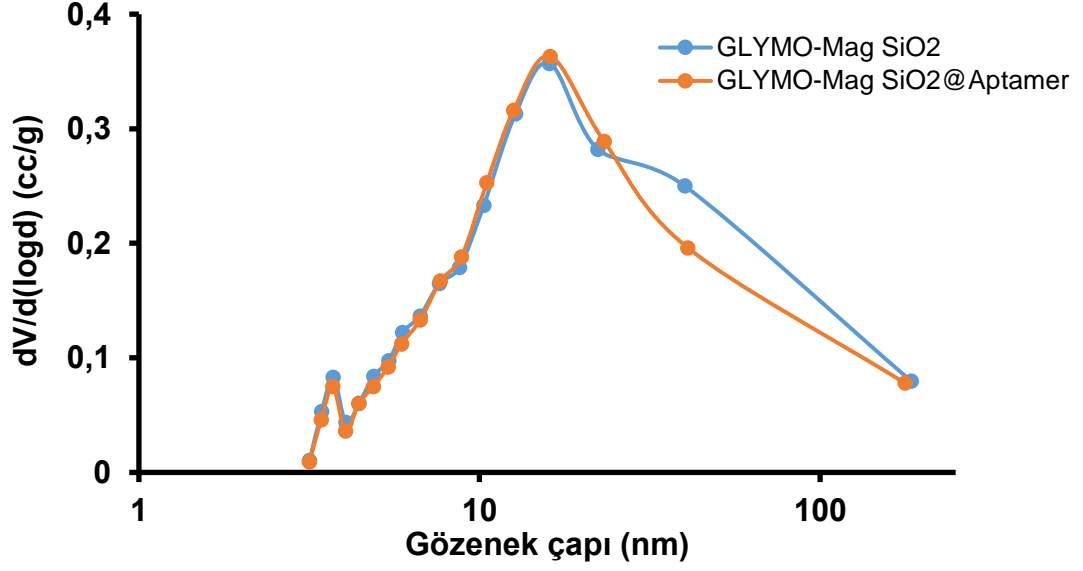
GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikrokürelerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi ve gözeneklilik özellikleri sırasıyla Şekil 4.3 ve Çizelge 4.1. verilmiştir.

Sentezlenen GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinde hem mezo-gözenek hem de makro-gözenek yapısının varlığı birlikte görülmektedir (Şekil 4.3).

Manyetik partiküllerin yapısında bulunan dış kabuk, biyomoleküllerin bağlanması veya adsorpsiyonu için kimyasal olarak aktive edilmektedir. Manyetik partiküllerin fonksiyonelleştirilmesi için kullanılan gluteraldehit çapraz bağlayıcısı aptamerin partikülün aktif yüzeyine kovalent olarak bağlanmasını sağlamaktadır. Yapılan



analizler sonucunda ise tetrasiklin aptamerinin GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülünde makro-gözeneklere girerek bağlandığını göstermektedir.



Şekil 4.3. Azot adsorpsiyon-desorpsiyon yöntemi ile elde edilen GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikropartiküllerinin gözenek boyutu dağılım eğrisi

Çizelge 4.1. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikropartiküllerinin yüzey ve gözenek özellikleri

Mikropartikül	Ortalama Gözenek Boyutu (nm)	Gözenek Hacmi (cm <sup>3</sup> /g)	Özgül Yüzey Alanı (m <sup>2</sup> /g)
GLYMO-MagSiO <sub>2</sub>	20,27	0,323	93,036
GLYMO-MagSiO <sub>2</sub> @Aptamer	19,94	0,309	92,495

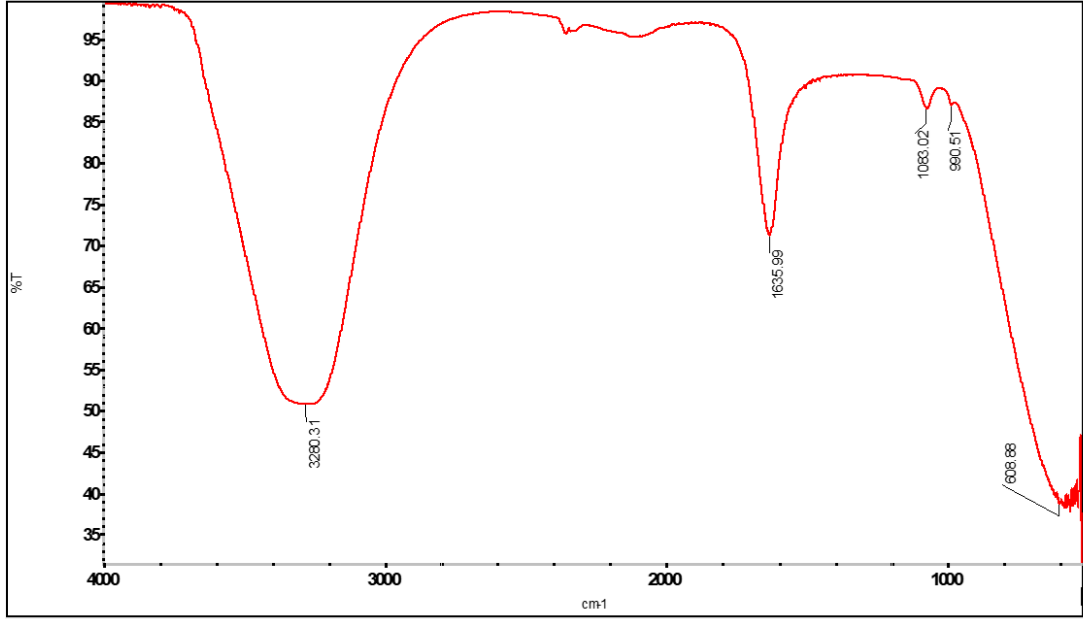
### **4.3.2. Aptamer Moleküllerinin, GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> ve GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer Mikropartiküllerinin Fourier Dönüşümlü Kızılötesi Spektroskopisi (FTIR) Analizi**

Aptamer moleküllerinin FTIR spektrumunda 3280,31 cm<sup>-1</sup>'deki pik; NH gerilmesine, 1635,99 cm<sup>-1</sup>'deki pik; C=C etkileşimine, 1083,02 cm<sup>-1</sup>'deki pik; CH gerilmesine aittir. 1000 cm<sup>-1</sup>'deki pikler ise parmak izi bölgesine aittir (Şekil 4.4).

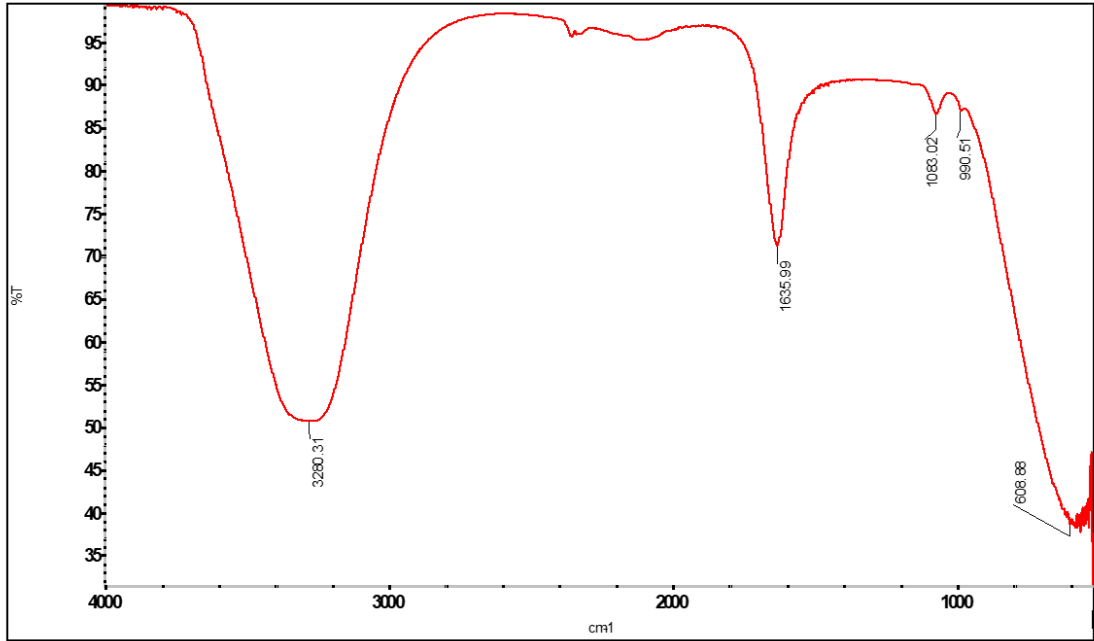
GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin FTIR spektrumunda 3262,39 cm<sup>-1</sup>'deki pik; NH gerilmesine, 2944,22 cm<sup>-1</sup>'deki pik; CH gerilmesine, 2863,97 cm<sup>-1</sup>'deki pik; C=C gerilmesine, 1635,23 cm<sup>-1</sup>'deki pik; C-O gerilmesine, 1058,35 cm<sup>-1</sup>'deki pik; CH etkileşimine aittir. 1000 cm<sup>-1</sup>'deki pikler ise parmak izi bölgesine aittir (Şekil 4.5).

GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikropartiküllerinin FTIR spektrumunda 2874,39 cm<sup>-1</sup>'deki pik; NH gerilmesine, 2360,91 cm<sup>-1</sup>'deki pik; CH gerilmesine, 2360,91 cm<sup>-1</sup>'deki pik; C=C gerilmesine, 1653,17 cm<sup>-1</sup>'deki pik; C-O gerilmesine, 1058,21 cm<sup>-1</sup>'deki pik; CH etkileşimine aittir (Şekil 4.6).

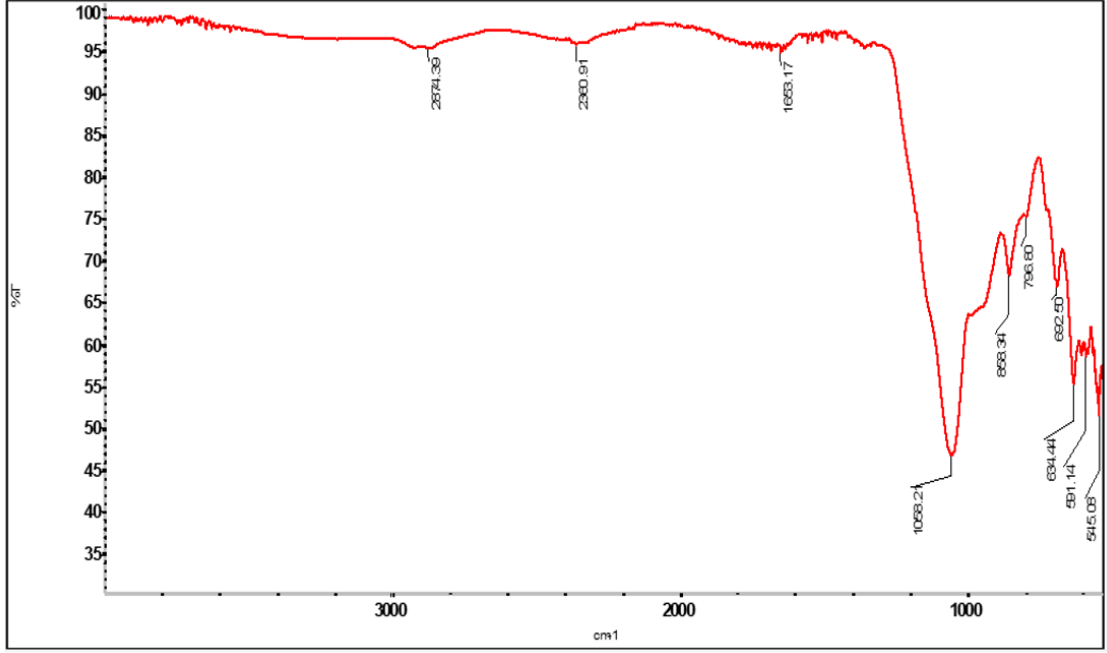
Şekil 4.6'deki GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikropartiküllerinin FTIR spektrumunda NH gerilmesine ait pik değerinin azalmasının nedeni glutraldehit çapraz bağlayıcısının GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülünün ve aptamer molekülünün amin uçlarına tutunarak partikülü ve aptameri birbirine bağlamasıdır. CH gerilmesine, C=C gerilmesine, C-O gerilmesine, CH etkileşimine ait pik değerlerinin değişmesi ise partikül ve aptamer birbirine bağlanırken oluşan ya da kırılan bağlardan kaynaklanmaktadır.



Şekil 4.4. Aptamer moleküllerinin FTIR spektrumları



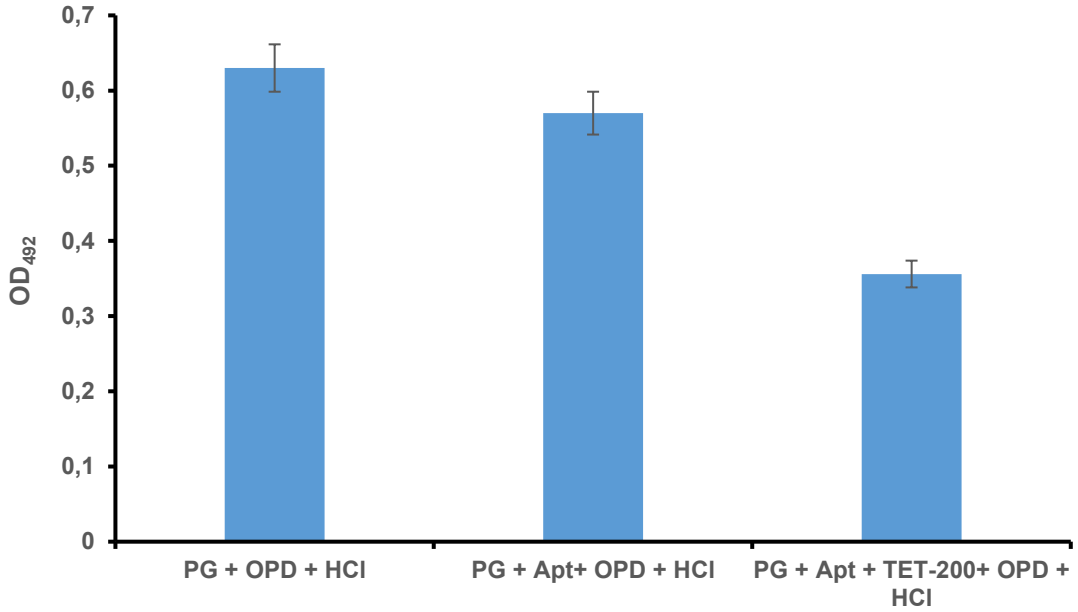
Şekil 4.5. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküllerinin FTIR spektrumları



Şekil 4.6. GLYMO-MagSiO<sub>2</sub>@Aptamer mikropartiküllerinin FTIR spektrumları

#### 4.4. Aptamer Bağlanan Mikropartikül ile Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayini

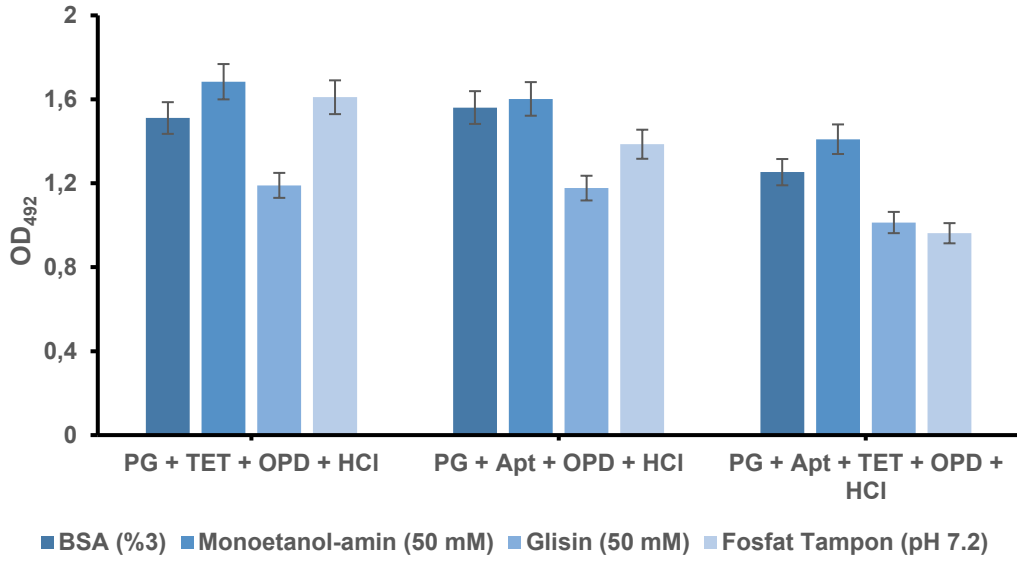
Aptamer ile mikropartikül birbirine bağlandıktan sonra, sulu ortamda bulunan tetrasiklini tayin etmek için OPD ile reaksiyona girmiştir. OPD ile olan reaksiyondan sonra 3M HCl eklenerek plaka okuyucuda OD=492 nm'de spektrofotometrik olarak okunmasının sonucunda; tetrasiklin varlığında absorbans değerinin azaldığı gözlemlenmiştir (Şekil 4.7). Bu tez kapsamında, peroksidaz benzeri aktivite gösteren mikropartiküllere bağlı aptamer ile ortamdaki tetrasiklin tayin edilmiştir.



Şekil 4.7. Mikropartikül bağı aptamer tabanlı aptasensör ile sulu çözelti içerisindeki tetrasiklin tayinine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M f fosfat tampon çözeltisi pH 7,0, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l.

#### 4.5. Aptamer Bağlanan Mikropartiküllerin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayininde Reaksiyon Tampon Çözeltisinin Belirlenmesi

Tetrasiklin tayin deneylerinde aptamer-mikropartikül reaksiyon çözeltisine %3 BSA, 50 mM monoetanol-amin, 50 mM Glisin ile bloklama yapılmıştır. Fosfat tampon kullanılarak negatif kontrol yapılmıştır. Plaka okuyucuda OD=492nm' de alınan ölçümlere bakıldığında; bütün reaksiyon koşullarında tetrasiklin varlığında absorbans değerinin azaldığı görülmüştür. Fosfat tampon kullanılarak yapılan tetrasiklin tayininde alınan  $\Delta A$  değeri; bloklama yapılan yapılan tetrasiklin tayininde alınan  $\Delta A$  değerinden fazla olduğunu gözlemlenmiştir. Bu nedenle, ileriki çalışmalarda herhangi bir bloklama işlemi yapılmamıştır (Şekil 4.8).

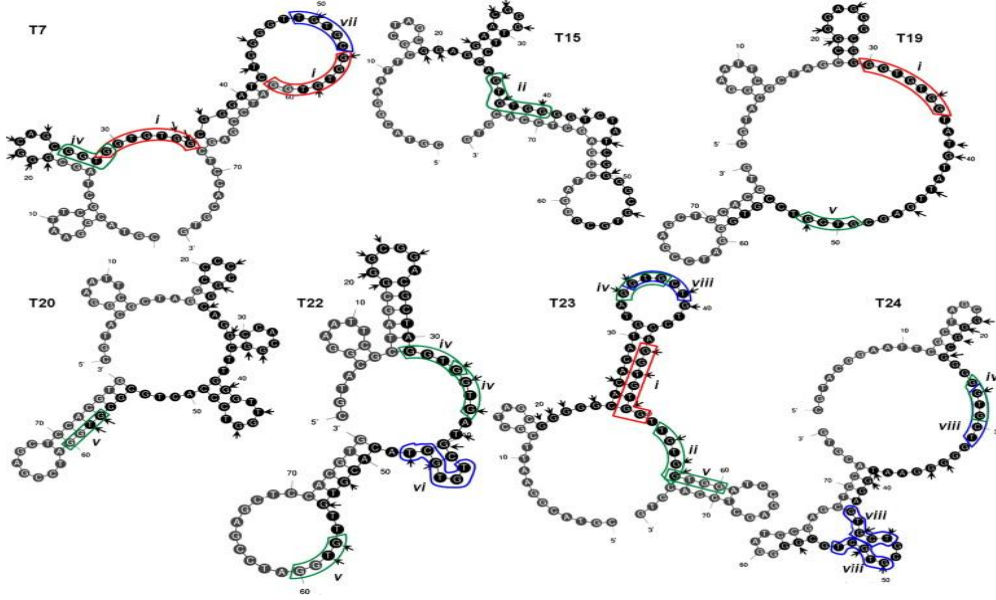


Şekil 4.8. Farklı tampon çözeltilere sahip reaksiyon ortamlarında tetrasiklin tayinine yönelik OD=492 nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl.

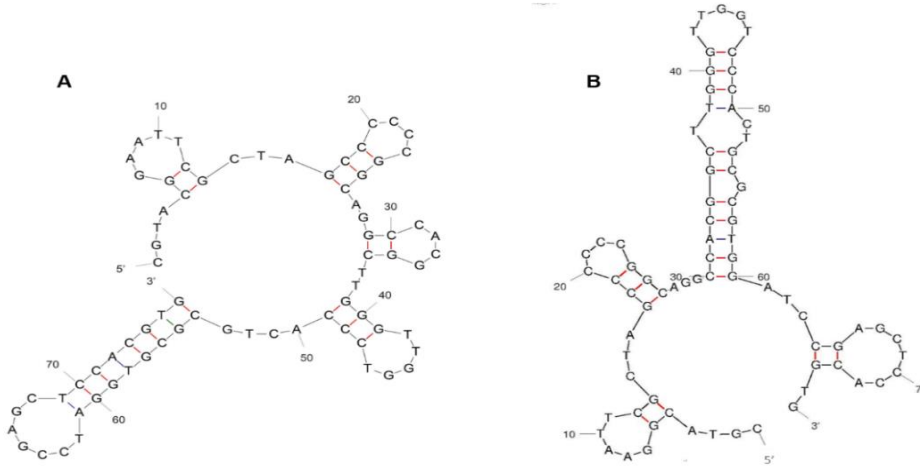
#### 4.6. Değişen Ortam Tuz İyon Değerlerinin Tetrasiklin Aptamerinin Katlanmasına Etkisi

Çözeltilerin içerisinde bulunan iyonlar aptamerin katlama şekline etki etmektedir. Bu tez çalışmasında kullanılan aptamer, Şekil 4.9'de görülen T20 tetrasiklin aptameri ile aynıdır [38]. Mfold adlı program yardımıyla bu tez çalışmasında kullanılan tetrasiklin aptamerinin katlanma şekli, kullanılan 2 farklı çözelti ortamında *in silico* olarak modellenmiştir. Aptameri seyreltmek için kullanılan farklı tuzlu çözeltilerin aptamerin katlanmasını etkilediğini gösteren Şekil 4.10.-A ve -B bu program yardımı ile çizilmiştir. T20 aptameri ile bu çalışmada 100 mM NaCl çözeltisi ile seyreltilen aptamerin aynı yapıya sahip olduğu görülmektedir. Yapılan deneyler sonucunda bütün reaksiyon koşullarında tetrasiklin varlığında plaka okuyucuda OD=492nm' de absorbans değerlerinin azaldığı görülmüştür

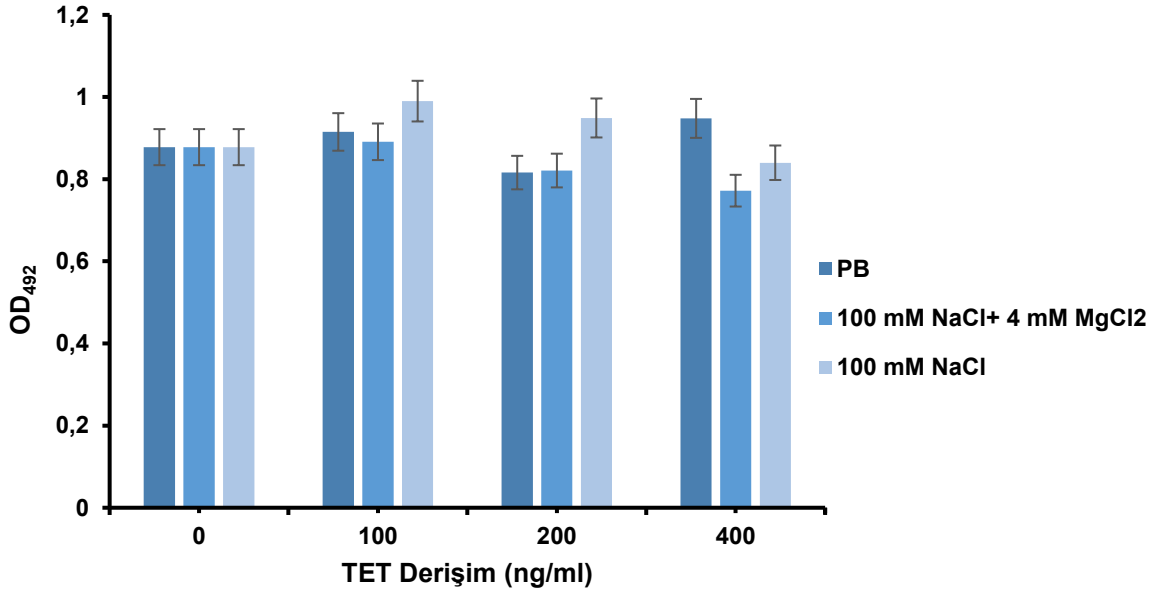
fakat en fazla  $\Delta A$  değeri 100 mM NaCl çözeltisi ile elde edilmiştir. Bu sonuçların doğrultusunda ileriki deneylerde aptameri seyreltmek için 100 mM NaCl çözeltisi kullanılmıştır. (Şekil 4.11).



Şekil 4.9. TET aptamerlerinin katlanma şekilleri [38]



Şekil 4.10. A) Tez çalışmasında kullanılan TET-aptamer dizinin mfold programı yardımıyla 100 mM NaCl tuzlu çözeltisi içerisindeki katlanma şekli; B) Tez çalışmasında kullanılan TET-aptamer dizinin mfold programı yardımıyla 100 mM NaCl + 4 mM MgCl<sub>2</sub> tuzlu çözeltisi içerisindeki katlanma şekli



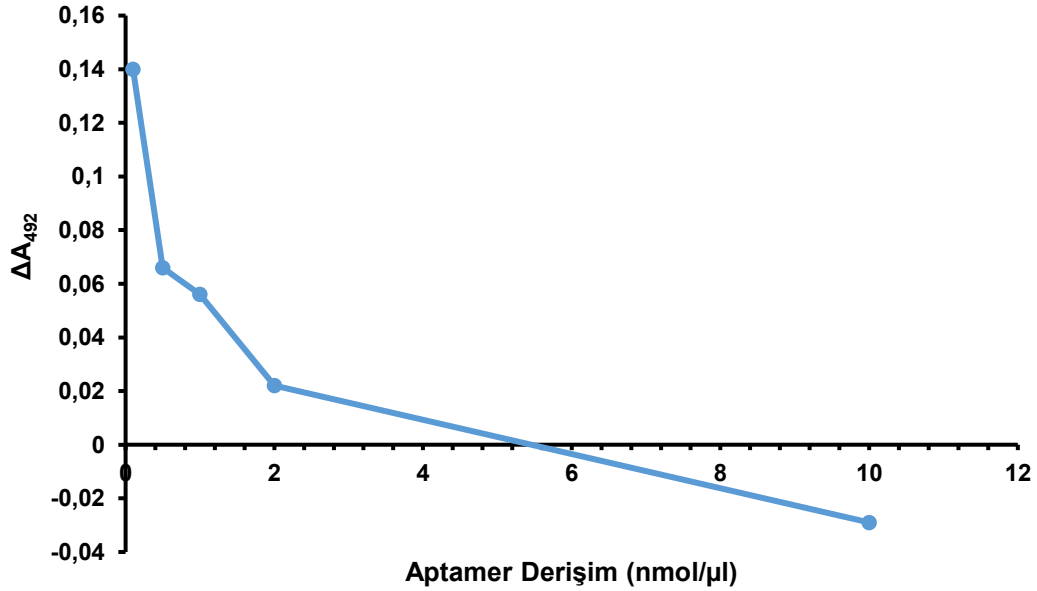
Şekil 4.11. Farklı iyonlara ve iyon derişimlerine sahip çözeltilerin aptamerin katlanmasına etkisinin tayinine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0 HCl reaksiyon hacmi: 15 µl

#### 4.7. Aptamer Derişiminin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayinine Etkisi

2013 yılında Kwon ve arkadaşları yaptıkları çalışmada 0,5 µM aptamer kullanarak geliştirdikleri AuNP tabanlı kolorimetrik yöntem ile tetrasiklini tayin etmişlerdir [99]. Bu tez kapsamında, tetrasikline özgü aptamer mikropartiküller ile etkileştirilmeden önce, 100 mM NaCl-PB ile 10-2-1-0,5-0,1 nmol/µl olacak şekilde seyreltilmiştir. Farklı derişimlerde aptamer kullanımının tetrasiklin tayinine etkisi Şekil 4.12'de verilmiştir. Plaka okuyucuda OD=492nm' de alınan ölçümlere bakıldığında; bütün reaksiyon koşullarında tetrasiklin varlığında absorbans değerinin azaldığı görülmüştür. Aptamer derişimi azaldıkça, elde edilen ΔA değerinin arttığı gözlenmiştir. ΔA farkı en fazla 0,1 nmol/µl aptamer kullanılarak



elde edilmiştir. Sonuçlar, aptamer konsantrasyonlarının daha düşük olmasıyla hassasiyetin arttığını göstermiştir.



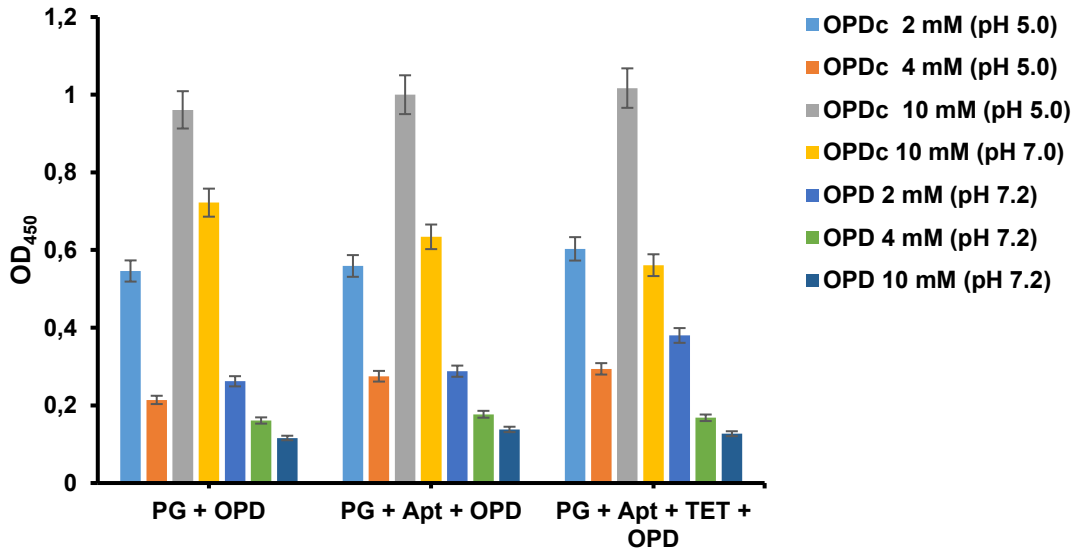
Şekil 4.12. Değişen aptamer derişiminin tetrasiklin tayinine etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0 HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l.

#### 4.8. Değişen Substrat Derişimi ve Ortam pH Değerleri için Aptamer Bağlı Mikropartiküllerin Peroksidaz Benzeri Aktivite Özelliği ile Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayini

OPD (o-Fenilendiamin) kromojenik bir kimyasal olarak ELISA prosedürlerinde peroksidaz aktivitesi gösteren substrat konjugatları tayin etmek için yaygın olarak kullanılmaktadır. OPD hidrojen peroksit varlığında oksitlendiğinde ayırt edilebilir bir renk değişikliği sergilemektedir. OPD 2,3-diaminofenazin'e (DAP) dönüşerek turuncu renkli bir ürün oluşturmaktadır. Peroksidaz benzeri aktivite gösteren mikropartiküller OPD ile reaksiyona girdiğinde turuncu renkte bir ürün ortaya

çıkılmaktadır. Ortamda OPD olmadığında ise sarı renkte bir ürün ortaya çıkmaktadır [100].

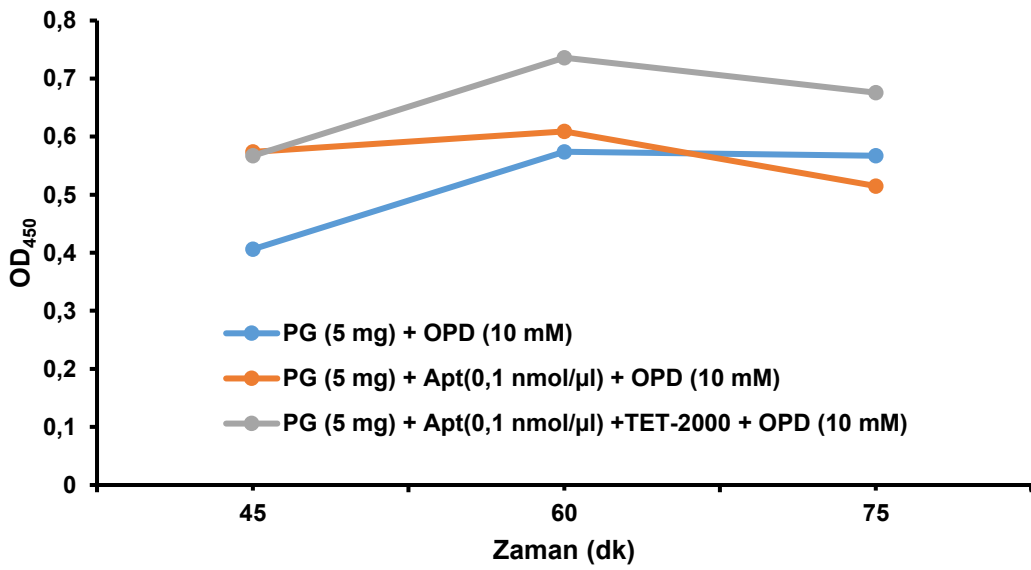
Literatürde genel olarak OPD'nin çözülmesi için kullanılan iki farklı tampon çözelti bulunmaktadır. Bu çözeltiler; fosfat tampon çözeltisi ve fosfat sitrat çözeltisidir. Asidik ortamda, OPD'deki amino grupları protonlanabilir. Tampon çözelti olarak pH'ı 8'den fazla olursa, ortamda bulunan H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bozunmaya uğrayarak floresan yoğunluğun azalmasına neden olmaktadır [98]. Bu nedenle tampon çözeltilerin pH değerleri ve derişimleri optimize edilmiştir (Şekil 4.13). Optimize edilmiş OPD solüsyonu; OPD (1,08 mg); 0,1 M, pH 7,0 fosfat sitrat çözeltisi (1 ml) ve H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,57 µl) kullanılarak hazırlanmıştır. Maksimum ΔA değeri, pH değeri 7 olan fosfat sitrat tampon çözelti ile hazırlanmış 10 mM OPD solüsyonu kullanıldığında elde edilmiştir.



Şekil 4.13. Farklı OPD tampon çözeltisine, derişimine ve pH değerlerine sahip reaksiyon ortamlarında tetrasiklin tayinine yönelik OD=450nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, Fosfat tampon çözeltisi ile hazırlanan OPD çözeltisi OPD olarak adlandırılmıştır. Fosfat sitrat tampon çözeltisi ile hazırlanan OPD çözeltisi OPDc olarak adlandırılmıştır.

#### 4.9. OPD Reaksiyon Süresinin Tetrasiklinin Kolorimetrik Tayinine Etkisi

OPD reaksiyon çözeltisi ve belirlenen çözeltinin derişim ve pH koşulları optimize edildikten sonra OPD'nin reaksiyon süresi belirlenmiştir. Maksimum  $\Delta A$  değerine  $t=60$  dk'da ulaşılmış olduğundan bundan sonraki deneyler de OPD reaksiyon süresi  $t=60$  dk olarak belirlenmiştir (Şekil 4.14).

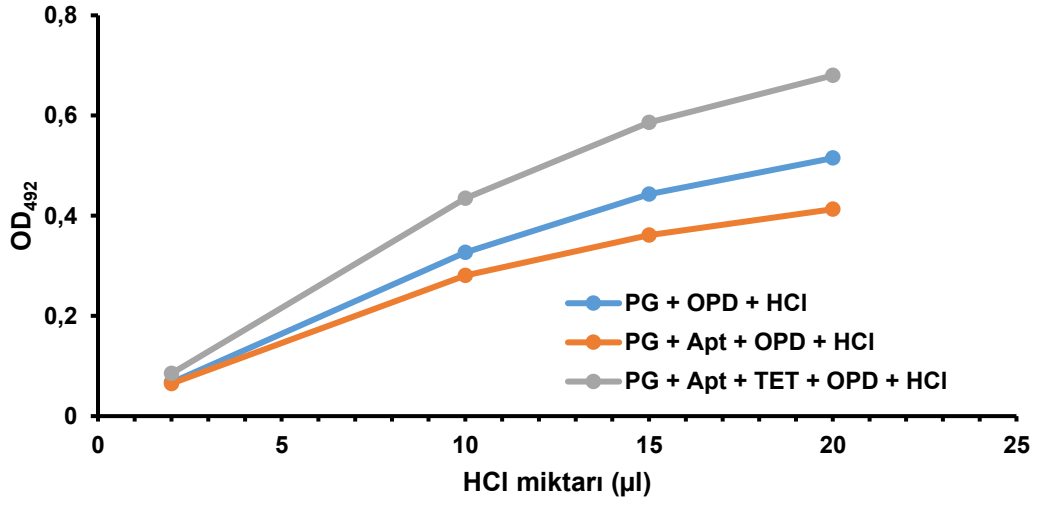


Şekil 4.14. Değişen OPD reaksiyon süresinin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik  $OD=450$  nm'deki absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0.

#### 4.10. HCl Miktarının ve Reaksiyon Süresinin $\Delta A$ Değerine Etkisi

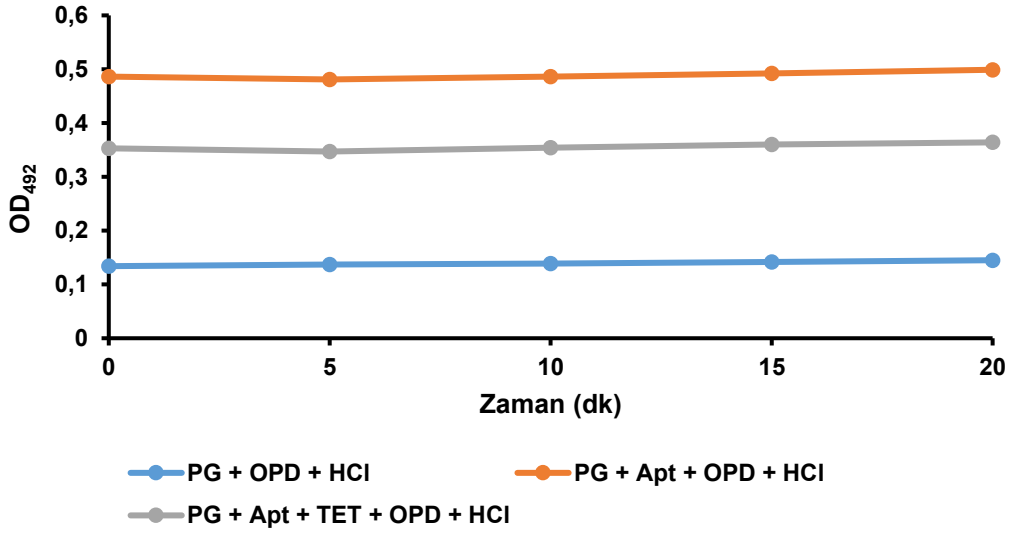
Reaksiyon tamamlandıktan sonra ( $t=60$  dk sonra) ortama OPD'nin reaksiyonunu durdurmak amacıyla 2-10-15-20 µL olmak üzere farklı miktarlarda 3 M HCl çözeltisi ilave edilmiştir ve plaka okuyucuda  $OD=492$ nm'de okunan absorbans

değerlerine göre ortama eklenen HCl çözeltisi ilavesinin absorbands değerlerini arttırdığı görülmüştür. HCl miktarı arttıkça absorbands değeri artmasına rağmen  $\Delta A$  değeri azaldığı için deneylere 15  $\mu$ l HCl eklenilerek devam edilmiştir (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Değişen HCl hacminin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbands değerleri; mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0.

3 M, 15  $\mu$ L HCl eklendikten sonra reaksiyon süresinin elde edilen absorbands değerlerine olan etkisini ölçmek amacıyla zaman taraması yapılmış ve t=0-5-10-15-20 dk'larda alınan ölçüm sonuçlarına göre HCl'in reaksiyonun üzerinde bir etkisinin olmadığı ortaya konulmuştur (Şekil 4.16).



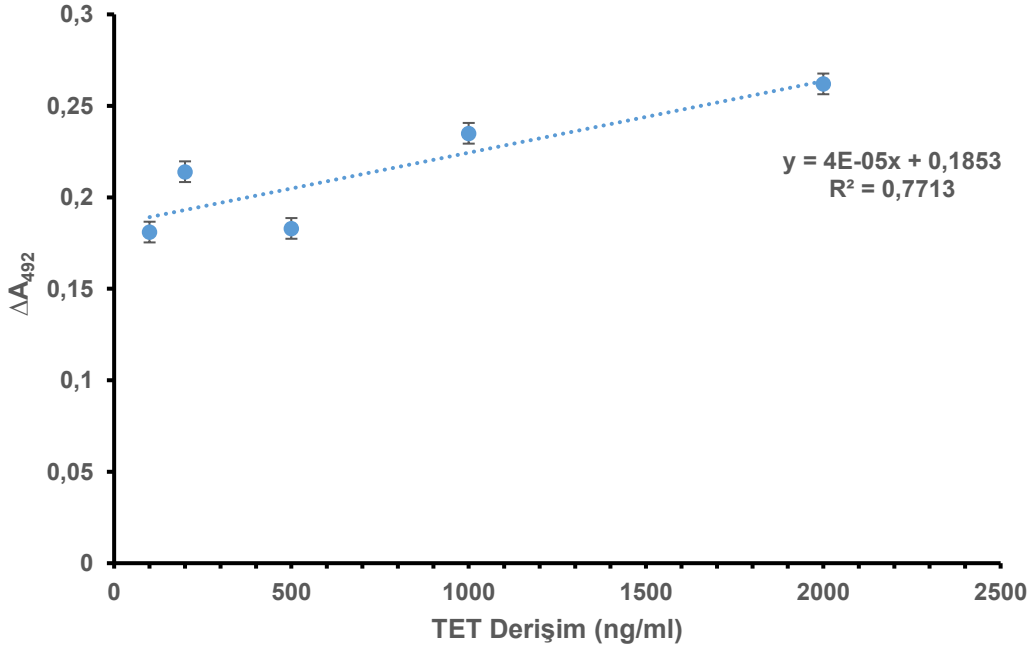
Şekil 4.16. Değişen HCl reaksiyon süresinin tetrasiklin tayinine olan etkisinin incelenmesine yönelik OD=492nm'deki absorbans değerleri, mikropartikül miktarı: 5 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/ $\mu$ l, tetrasiklin derişimi: 200 ng/ml, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15  $\mu$ l.

#### 4.11. Tampon Ortamında Farklı Derişimlerde Tetrasiklin Tayini

Aptamer konsantrasyonu, OPD tampon çözeltisi ve belirlenen çözeltinin derişim ve pH değeri; OPD reaksiyon süresi, HCl miktarı ve reaksiyon süresi gibi koşullar optimize edildikten sonra geliştirilen aptasensörün hassasiyetini belirlemek amacıyla tetrasiklin derişiminin taraması yapılmıştır. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre tetrasiklin derişimi arttıkça,  $\Delta A$  değerinin de lineer olarak arttığı sonucuna varılmıştır (Şekil 4.17).

2012 yılında Jeong ve arkadaşları geliştirdikleri rekabetçi enzim bağı aptamer testi (ELAA) ile tespit edilebilen tetrasiklin derişiminin alt limit değerini LOD= 21 nM olarak bildirmişlerdir [101]. Avrupa Birliği'nde izin verilen sütte bulunan tetrasiklinin maksimum kalıntı limitini (MRL) 225 nM (200 ng/ml), Çin ise 100  $\mu$ g/kg olarak belirlemiştir. 2015 yılında Lou ve arkadaşlarının bu kapsamda

geliştirdikleri aptamer-bağlı AuNP tabanlı kolorimetrik biyosensör ile 0,2-2,0 µg/mL aralığındaki tetrasiklin miktarı tayin edilmiştir [20]. Tez kapsamında geliştirilen aptasensörün tayin edebildiği tetrasiklin derişiminin alt limit değeri ise LOD=100 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Tetrasiklin tayini için enzime dayalı olmayan, yüksek hassasiyetli, AuNP gibi pahalı partiküller kullanılmadan, karmaşık ön numune işlemleri olmayan, manyetik partikülün peroksidaz benzeri aktive göstermesi özelliğinden yararlanarak aptamer tabanlı kolorimetrik bir biyosensör geliştirilmiştir.



Şekil 4.17. Değişen tetrasiklin derişimlerinde OD=492nm'deki  $\Delta$ absorbans değerleri; mikropartikül miktarı: 10 mg, aptamer derişimi: 0,1 nmol/µl, OPD derişimi: 10 mM, OPD tampon çözeltisi: 0,1 M fosfat sitrat tampon çözeltisi pH 7,0, HCl reaksiyon hacmi: 15 µl.

## 5. SONUÇLAR

- Peroksidaz benzeri aktivite gösteren GLYMO- ve APTES-bağlı MagSiO<sub>2</sub> mikropartikülleri sentezlenmiştir. OPD ile mikropartiküllerin peroksidaz benzeri aktivitesi ölçülmüştür. Tez kapsamında hedeflenen biyosensör için GLYMO-bağlı MagSiO<sub>2</sub> mikropartiküller kullanılmıştır.
- Tampon ortamında bulunan iyonlar tetrasiklin aptamerinin katlanmasını etkilemektedir. Farklı tuzlu çözeltiler kullanılarak tetrasikline özgü -NH<sub>2</sub> ile modifiye edilmiş aptamerin katlanma şekilleri mfold adlı program ile modellenmiştir. Kullanılan tetrasiklin aptamer dizininin doğru katlanma şekli, 100 mM NaCl sulu çözeltisinde elde edilmiştir. Aptameri seyreltmek için 100 mM NaCl-PB kullanılan deneylerde, diğer tuzlu çözeltilerin kullanıldığı deneylere oranla daha fazla  $\Delta A$  değeri elde edilmiştir.
- Aptamer derişiminin tetrasiklinin kolorimetrik tayinine olan etkisi araştırılmış, 0,1 nmol/ $\mu$ l aptamer kullanılarak yapılan deneylerde daha fazla  $\Delta A$  değeri elde edilmiştir.
- Geliştirilen aptasensörün kolorimetrik olarak ölçümünü sağlamak için kullanılan OPD'nin derişimi, tampon çözeltisi ve reaksiyon süresi optimize edilmiştir. 0,1 M fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) ile hazırlanan 10 mM OPD çözeltisinin aptasensör ile t=60 dk boyunca olan reaksiyonundan daha fazla  $\Delta A$  değeri elde edilmiştir.
- Avrupa Birliği'nde izin verilen sütte bulunan tetrasiklinin maksimum kalıntı limitini (MRL) 225 nM (200 ng/ml), Çin ise 100  $\mu$ g/kg olarak belirlemiştir. Geliştirilen kolorimetrik aptasensörün tayin edebildiği tetrasiklin derişiminin alt limit değeri ise LOD=100 ng/ml olarak tespit edilmiştir. Farklı yöntemlerle kullanılarak geliştirilen aptasensörlerin ve tez kapsamında geliştirilen aptasensörün tayin edebildiği tetrasiklin derişiminin alt limit değeri Çizelge 5.1' de karşılaştırılmıştır.
- Sonuç olarak, manyetik mikropartiküller ile aptamer kullanılarak sıvı ortamda tetrasiklini tayin edebilen bir biyosensör geliştirilmiştir. Geliştirilen

biyosensörde bulunan manyetik mikropartiküllerin peroksidaz benzeri özelliği sayesinde enzim kullanılmadan, yüksek hassasiyet ve düşük maliyetle tetrasiklin tayini mümkün olabilecektir.

Çizelge 5.1. Aptasensörlerin tayin edebildiği tetrasiklin derişiminin alt limit değerlerinin karşılaştırılması

Yöntem	Uygulama	LOD	Ref
<b>CS-AuNP bazlı aptasensör</b>	Süt	39 ng/ml	[20]
<b>ELAA</b>	Süt; Tampon Çözelti	45,7 µg/ml; 15,7 µg/ml	[101]
<b>AuNP bazlı kolorimetrik aptasensör</b>	Süt	55 ng/ml	[102]
<b>Elektrokimyasal aptasensör</b>	Süt	1.0 ng/ml	[103]
<b>Aptamer bazlı manyetik katı faz ekstraksiyonu ile HPLC</b>	Süt; Su	2.5 ng/ml	[90]
<b>Aptamer bazlı peroksidaz benzeri manyetik mikropartikül</b>	Tampon Çözelti	100 ng/ml	Bu Çalışma



## KAYNAKLAR

- [1] Kapoor, G., S. Saigal, and A. Elongavan, Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J Anaesthesiol Clin Pharmacol*, **2017**. 33(3): p. 300-305.
- [2] Chopra, I. and M. Roberts, Tetracycline antibiotics: Mode of action, applications, molecular biology, and epidemiology of bacterial resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **2001**. 65(2): p. 232-+.
- [3] Daghrrir, R. and P. Drogui, Tetracycline antibiotics in the environment: a review. *Environmental Chemistry Letters*, **2013**. 11(3): p. 209-227.
- [4] Lan, L.Y., et al., Recent advances in nanomaterial-based biosensors for antibiotics detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **2017**. 91: p. 504-514.
- [5] Zhou, Y., et al., Detection and removal of antibiotic tetracycline in water with a highly stable luminescent MOF. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2018**. 262: p. 137-143.
- [6] Gupta, S., et al., Chemically Modified DNA Aptamers Bind Interleukin-6 with High Affinity and Inhibit Signaling by Blocking Its Interaction with Interleukin-6 Receptor. *Journal of Biological Chemistry*, **2014**. 289(12): p. 8706-8719.
- [7] Singh, R., L. Sripada, and R. Singh, Side effects of antibiotics during bacterial infection: Mitochondria, the main target in host cell. *Mitochondrion*, **2014**. 16: p. 50-54.
- [8] Gonzalez-Pleiter, M., et al., Toxicity of five antibiotics and their mixtures towards photosynthetic aquatic organisms: Implications for environmental risk assessment. *Water Research*, **2013**. 47(6): p. 2050-2064.
- [9] Choi, J.H. and K.S. Ryu, Responses of Broilers to Dietary Zinc Bacitracin at 2 Different Planes of Nutrition. *British Poultry Science*, **1987**. 28(1): p. 113-118.
- [10] Bertini, S., S. Feirrerro, and P. Berny, A new improved high performance thin layer chromatography (HPTLC) method for the detection of ionophore antibiotics in feeds and animal tissues. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, **2003**. 26(1): p. 147-156.
- [11] Fischer, L.J., et al., Sulfamethazine and Its Metabolites in Pork - Effects of Cooking and Gastrointestinal Absorption of Residues. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **1992**. 40(9): p. 1677-1682.

- [12] Nelson, M.L., et al., Inhibition of the Tetracycline Efflux Antiport Protein by 13-Thio-Substituted 5-Hydroxy-6-Deoxytetracyclines. *Journal of Medicinal Chemistry*, **1993**. 36(3): p. 370-377.
- [13] Lv, J.M., et al., Removal and removing mechanism of tetracycline residue from aqueous solution by using Cu-13X. *Chemical Engineering Journal*, **2015**. 273: p. 247-253.
- [14]. Brodersen, D.E., et al., The structural basis for the action of the antibiotics tetracycline, pactamycin, and hygromycin B on the 30S ribosomal subunit. *Cell*, **2000**. 103(7): p. 1143-1154.
- [15] He, L., et al., Colorimetric Sensing of Tetracyclines in Milk Based on the Assembly of Cationic Conjugated Polymer-Aggregated Gold Nanoparticles. *Food Analytical Methods*, **2013**. 6(6): p. 1704-1711.
- [16] Mandell, Douglas and Bennetts Principles and Practice of Infectious-Diseases - Mandell,GI, Bennett,Je, Dolin,R. *Public Health*, **1995**. 109(3): p. 213-214.
- [17] Fritz, J.W. and Y.G. Zuo, Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, **2007**. 105(3): p. 1297-1301.
- [18] Kamel, A.M., et al., Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, **2002**. 13(5): p. 543-557.
- [19] Granados-Chinchilla, F. and C. Rodriguez, Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: From Regulation to Analytical Methods, Bacterial Resistance, and Environmental and Health Implications. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, **2017**.
- [20] Luo, Y.L., et al., A novel colorimetric aptasensor using cysteamine-stabilized gold nanoparticles as probe for rapid and specific detection of tetracycline in raw milk. *Food Control*, **2015**. 54: p. 7-15.
- [21] Zhou, Q., et al., Analysis of tetracyclines in chicken tissues and dung using LC-MS coupled with ultrasound-assisted enzymatic hydrolysis. *Food Control*, **2014**. 46: p. 324-331.
- [22] Li, J.T., et al., Determination of tetracyclines residues in honey by on-line solid-phase extraction high-performance liquid chromatography. *Talanta*, **2008**. 75(5): p. 1245-1252.
- [23] Weng, N.D., et al., Assay and purity control of tetracycline, chlortetracycline and oxytetracycline in animal feeds and premixes by TLC

- densitometry with fluorescence detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2003**. 33(1): p. 85-93.
- [24] Kowalski, P., Capillary electrophoretic method for the simultaneous determination of tetracycline residues in fish samples. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2008**. 47(3): p. 487-493.
- [25] Tong, J., et al., Simultaneous determination of five tetracycline and macrolide antibiotics in feeds using HPCE. *Journal of Separation Science*, **2009**. 32(23-24): p. 4254-4260.
- [26] Liu, X.G., et al., Recent advances in sensors for tetracycline antibiotics and their applications. *Trac-Trends in Analytical Chemistry*, **2018**. 109: p. 260-274.
- [27] Ramezani, M., et al., A novel colorimetric triple-helix molecular switch aptasensor for ultrasensitive detection of tetracycline. *Biosensors & Bioelectronics*, **2015**. 70: p. 181-187.
- [28] Tan, B., et al., A versatile fluorescent biosensor based on target-responsive graphene oxide hydrogel for antibiotic detection. *Biosensors & Bioelectronics*, **2016**. 83: p. 267-273.
- [29] Wang, Y.L., et al., A colorimetric biosensor using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles for highly sensitive and selective detection of tetracyclines. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2016**. 236: p. 621-626.
- [30] Song, E.Q., et al., Multi-color quantum dot-based fluorescence immunoassay array for simultaneous visual detection of multiple antibiotic residues in milk. *Biosensors & Bioelectronics*, **2015**. 72: p. 320-325.
- [31] Feng, Y.J., et al., Carbon dots derived from rose flowers for tetracycline sensing. *Talanta*, **2015**. 140: p. 128-133.
- [32] Proske, D., et al., Aptamers - basic research, drug development, and clinical applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **2005**. 69(4): p. 367-374.
- [33] Feigon, J., T. Dieckmann, and F.W. Smith, Aptamer structures from A to zeta. *Chemistry & Biology*, **1996**. 3(8): p. 611-617.
- [34] Forster, U., et al., Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer. *Nucleic Acids Research*, **2012**. 40(4): p. 1807-1817.
- [35] Parashar, A., Aptamers in Therapeutics. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, **2016**. 10(6): p. Be1-Be6.

- [36] Zhuo, Z.J., et al., Recent Advances in SELEX Technology and Aptamer Applications in Biomedicine. *International Journal of Molecular Sciences*, **2017**. 18(10).
- [37] Niazi, J.H., et al., ssDNA aptamers that selectively bind oxytetracycline. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**. 16(3): p. 1254-1261.
- [38] Niazi, J.H., S.J. Lee, and M.B. Gu, Single-stranded DNA aptamers specific for antibiotics tetracyclines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2008**. 16(15): p. 7245-7253.
- [39] Kim, Y.J., et al., Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. *Bioprocess Biosyst Eng*, **2010**. 33(1): p. 31-7.
- [40] Alawad, A., et al., A reagentless aptasensor based on intrinsic aptamer redox activity for the detection of tetracycline in water. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2019**. 288: p. 141-146.
- [41] Zhou, L., et al., Electrochemical aptasensor for the detection of tetracycline with multi-walled carbon nanotubes amplification. *Sensors and Actuators B-Chemical*, **2012**. 162(1): p. 201-208.
- [42] Wang, S., et al., A direct competitive assay-based aptasensor for sensitive determination of tetracycline residue in Honey. *Talanta*, **2015**. 131: p. 562-569.
- [43] Hamula, C.L.A., et al., Selection of aptamers against live bacterial cells. *Analytical Chemistry*, **2008**. 80(20): p. 7812-7819.
- [44] Catuogno, S. and C.L. Esposito, Aptamer Cell-Based Selection: Overview and Advances. *Biomedicines*, **2017**. 5(3).
- [45] Chen, A.L. and S.M. Yang, Replacing antibodies with aptamers in lateral flow immunoassay. *Biosensors & Bioelectronics*, **2015**. 71: p. 230-242.
- [46] Zhu, G.Z., G. Niu, and X.Y. Chen, Aptamer-Drug Conjugates. *Bioconjugate Chemistry*, **2015**. 26(11): p. 2186-2197.
- [47] Ni, S.J., et al., Chemical Modifications of Nucleic Acid Aptamers for Therapeutic Purposes. *International Journal of Molecular Sciences*, **2017**. 18(8).
- [48] Seliger, H., et al., Oligonucleotide Analogs with Terminal 3'-3'-Internucleotidic and 5'-5'-Internucleotidic Linkages as Antisense Inhibitors of Viral Gene-Expression. *Nucleosides & Nucleotides*, **1991**. 10(1-3): p. 469-477.

- [49] Shum, K.T. and J.A. Tanner, Differential Inhibitory Activities and Stabilisation of DNA Aptamers against the SARS Coronavirus Helicase. *Chembiochem*, **2008**. 9(18): p. 3037-3045.
- [50] Abeydeera, N.D., et al., Evoking picomolar binding in RNA by a single phosphorodithioate linkage. *Nucleic Acids Research*, **2016**. 44(17): p. 8052-8064.
- [51] Pallan, P.S., et al., Crystal structure, stability and Ago2 affinity of phosphorodithioate-modified RNAs. *Rsc Advances*, **2014**. 4(110): p. 64901-64904.
- [52] Healy, J.M., et al., Pharmacokinetics and biodistribution of novel aptamer compositions. *Pharmaceutical Research*, **2004**. 21(12): p. 2234-2246.
- [53] Watson, S.R., et al., Anti-L-selectin aptamers: Binding characteristics, pharmacokinetic parameters, and activity against an intravascular target in vivo. *Antisense & Nucleic Acid Drug Development*, **2000**. 10(2): p. 63-75.
- [54] Maier, K.E. and M. Levy, From selection hits to clinical leads: progress in aptamer discovery. *Molecular Therapy-Methods & Clinical Development*, **2016**. 3.
- [55] Dougan, H., et al., Extending the lifetime of anticoagulant oligodeoxynucleotide aptamers in blood. *Nuclear Medicine and Biology*, **2000**. 27(3): p. 289-297.
- [56] Le, T.H., et al., Electrochemical aptasensor for detecting tetracycline in milk. *Advances in Natural Sciences-Nanoscience and Nanotechnology*, **2016**. 7(1).
- [57] Zhang, Y., B.S. Lai, and M. Juhas, Recent Advances in Aptamer Discovery and Applications. *Molecules*, **2019**. 24(5).
- [58] Kumar, P.K., et al., Isolation of RNA aptamers specific to the NS3 protein of hepatitis C virus from a pool of completely random RNA. *Virology*, **1997**. 237(2): p. 270-82.
- [59] Jang, K.J., et al., Isolation of inhibitory RNA aptamers against severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus NTPase/Helicase. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008**. 366(3): p. 738-744.
- [60] Gopinath, S.C.B., K. Hayashi, and P.K.R. Kumar, Aptamer That Binds to the gD Protein of Herpes Simplex Virus 1 and Efficiently Inhibits Viral Entry. *Journal of Virology*, **2012**. 86(12): p. 6732-6744.

- [61] Nagarkatti, R., et al., Aptamer Based, Non-PCR, Non-Serological Detection of Chagas Disease Biomarkers in *Trypanosoma cruzi* Infected Mice. *Plos Neglected Tropical Diseases*, **2014**. 8(1).
- [62] Wu, X.Q., et al., DNA Aptamer Selected against Pancreatic Ductal Adenocarcinoma for in vivo Imaging and Clinical Tissue Recognition. *Theranostics*, **2015**. 5(9): p. 985-994.
- [63] Kim, Y.J., et al., Electrochemical aptasensor for tetracycline detection. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, **2010**. 33(1): p. 31-37.
- [64] Burke, D.H., et al., RNA aptamers to the peptidyl transferase inhibitor chloramphenicol. *Chemistry & Biology*, **1997**. 4(11): p. 833-843.
- [65] Hwang, S.Y., et al., 5'-Triphosphate-RNA-independent activation of RIG-I via RNA aptamer with enhanced antiviral activity. *Nucleic Acids Research*, **2012**. 40(6): p. 2724-2733.
- [66] Zhou, J.H. and J. Rossi, Aptamers as targeted therapeutics: current potential and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery*, **2017**. 16(3): p. 181-202.
- [67] Hong, P., W.L. Li, and J.M. Li, Applications of Aptasensors in Clinical Diagnostics. *Sensors*, **2012**. 12(2): p. 1181-1193.
- [68] Zani, A., et al., A New Electrochemical Multiplexed Assay for PSA Cancer Marker Detection. *Electroanalysis*, **2011**. 23(1): p. 91-99.
- [69] Zhan, X.J., et al., Electrochemical aptasensor for tetracycline using a screen-printed carbon electrode modified with an alginate film containing reduced graphene oxide and magnetite (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>) nanoparticles. *Microchimica Acta*, **2016**. 183(2): p. 723-729.
- [70] Palchetti, I. and M. Mascini, Electrochemical nanomaterial-based nucleic acid aptasensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2012**. 402(10): p. 3103-3114.
- [71] Wang, S., Y.Y. Dong, and X.G. Liang, Development of a SPR aptasensor containing oriented aptamer for direct capture and detection of tetracycline in multiple honey samples. *Biosensors & Bioelectronics*, **2018**. 109: p. 1-7.
- [72] Kaur, A., K. Sapkota, and S. Dhakal, Multiplexed Nucleic Acid Sensing with Single-Molecule FRET. *Acs Sensors*, **2019**. 4(3): p. 623-633.
- [73] Li, J., et al., Recent progress in the design and applications of fluorescence probes containing crown ethers. *Chemical Society Reviews*, **2017**. 46(9): p. 2437-2458.

- [74] Song, Y.J., W.L. Wei, and X.G. Qu, Colorimetric Biosensing Using Smart Materials. *Advanced Materials*, **2011**. 23(37): p. 4215-4236.
- [75] Qin, L., et al., "Gold rush" in modern science: Fabrication strategies and typical advanced applications of gold nanoparticles in sensing. *Coordination Chemistry Reviews*, **2018**. 359: p. 1-31.
- [76] Anderson, M.L., et al., Colloidal gold aerogels: Preparation, properties, and characterization. *Langmuir*, **1999**. 15(3): p. 674-681.
- [77] Sheng, Y.M., J. Liang, and J. Xie, Indirect Competitive Determination of Tetracycline Residue in Honey Using an Ultrasensitive Gold-Nanoparticle-Linked Aptamer Assay. *Molecules*, **2020**. 25(9).
- [78] Sharma, T.K., et al., Aptamer-mediated 'turn-off/turn-on' nanozyme activity of gold nanoparticles for kanamycin detection. *Chemical Communications*, **2014**. 50(100): p. 15856-15859.
- [79] Aga, D.S., R. Goldfish, and P. Kulshrestha, Application of ELISA in determining the fate of tetracyclines in land-applied livestock wastes. *Analyst*, **2003**. 128(6): p. 658-662.
- [80] Dong, Y., *Aptamers for Analytical Applications : Affinity Acquisition and Method Design*. **2018**.
- [81] Shinkai, M., Functional magnetic particles for medical application. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **2002**. 94(6): p. 606-613.
- [82] Perez-Ruiz, E., J. Lammertyn, and D. Spasic, Evaluation of different strategies for magnetic particle functionalization with DNA aptamers. *New Biotechnology*, **2016**. 33(6): p. 755-762.
- [83] Glazer, A.N., Bioconjugate techniques - Hermanson,GT. *Nature*, **1996**. 381(6580): p. 290-290.
- [84] Martinkova, P. and M. Pohanka, Determination of Peroxidase-Like Activity of Magnetic Particles: Basic Platforms for Peroxidase Biosensors. *International Journal of Electrochemical Science*, **2015**. 10(9): p. 7033-7048.
- [85] Yang, B., et al., Progress of Mimetic Enzymes and Their Applications in Chemical Sensors. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **2016**. 46(6): p. 469-481.
- [86] Modh, H., T. Scheper, and J.G. Walter, Aptamer-Modified Magnetic Beads in Biosensing. *Sensors*, **2018**. 18(4).
- [87] Gao, L.Z., et al., Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles. *Nature Nanotechnology*, **2007**. 2(9): p. 577-583.

- [88] Tao, Z., et al., A Colorimetric Aptamer Sensor Based on the Enhanced Peroxidase Activity of Functionalized Graphene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-AuNPs for Detection of Lead (II) Ions. *Catalysts*, **2020**. 10(6).
- [89] Zhang, Z.P., et al., Using target-specific aptamers to enhance the peroxidase-like activity of gold nanoclusters for colorimetric detection of tetracycline antibiotics. *Talanta*, **2020**. 208.
- [90] Tu, C.Y., et al., Determination of Tetracycline in Water and Honey by Iron(II, III)/Aptamer-Based Magnetic Solid-Phase Extraction with High-Performance Liquid Chromatography Analysis. *Analytical Letters*, **2019**. 52(10): p. 1653-1669.
- [91] Luo, Z.W., et al., Fluorescent aptasensor for antibiotic detection using magnetic bead composites coated with gold nanoparticles and a nicking enzyme. *Analytica Chimica Acta*, **2017**. 984: p. 177-184.
- [92] Cristea, C., M. Tertis, and R. Galatus, Magnetic Nanoparticles for Antibiotics Detection. *Nanomaterials*, **2017**. 7(6).
- [93] Salimi, K., et al., Highly selective magnetic affinity purification of histidine-tagged proteins by Ni<sup>2+</sup> carrying monodisperse composite microspheres. *Rsc Advances*, **2017**. 7(14): p. 8718-8726.
- [94] Shen, G.H., et al., Electrochemical Aptasensor Based on Prussian Blue-Chitosan-Glutaraldehyde for the Sensitive Determination of Tetracycline. *Nano-Micro Letters*, **2014**. 6(2): p. 143-152.
- [95] Salimi, K., et al., Protein A and protein A/G coupled magnetic SiO<sub>2</sub> microspheres for affinity purification of immunoglobulin G. *International Journal of Biological Macromolecules*, **2018**. 111: p. 178-185.
- [96] Wang, L.M., et al., Rapid and visual detection of aflatoxin B1 in foodstuffs using aptamer/G-quadruplex DNAzyme probe with low background noise. *Food Chemistry*, **2019**. 271: p. 581-587.
- [97] Hermanson, G.T., Enzyme Modification and Conjugation. *Bioconjugate Techniques*, 3rd Edition, **2013**: p. 951-957.
- [98] Bovaird, J.H., T.T. Ngo, and H.M. Lenhoff, Optimizing the Ortho-Phenylenediamine Assay for Horseradish-Peroxidase - Effects of Phosphate and Ph, Substrate and Enzyme Concentrations, and Stopping Reagents. *Clinical Chemistry*, **1982**. 28(12): p. 2423-2426.
- [99] Kwon, Y.S., N.H.A. Raston, and M.B. Gu, An ultra-sensitive colorimetric detection of tetracyclines using the shortest aptamer with highly enhanced affinity. *Chemical Communications*, **2014**. 50(1): p. 40-42.



- [100] Vetr, F., Z. Moradi-Shoeili, and S. Ozkar, Oxidation of o-phenylenediamine to 2,3-diaminophenazine in the presence of cubic ferrites  $MFe_2O_4$  ( $M = Mn, Co, Ni, Zn$ ) and the application in colorimetric detection of  $H_2O_2$ . *Applied Organometallic Chemistry*, **2018**. 32(9).
- [101] Jeong, S. and I.R. Paeng, Sensitivity and Selectivity on Aptamer-Based Assay: The Determination of Tetracycline Residue in Bovine Milk. *Scientific World Journal*, **2012**.
- [102] He, L., et al., A Colorimetric Aptamer Biosensor Based on Gold Nanoparticles for the Ultrasensitive and Specific Detection of Tetracycline in Milk. *Australian Journal of Chemistry*, **2013**. 66(4): p. 485-490.
- [103] Chen, D., et al., Development of an aptasensor for electrochemical detection of tetracycline. *Food Control*, **2014**. 42: p. 109-115.