

ESCHERICHIA COLI VE SALMONELLA ENTERITIDIS
TAYİNİNE YÖNELİK YATAY AKIŞ ANALİZ SİSTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF LATERAL FLOW ANALYSIS
SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF
ESCHERICHIA COLI AND SALMONELLA ENTERITIDIS

HASAN İLHAN

PROF. DR NECDET SAĞLAM

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Nanoteknoloji ve Nanotıp Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2019

HASAN İLHAN'ın hazırladığı “*Escherichia coli* ve *Salmonella enteritidis* Tayinine Yönelik Yatay Akış Analiz Sistemi Geliştirilmesi” adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından NANOTEKNOLOJİ VE NANOTIP ANABİLİM DALI'nda DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Uğur TAMER

Başkan

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Danışman

Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI

Üye

Doç. Dr. Eylem GÜVEN

Üye

Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK

Üye

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

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Aileme,

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak

Hazırladığım bu tez çalışmada,

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

Beyan ederim.

26 / 06 / 2019

HASAN İLHAN



YAYINLANMA FİKRİ MÜLKİYET HAKKLARI BEYANI

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

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

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

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

26 / 06 / 2019

(İmza)

HASAN İLHAN



ÖZET

ESCHERICHIA COLI VE SALMONELLA ENTERITIDIS TAYİNİNE YÖNELİK YATAY AKIŞ ANALİZ SİSTEMİ GELİŞTİRİLMESİ

Hasan İLHAN

Doktora, Nanoteknoloji ve Nanotıp

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

Haziran 2019, 120 sayfa

Son yıllarda patojen bakterilerin hızlı ve doğru tespiti, halk sağlığı ve gıda güvenliği açısından oldukça güncel bir araştırma alanıdır. Bu amaca yönelik etkin yöntemlerden biriside, Yüzeyde geliştirilmiş Raman saçılması (SERS) olup, duyarlılığı, sinyali çoğaltma yetkinliği, taşınabilirliği ve kâğıt tabanlı yatay akış immünoassay (LFIA) sistem, yüksek analiz hızı, aynı zamanda düşük maliyetli olması nedeniyle patojen mikroorganizma tespitinde güçlü ve etkili bir teknik olarak öne çıkmaktadırlar.

Yapılan bu çalışmanın birinci aşamasında, yaygın patojenitesi bilinen ve seçilen *E. coli* ve *S. enteritidis* suşları, SERS tabanlı LFIA sistemi oluşturmak için, raman etiketi DTNB; 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoik asit) kullanıldı, ikinci aşamada da Fe₃O₄/Au-PEI nanopartikülleri ile ön-zenginleştirme yapıldıktan sonra, seçilen patojen bakterilerin tespiti ve kantitatif analizi gerçekleştirilmiştir. Bu hedefe yönelik olarak, 20 nm boyutunda altın nanopartikül (AuNP) ve 15 nm boyutunda Fe₃O₄/Au-PEI sentezlenmiştir. Daha sonraki aşamada da kazeini parçalayan rennet enzimi kullanılarak seçilen mikroorganizmaların tespitinde optimize koşullar araştırılmıştır.

Araştırmamızın ikinci aşamasında, enzim tabanlı manyetik ekstraksiyon sistemi kullanılarak, seçilen bakteri antikoru ile kaplı Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküller, 10¹-10⁷

kob/mL *E. coli* derişimleri olacak şekilde etkileştirilmiştir. Daha sonra rennet yardımıyla kazein hidroliz edildiğinde, Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerine bağılı bulunan *E. coli* manyetik alan yardımıyla ayrılmıştır. Serbest bakteriler konjugasyon ped (AuNP+DTNB+antikor kompleksi) üzerinde altın nanopartiküllere bağılı olan raman etiket DTNB ile nitroselüloz membran üzerinde yürütölmüş, ve bakteri derişimi kağıt tabanlı LFIA sistem nitroselüloz membran üzerinde bulunan test çizgisi ile tespit edilmesi sağlanmıştır. DTNB molekülünün SERS sinyallerini takip edilerek bakterinin artan konsantrasyonuna karşı lineer bir kalibrasyon eğrisinden LOD: 0,52 ve R² değerleri de 0,98 olarak saptanmıştır. Bu değerler farklı bakteri türlerine *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. enteritidis* suşlarına karşı sadece *E.coli*'ye spesifik olarak çalıştığı gösterilmiştir.

Çalışmamızın üçüncü aşamasıda, biyolojik örnek olarak sentetik idrar, referans kan ve ticari süt örnekleri kullanılmıştır. Geliştirilen sistem ile seçilen *E. coli*'yi ne kadar tuttuğumuzun etkinliği %86 ve üzeri olarak saptanmıştır.

Yaptığımız bu çalışmada patojen mikroorganizmaların tayininde kullanılan antikorun pahalı olması nedeniyle alternatif bir yöntem düşünölmüştür. Bu amaca uygun olarak, LFIA sistemde kullanılan antikor yerine, doğal afiniteleri ve yüksek özgüllükte konak seçicilikleri nedeniyle bakteriyofajların alternatif yöntem olarak kullanılması hedeflenmiştir. Bunun için *S. enteritidis*'i konak olarak seçen P22 fajı ve kıyaslamak amacıyla antikoru kullanılmıştır. Yapılan bakteriyofaj çalışması sonucunda *S. enteritidis* (10¹-10⁷ kob/mL) SERS kalibrasyon grafiklerinden LOD: 7 kob/mL ve R²: 0,98 olarak saptanırken, antikor çalışmamızda LOD: 6 kob/mL ve R²: 0,98 bulunmuştur. Bu sonuçlar göstermiştir ki patojen mikroorganizmaların tayininde bakteriyofajın antikora kıyasla alternatif ve ucuz bir yöntem olacağı görölmüştür. In vivo çalışmamızda *S. enteritidis* ile enfekte edilen yumurta ve tavuk eti örnekleri, P22-bakteriyofaj tabanlı yatay akış sistemimiz kullanıldığında, %90 ve üzerinde bakteriyi tuttuğu ve ayırdığı saptanmıştır. Sonuçta yatay akış sistemimizin etkin çalıştığı ayrıca bakteriyofajların alternatif bir yöntem olabileceğı görölmüştür.

Anahtar Kelimeler: SERS, LFIA, DTNB, AuNP, Rennet, Fe₃O₄/Au-PEI, Bakteriyofaj, Antikor.

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF LATERAL FLOW ANALYSIS SYSTEM FOR THE DETERMINATION OF *ESCHERICHIA COLI* AND *SALMONELLA ENTERITIDIS*

Hasan İLHAN

Doctor of Philosophy, Department of Nanotechnology Nanomedicine

Supervisor: Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

June 2019, 120 pages

In recent years, rapid and accurate detection of pathogenic bacteria has been a current research area in terms of public health and food safety. One of the effective methods for this purpose is Surface-enhanced Raman scattering (SERS), its sensitivity, signal amplification capability, portability, and paper-based horizontal flow immunoassay (LFIA) system; Due to their high analysis rate and low cost, they stand out as a powerful and effective technique for the detection of pathogenic microorganisms.

In the first step of this study, *E. coli* and *S. enteritidis* strains selected and known common pathogenicity were used to generate the SERS-based LFIA system using the raman tag DTNB; 5,5'-Dithiobis(2-Nitrobenzoic acid). Quantitative analysis and rapid detection of selected bacteria was performed after pre-enrichment with Fe₃O₄/Au-PEI nanoparticles. For this purpose, 20 nm gold nanoparticle (AuNP) and 15 nm Fe₃O₄/Au-PEI were synthesized. In the next stage, optimized conditions for detection of selected microorganisms were investigated by using rennet enzyme cleaving casein.

In the second stage of our study, Fe₃O₄/Au-PEI nanoparticles coated selected bacterial antibody were interacted with *E. coli* concentrations of 10¹-10⁷ cfu/mL with used of enzyme based magnetic extraction LFIA system. Then, when the casein was hydrolyzed with the help of rennet, *E. coli* bound to Fe₃O₄/Au-PEI nanoparticles was separated by magnetic field. Free bacteria were carried out on nitrocellulose membrane with DTNB raman label bound to AuNPs on conjugation pad (AuNP DTNB antibody complex), and the paper-based LFIA system was then allowed to be detected bacteria concentration on the test line of the nitrocellulose membrane. Tracking the SERS signals of DTNB molecule, LOD: 0,52 cfu/mL and R²: 0,98 values were determined from a linear calibration curve against the increasing concentration of bacteria. These values have been shown to work exclusively for *E. coli* against different bacterial species such as *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. enteritidis* strains.

In the third stage of our study, synthetic urine, reference blood and commercial milk samples were used as biological samples. With the developed system, the efficiency of binding of selected *E. coli* was determined as 86% or more.

In the last stage of our study, the effectiveness of *E. coli* was investigated in synthetic urine, reference blood and commercial milk known as biological samples. Here, this study showed that the synthetic urine, reference blood and milk, valuable nutrients especially indicator *E. coli* tested as biological samples confirmed the idea that we will detect other pathogen bacteria.

In this study, an alternative method was considered due to the expensive antibody used in the determination of pathogen microorganisms. In accordance with this purpose, instead of the antibody used in LFIA system, it is aimed to use bacteriophages as an alternative method because of their natural affinity and high specificity of host selectivity. For this reason, the P22 phage selecting *S. enteritidis* as the host, and its antibody were used to compare. As a result of bacteriophage study, *S. enteritidis* (10¹-10⁷ cfu/mL) was determined from SERS calibration curve as LOD: 7 cfu/mL and R²: 0,98 whereas LOD: 6 cfu/mL and R²: 0,98 were found in our antibody study. These results showed that bacteriophage would be an alternative and inexpensive method compared to antibody in the detection of pathogenic microorganisms. In our in vivo study, egg and chicken samples infected with *S. enteritidis* were found to bind and separate 90% or more bacteria when using our P22-bacteriophage-based LFIA system. As a result, it was found that our LFIA system works effectively and also bacteriophages can be an alternative method.

Keywords: SERS, LFIA, DTNB, AuNP, Rennet enzyme, Fe₃O₄/Au-PEI, Bakteriophage.

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca bilimsel katkılarıyla bana yardımcı olan, tez çalışmam süresince bilimsel görüşleri ile her zaman bana yol gösteren, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, her zaman yanımda olduğunu bildiğim, tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı değerli tez danışmanım sayın Prof. Dr. Necdet SAĞLAM'a,

Tez çalışmam süresince büyük yardımlarını gördüğüm, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, tez çalışmamda laboratuvarını bana açan, bilgi, tecrübe ve çalışma disiplini ile örnek aldığım tez çalışmam süresince bilgi ve bilimsel görüşlerini hiçbir zaman esirgemeyen, her zaman yanımda olan sayın Prof. Dr. Uğur TAMER'e,

Tez çalışmamda proje aşamasında her türlü yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. İsmail Hakkı BOYACI'ya,

Çalışmamda bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşmaktan çekinmeyen ve desteklerini her zaman hissettiğim TİK üyesi Doç. Dr. Eylem Güven ÖZ ve Dr. Öğr. Üyesi Mehmet Doğan AŞIK'a,

Teknik yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Zekiye SULUDERE ve Prof. Dr. Demet ÇETİN'e,

Dostluklarını benimle paylaştıkları ve manevi desteklerini esirgemedikleri ve her türlü yardımlarından dolayı Doç. Dr. M. Gökhan ÇAĞLAYAN, Dr. Araş. Gör. Üzeyir DOĞAN, Dr. Araş. Gör. Burcu GÜVEN, Dr. Araş. Gör. Hilal TORUL, Araş. Gör. Esin Nagihan KASAP, Araş. Gör. Ezgi Elçin AHİ, Arş. Gör. Merve ERYILMAZ, Doktora öğrencileri Ezgi EMÜL, Şefika EVRAN, Ayşen GÜMÜŞTAŞ, Emine Kübra TAYYARCAN'a,

Bu günlere gelmemde büyük pay sahibi olan, desteklerini hiç üstümden eksik etmeyen canım ANNEM Nebahat İLHAN, kardeşlerim Hüseyin İLHAN, Kadir İLHAN ve Arzu AVCI'ya,

Hayatımın her döneminde desteği ile yanımda olan çok sevdiğim sevgili eşim Zehra İLHAN ve çocuklarım Yusuf Eymen İLHAN, Yıldız Sena İLHAN'a;

Sonsuz Teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	x
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiv
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Bakterilerin Yapısı	4
2.2. Bakteriyofajlar Giriş	6
2.2.1. Bakteriyofajların keşfi	7
2.2.2. Bakteriyofajların yapısı	9
2.2.3. Bakterilerin tespitinde fajlar	10
2.3. Faj Enfeksiyonu ve Yaşam Döngüsü	11
2.3.1. Litik (parçalayıcı) faj	11
2.3.2. Ilıman Faj.....	12
2.3.3. Faj Enfeksiyon Aşamaları.....	12
2.4. <i>Salmonella</i> faj	14
2.5. Yüzeyde Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)	14
2.6. Patojen bakteri tespiti için SERS etiket yöntemleri	16
2.6.1. SERS etiketleri	16
2.6.2. Bakterilerin tespiti için SERS etiketleri.....	17
2.6.3. Bakteri tespiti için etiketsiz yöntem	20
2.6.4. Patojen bakterilerin SERS profili	20
2.6.5. Yeni etiketsiz SERS yöntemleri	21
2.6.6. Nanoyapılı metal yüzeye dayalı SERS yöntemi.	22
2.6.7. Soy metal NP'lerine dayalı SERS yöntemi.	22
2.7. Bakterilerin tespiti için çok fonksiyonlu SERS platformu	24

3.	DENEYSEL ÇALIŞMALAR	27
3.1.	Kimyasal Maddeler.....	27
3.2.	Kullanılan Cihazlar	27
3.3.	Kullanılan Diğer Malzemeler	27
3.4.	Kullanılan Yöntemler	28
3.4.1.	Çözeltiler.....	28
3.4.2.	Benzalkonyum Klorür Kullanılarak Altın Nanopartikül Sentezi	28
3.4.3.	Etiket Olarak Kullanılacak Küresel Sitratlı Altın Nanopartikül Sentezi ve Yüzey Modifikasyonu	30
3.4.4.	Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin SERS Etkileri	31
3.4.5.	Altın Kaplı Demir Oksit Manyetik Nanopartikül Sentezi Ve Yüzey Modifikasyonu	32
3.4.6.	Demir Manyetik Nanopartiküllerin Altın ve Polietilen İmin ile Kaplanması:	33
3.4.7.	Farklı Raman Etiketlerinin AuNP Konjugasyonunda Optimizasyonu .	33
3.4.8.	Yatay akışlı immunoassay striplerinin inşası.....	35
3.4.9.	Yatay akış immunoassay platformu için test membranı belirlenmesi.	36
3.4.10.	Altın nanopartiküllerin agregasyon testi	37
3.4.11.	Kağıt tabanlı yatay akış immunoassay sisteminin inşa çalışmaları....	38
3.4.12.	Yatay akış immunoassay platformunun <i>E. coli</i> tayininde yapay idrar, referans kan ve ticari süt örneklerinde uygulanması	40
3.4.13.	Manyetik nanoekstraksiyon sonrası <i>E. coli</i> için Yatay Akış İmmunoassay Yöntemi.....	41
4.	SONUÇLAR VE TARTIŞMA	44
4.1.	Manyetik ekstraksiyona dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem	44
4.1.1.	Benzalkonyum klorür temelli altın nanopartikül karakterizasyonu.....	44
4.1.2.	Sitrat varlığında AuNP sentezi ve optimizasyon çalışmaları	46
4.1.3.	Fe ₃ O ₄ /Au-PEI partiküllerinin sentez ve karakterizasyonu	47
4.1.4.	Nitroaselüöz membranda gözenek büyüklük etkileşimleri.....	52
4.1.5.	Altın nanopartikül agregasyon testi.....	53
4.1.6.	Farklı Raman Etiketleri ile altın nanopartikül modifikasyonu	55
4.1.7.	Manyetik ekstraksiyona dayalı yatay akış immünoassay çalışmaları.	56

4.1.8. Kuantum noktacıkların <i>E. coli</i> antikoru ile modifikasyonu ve enzim ile bölünmesi	56
4.1.9. Manyetik nanopartiküllerin <i>E. coli</i> antikoru ile modifikasyonu ve enzim ile bölünmesi.....	60
4.1.10. Manyetik ekstraksiyon ile geliştirilmiş kağıt bazlı LFIA parametrelerinin optimizasyonu.....	61
4.1.11. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için kalibrasyon çalışması	65
4.1.12. Geliştirilen kağıt tabanlı LFIA sisteminin örnek denemeleri	68
4.1.13. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için seçicilik çalışmaları	70
4.1.14. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için farklı türdeki manyetik partiküllerin kullanılması	72
4.2. Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem	73
4.2.1. Bakteriyofaj bazlı kağıt tabanlı yatay akış immünoassay çalışmaları	73
4.2.2. İmmünomanyetik ayırım ile <i>S. enteritidis</i> tespiti.....	74
4.2.3. Farklı yüzey modifikasyonları ile <i>S. enteritidis</i> tespiti.....	75
4.2.4. Faj bazlı ELISA plaka ile bakteri tayini	77
4.2.5. Bakteriyofaj bazlı kağıt tabanlı LFIA sistem.....	78
4.2.6. Bakteriyofaj tabanlı LFIA sistemin seçicilik çalışmaları.....	81
4.2.7. Bakteriyofaj tabanlı sistemin gerçek örnek denemeleri	83
5. YORUM	89
6. KAYNAKLAR	100
EKLER	115
6.1. EK 1 – Manyetik partiküllerin FTIR sonucu.....	115
EK-2 Saf kazein ve manyetik partikül ile kovalent bağlı olan kazein'in FTIR sonuçları	116
6.2. EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar	117
6.3. EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler	118
6.4. EK 6 - Tez Çalışması Orjinallik Raporu	119
ÖZGEÇMİŞ	120

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Bakteri şekilleri.....	4
Şekil 2.2. Bakteri membrane yapısı: (A) Gram negatif bakteri, (B) Gram pozitif bakteri	6
Şekil 2.3. Bakteriyofajın genel şeması.....	9
Şekil 2.4. Bakterilerin tespiti için bakteriyofaj bazlı yöntemler.	11
Şekil 2.5. SERS yöntemine katkıda bulunan iki mekanizma.....	15
Şekil 2.6. Bakterilerin tespiti için SERS etiket ve etiketsiz yönteminin şematik gösterimi.	16
Şekil 2.7. Bakteri uygulamaları için SERS etiketlerinin modifikasyonu.....	17
Şekil 3.1. Sitrata bazlı altın nanopartiküllerin deneysel çalışmalarının şematik gösterimi.	30
Şekil 3.2. Sitrata kaplı altın nanopartikülünün yüzey modifikasyon işleminin şematik gösterimi.....	31
Şekil 3.3. DTNB ile modifiye edilen konjugasyon çözeltilerinin (a) ve konjugasyon pedine emdirilen çözeltilerin (b) görünüşleri.	35
Şekil 3.4. Yatay akışlı immuno assay strip yapısı ve SERS ölçümü	36
Şekil 3.5. Kağıt tabanlı yatay akış sisteminin hazırlanması.....	38
Şekil 3.6. Nitroselüloz membran üzerine antikor çizgilerinin oluşturulması için kullanılan ikili enjektör şırınga sistemi.	39
Şekil 3.7. Test bölgesinde oluşan antikor-bakteri-antijen kompleks bölgesi (kırmızı çizgiler).....	40
Şekil 3.8. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI partiküllerinin <i>E. coli</i> için nanoekstraksiyon basamakları.	43
Şekil 4.1. Benzalyum klorür AuNP'lerin A) TEM ve B) UV sonuçları.	45
Şekil 4.2. Benzalkonyum klorür ile sentezlenen altın nanopartiküllerin yatay akışlı immunoassay sistemi.....	45
Şekil 4.3. DTNB ile modifiye edilen benzalkonyum temelli AuNPs'in NO ₂ gerilme piklerinden elde edilen SERS kalibrasyon grafiği.	46
Şekil 4.4. Sitrata Altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü.	47
Şekil 4.5. Sitrata Altın nanopartiküllerin UV-vis spektrumu.	47
Şekil 4.6. A) Fe ₃ O ₄ nanopartiküller B) Fe ₃ O ₄ /Au-PEI NPs.....	48
Şekil 4.7. TEM sonuçları: A) Fe ₃ O ₄ B) Fe ₃ O ₄ /Au-PEI nanopartikülleri.	48
Şekil 4.8. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI partiküllerinin UV-Vis spektrumu.	49

Şekil 4.9. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI, Fe ₃ O ₄ @Au, ve Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin SERS grafikleri...	51
Şekil 4.10. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI, Fe ₃ O ₄ @Au, Fe ₃ O ₄ nanopartiküllerinin zeta potansiyel değişim değerleri.	52
Şekil 4.11. Nitroselüloz membran optimizasyonundan elde edilen SERS şiddetleri.	53
Şekil 4.12. Nitroselüloz membran optimizasyonu deneylerinden elde edilen görüntüler.	53
Şekil 4.13. AuNP agregasyon denemeler sonunda elde edilen kolorimetrik görüntü. ...	54
Şekil 4.14. Agregasyon pH bağımlı test sonuçları	55
Şekil 4.15. Manyetik nanoekstraksiyon yöntemi ile kuantum noktacıkların bakteri etkileşim metodu.....	58
Şekil 4.16. A) Kuantum noktacıklar ile sandviç kompleks oluşturmuş bakteri ve manyetik partikül etkileşimi. B) UV ışık altındaki görüntüsü.....	58
Şekil 4.17. A) Rennet enzim varlığında elde edilen sandviç yapısı ve B) UV lamba altındaki görüntüsü.	59
Şekil 4.18. Kuantum noktacık kullanılarak elde edilen yatay akış sistem resmi.....	60
Şekil 4.19. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI@Casein partiküllerinin bakteri ile etkileşim TEM görüntüsü.	60
Şekil 4.20. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI@Casein partiküllerinin enzim kesim işleminden sonra bakteri etkileşim TEM görüntüsü.	61
Şekil 4.21. DTNB etiketli AuNPs hacmi (a) 5 µL, (b) 10 µL, (c) 15 µL, (d) 20 µL, (e) 25 µL, (f) 30 µL.	62
Şekil 4.22. Fe ₃ O ₄ /Au-PEI nanopartiküllerin hacmi (a) 50 µL, (b) 100 µL, (c) 150 µL, (d) 200 µL, (e) 250 µL, (f) 500 µL	63
Şekil 4.23. Kazein konsantrasyonu (a) 1 mg/mL, (b) 3 mg/mL, (c) 5 mg/mL, (d) 7 mg/mL, (e) 10 mg/mL, (f) 15 mg/mL.	64
Şekil 4.24. Yatay akış immünoassay şeritlerine farklı enzim konsantrasyonlarında <i>E. coli</i> örnekleri verildikten sonra görünüşleri.	64
Şekil 4.25. Rennet enzim hacmi (a) 1.0 µL, (b) 1.5 µL, (c) 2.0 µL, (d) 2.5 µL, (e) 5 µL, (f) 7.5 µL, (g) 10 µL.....	65
Şekil 4.26. A) Kağıt bazlı LFIA şeritlerinin fotoğrafı ve B) kalibrasyon eğrisi ve SERS grafiği.....	66
Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlardaki (10 ¹ -10 ⁷ kob/mL) <i>E. coli</i> için test çizgisi üzerinden elde edilen raman haritalandırma (a) kör, (b) 10 ¹ kob/mL, (c) 10 ² kob/mL,	

(d) 10^3 kob/mL, (e) 10^4 kob/mL, (f) 10^5 kob/mL, (g) 10^6 kob/mL, (h) 10^7 kob/mL.	67
Şekil 4.28. A) Konjugasyon pedindeki AuNPs SEM görüntüsü, B) Nitroselüloz membran SEM görüntüsü, C) Nitroselüz membran test bölgesinde <i>E. coli</i> etkileşiminin SEM görüntüsü.....	68
Şekil 4.29. Bağlı SERS spektrumlar sırasıyla (I) yapay idrar (II) referans kan (III) süt konsantrasyonlar a) $4.23 \log E. coli$, (b) $5.23 \log E. coli$, (c) $6.23 \log E. coli$	69
Şekil 4.30. Yatay akış immunoassay şeritlerine farklı bakteri örnekleri uygulandıktan sonra elde edilen görüntüler.	70
Şekil 4.31. Farklı bakteri türlerinden elde edilen bağlı SERS şiddetleri.	71
Şekil 4.32. (a) Yatay akışkan sistemin görüntüsü. <i>E. coli</i> direkt olarak sisteme verilmesi (A), 1:3 konsantrasyonunda lizozim enzim ile <i>E. coli</i> etkileşimi (B), 1:1 oranında lizozim ile <i>E. coli</i> etkileşimi (C), Ultrasonik sistemde bakterinin parçalanması (D). (b) Farklı yöntemler uygulanarak sisteme verilen <i>E. coli</i> SERS grafiği.....	71
Şekil 4.33. Ticari Fe_3O_4 -COOH partiküllerinin bakteri kalibrasyon grafiği	72
Şekil 4.34. $Fe_3O_4@Au$ nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki bakteriler ile SERS kalibrasyon grafiği.....	73
Şekil 4.35. <i>Salmonella enteritidis</i> SERS kalibrasyon resim ve grafiği.....	75
Şekil 4.36. Faj temelli altın yüzey ile <i>Salmonella enteritidis</i> SERS kalibrasyon grafiği.	76
Şekil 4.37. Bakteriyofaj temelli altın elektrot yüzey ile bakteri SERS sinyalleri.....	77
Şekil 4.38. Faj bazlı ELISA plaka yüzey ile bakteri SERS kalibrasyon grafiği.	78
Şekil 4.39. <i>S. enteritidis</i> tayini için SERS kalibrasyon grafiği (test çizgisi:antikor, konjugasyon:antikor ile modifiye edilen AuNPs).....	79
Şekil 4.40. <i>S. enteritidis</i> tayini için SERS kalibrasyon grafiği (test çizgisi:antikor, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs).....	80
Şekil 4.41. <i>S. enteritidis</i> tayini için SERS kalibrasyon resim ve grafiği (test çizgisi:faj, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs).....	81
Şekil 4.42. <i>S. enteritidis</i> seçicilik tayini için SERS sonuçları (test çizgisi:antikor, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs).....	82
Şekil 4.43. Belirlenen bakteri seçicilik tayini için bağlı SERS sonuçları (test çizgisi:faj, konjugasyon:faj).....	83

Şekil 4.44. Faj tabanlı sistemde gerçek örnek denemelerinin SERS kalibrasyon grafikleri (A) tavuk eti (B) yumurta.	84
Şekil 4.45. Klasik bakteri sayım metodu ile antikor ve faj modifiye <i>S. enteritidis</i> bakteri miktarlarının karşılaştırılması.	86
Şekil 4.46. <i>Salmonella</i> faj ile yüzeyi kaplı olan manyetik partiküllerin TEM resmi.	87
Şekil 4.47. A) <i>Salmonella</i> faj B) <i>Salmonella</i> fajın yakınlaştırılmış açıdan görüntüsü. ...	88
Şekil 5.1. Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı sistemin bakteri SERS etkileşimi.	95

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. Karşılaştırılan Raman etiketleri ve özellikleri	34
Çizelge 4.1. PEI çözeltisinin raman spektrumunun titreşimsel modları [181].	50
Çizelge 4.2. İdrar, süt ve kan örnekleri için yapılan klasik bakteri sayım sonuçları.	69
Çizelge 4.3. Tavuk örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları.	85
Çizelge 4.4. Yumurta örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları.	85
Çizelge 4.5. Antikor ve bakteriyofaj ile modifiye edilmiş olan AuNPs'in klasik bakteri sayım sonuçları.....	86
Çizelge 5.1. <i>Salmonella</i> faj literatür çalışmaları	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

°C	Santigrat derece
nm	Nanometre
rpm	Revolutions per minute (Devir sayısı)

Kısaltmalar

SERS	Yüzey geliştirilmiş raman saçılması
AuNP	Altın nanopartikül
LFIA	Yatay akış immünoassay sistem
DTNB	5,5 D-Dithiobis (2-Nitrobenzoic acid)
HAC	Asetik asit
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
PBS	Fosfat Tampon
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin alt sınırı
SEM	Taramalı Elektron Mikroskobu
TEM	Geçirimli Elektron Mikroskobu
11-MUA	11-merkaptoundekanoik asit
BSA	Sığır serum albümini
R ²	Determinasyon katsayısı
EDC	N-(3-dimetilaminopropil)-N'-etilkarbodimid hidroklorid
NHS	N-Hidroksisüksinimid
TLC	İnce katmanlı kromatografi kağıdı
MES	2-morfolinoetanesulfonik asit monohidrat

1. GİRİŞ

Patojen bakterilerin hızlı ve doğru tespiti, gıda güvenliği ve halk sağlığı açısından oldukça güncel bir araştırma alanıdır. *Salmonella*, *Escherichia coli* (*E. coli*), *Staphylococcus* gibi patojen bakterilerin neden olduğu gıda kaynaklı hastalıklar, gıda güvenliği için sürekli bir zorluk teşkil etmekte ve yaygın olarak, maliyetli, küresel bir halk sağlığı sorunudur [1-3]. ABD'de hastalık kontrol ve önleme merkezleri (CDC), ABD'de yaklaşık 6 Amerikalıdan yaklaşık 1'inin kontamine yiyecek veya içeceklerden hastalandığını ve 3000'in her yıl ABD'de öldüğünü ve ABD'de her yıl 15,6 milyar dolara mal olduğunu tahmin ediyor [4]. Gıda güvenliğini ve halk sağlığını temin etmek için, patojenler için hızlı ve taşınabilir algılama tekniklerine acilen ihtiyaç vardır. Analitik profil indeksi (API) gibi geleneksel yöntemler, bitmesi günler süren kültür mikropları için bir dizi biyokimyasal test gerektirmektedir [5, 6]. Hayatı tehdit edici acil durumlarla karşı karşıya kalındığında böyle bir gecikme kabul edilemez. Günümüzde geliştirilen biyo-algılama yöntemleri genellikle geliştirilmiş sağlamlılık ve hız gösteren polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) veya enzim bağlı immünosorbant tahlili (ELISA) [7, 8] uygulanmaktadır [9]. Bununla birlikte, bakım noktası (POC) tanısında yaygın uygulamalar, düşük hassasiyet, özgülük, hız, maliyet etkinliği açısından sınırlıdır. Bununla birlikte, genellikle canlı/ölü bakterileri ve düşük konsantrasyonda olan patojenleri ayırt edememektedirler.

Bu nedenle, halk sağlığı yararına, hazırlık zamanının azaltılması veya ortadan kaldırılması, hassasiyet, sonuçların yerinde yorumlanmasıyla tekrarlanabilirlik, maliyet ve zaman etkinliği ve pek çok şartlar altında kullanım kolaylığı ile birlikte bir algılama yöntemi geliştirmek için doktora tez kapsamında hızlı ve doğru bakteri tayini için manyetik nanopartiküller kullanılarak ön zenginleştirme yapıldıktan sonra kağıt tabanlı yatay akış immunoassay sensör sistemi geliştirilmiştir. Bu kapsamda inşa edilen sensör hedef bakteri *Escherichia coli* (*E. coli*) için düşük tayin sınırı ve yeterli seçiciliğe sahip olarak optimize edilmiş, analitik validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir.

Yüzeyle geliştirilmiş Raman saçılması (SERS), aşırı duyarlılık, yüksek hız, nispeten düşük maliyet ve çoklama kabiliyeti ve taşınabilirlik gibi birçok çekici özelliğe sahiptir [10-13], SERS'in kimyasal [14-16] ve biyolojik ajanın [17-22] hassas tespiti için yaygın olarak kullanılmasını sağlamıştır. Özellikle, SERS tarafından mikroorganizmanın tanımlanması ve tespiti, sulu ortamda spektroskopik parmak izi ve tahribatsız veri

toplanması nedeniyle son zamanlarda büyük ilgi görmüştür, çünkü ilk SERS bakteri spektrumu Holt ve Cotton (1989) tarafından bildirilmiştir. SERS, Raman bakteri sinyalini, pürüzlü soy metal yüzey veya soy metal nanoparçacıklar (NP'ler) gibi SERS aktif substratlar vasıtasıyla artırır. Güncel SERS patojen bakterilerin saptanması genellikle iki strateji ile gerçekleştirilir: etiket bazlı (dolaylı) ve etiketsiz (doğrudan) bazlı yöntem.

Etiket tabanlı SERS yöntemi dolaylı bir yaklaşım olarak kabul edilir. Etiket yönteminde SERS etiketleri olarak adlandırılan SERS-aktif nanoprobalar, dış bakteri tespit modu olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [23]. SERS etiketlerinin kullanılması, Raman raportör moleküllerinin spektrumlarını SERS substratına yakın bir yerde rapor ederek bakteriyel hücrelerin oldukça hassas bir şekilde algılanmasını sağlar.

Tez kapsamında raman etiket olarak DTNB, sentezlemiş olduğumuz altın nanopartiküllerle hedef olan *Escherichia coli* (*E. coli*), *Salmonella enteritidis* bakterilerine uygun antikorlarla modifiye edilmiştir. Geliştirmiş olduğumuz manyetik ekstraksiyona dayalı kağıt tabanlı yatay akış immünoassay (LFIA) sistem üzerinde gerçek örnek denemeleri yapılmıştır. Modifiye edilen farklı altın nanopartiküller (AuNPs) kojugasyon bölümüne emdirilerek farklı derişimlerdeki bakterilerle etkileşmesi incelenmiş ve gerçek örnek denemeleri yapılmıştır. Hedef bakteri için oluşturulan deneylerde istenilen SERS sinyalleri oluşturulan test şeritleri üzerinden raman etiketi sayesinde elde edilmiş ve analitik validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Özellikle yenilikçi bir metot olarak sunduğumuz enzim tabanlı manyetik ekstraksiyon yöntemimizin kağıt tabanlı sistem üzerindeki tüm optimizasyon basamakları ve sonuçları detaylı bir şekilde gösterilmiştir. Özellikle günümüzde karşılaşılan problemlerden biri olan süt, kan gibi numunelerin matriks etkisinden dolayı direkt sisteme verilememesini, manyetik ekstraksiyon kağıt tabanlı LFIA platform sayesinde çok hızlı ve etkili bir şekilde hem kolorimetrik hemde kantitatif olarak tespit ederek yöntemin iyi bir potansiyele sahip olduğunu göstermiş olduk.

Son zamanlarda bakteriyofajlar, bakterilerin hızlı tespiti alanındaki antikorlara ilginç bir alternatif haline gelmiştir [24]. Bakteriyofajlar yalnızca bakteri hücrelerini enfekte eden virüslerdir. Konakçı hücrelere doğal afiniteleri, oldukça spesifik araçlar tasarlamak için kullanılabilir. Pek çok şekil ve özelliğe sahip farklı bakteriyofaj tipleri bol olduğu için,

neredeysse tüm bakteri suşlarını tespit eden biyosensörleri tasarlamak mümkündür. Fajların en önemli avantajlarından biri, yüksek özgüllükleridir. Bakteriyofaj, tekli türlere ve hatta bakteri suşlarına saldırabileceği göz önüne alındığında, hedef bakterileri seçici olarak tespit eden bir bakteriyofaj seçmek her zaman mümkündür. Ek olarak, yüksek sıcaklıklara [25] ve organik çözücülere [26, 27] maruz kaldıktan sonra bile sağlam ve aktivitelerini koruyan faj türleri vardır. Antikorların aksine, fajlar büyük miktarlarda kolayca ve ucuz bir şekilde üretilir. Sadece bakteriyel bir çözeltiyi enfekte ederek kişi çok sayıda soy fajı elde edebilir. Bu avantajlar, fajları biyosensörlerde [28] ve diğer analizlerde [29, 30] popüler biyobilişim unsurlarını yapar. Fajların diğer uygulamaları, çok ilaca dirençli bakteriyel enfeksiyonlar, faj gösterimi, aşı dağıtım sistemlerinde ve hedeflenen gen dağıtımında faj terapileridir [31].

Tez kapsamında *Salmonella* faj, kağıt tabanlı LFIA sistem ile birleştirilerek yeni bir bakteri tayin yöntemi geliştirilmiştir. Yukarıdaki genel bilgilerden de anlaşılacağı üzere antikor için iyi bir alternatif olan fajları sistem üzerindeki etkinliğini yaptığımız deneyler ile gösterdik. Yapılan çalışmada kağıt tabanlı LFIA sistemi hedef bakteri *S. enteritidis* için modifiye ettikten sonra uygulamalara başladık. Deneylerde sistemin doğruluğunu, hassasiyetini ve oluşturulacak faj tabanlı LFIA sistemin çalıştığını göstermek için ilk olarak antikor ile modifiye edilen sonuçlar daha sonra kademeli olarak faj modifikasyonlara geçilerek sonuçlar değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar antikor yerine seçtiğimiz bakteriyofajın kağıt tabanlı sistem de başarılı bir şekilde uygulanabileceğini göstermiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Bakterilerin Yapısı

Bakteriler prokaryotik mikroorganizmalardır, yani bir çekirdek veya mitokondri gibi zara bağlı organelleri yoktur [32]. Tipik olarak birkaç mikrometredirler ve kürelerden çubuklara ve spirallere kadar değişen şekillere sahiptirler (şekil 2.1). Bakterielerde nükleus yerine, genetik malzeme genellikle nükleoid olarak adlandırılan düzensiz şekilli bir gövdede sitoplazmada yer alan DNA'nın tek dairesel bakteriyel kromozomudur. Bakteriyel hücre, bir sitoplazmik membran ile çevrilidir. Sitoplazmik membran dışında hücre duvarı bulunur. Hücre duvarı ve sitoplazmik membran birlikte, hücre dış kabuğunu oluşturur. Bakteriyel hücre dış kabuk iki ana kategoriye ayrılır: Gram pozitif tip ve Gram negatif tip. Hem Gram pozitif hem de Gram negatif hücre dış kabuk şemaları, Şekil 2.2'de gösterilmiştir [33]. Gram boyama, hücre duvarında bulunan peptidoglikanı tespit ederek bakteri hücre duvarlarının kimyasal ve fiziksel özelliklerine göre farklılaştırır [34]. Şekil 2.2'de gösterildiği gibi, Gram-pozitif bakteriler kalın bir peptidoglikan katmana sahipken Gram-negatif bakteriler ince bir katmana sahiptir. Genel olarak, Gram-pozitif hücre duvarının %90'ı peptidoglikandan oluşur [35]. Buna karşılık, Gram negatif hücre duvarı %10-%20 peptidoglikandır. Sonuç olarak, Gram boyama sırasında, Gram pozitif bakteriler kristal menekşe boyasını tutar ve menekşe renkli olur [34], Gram negatif bakteriler tutmaz ve pembe lekeli olur.



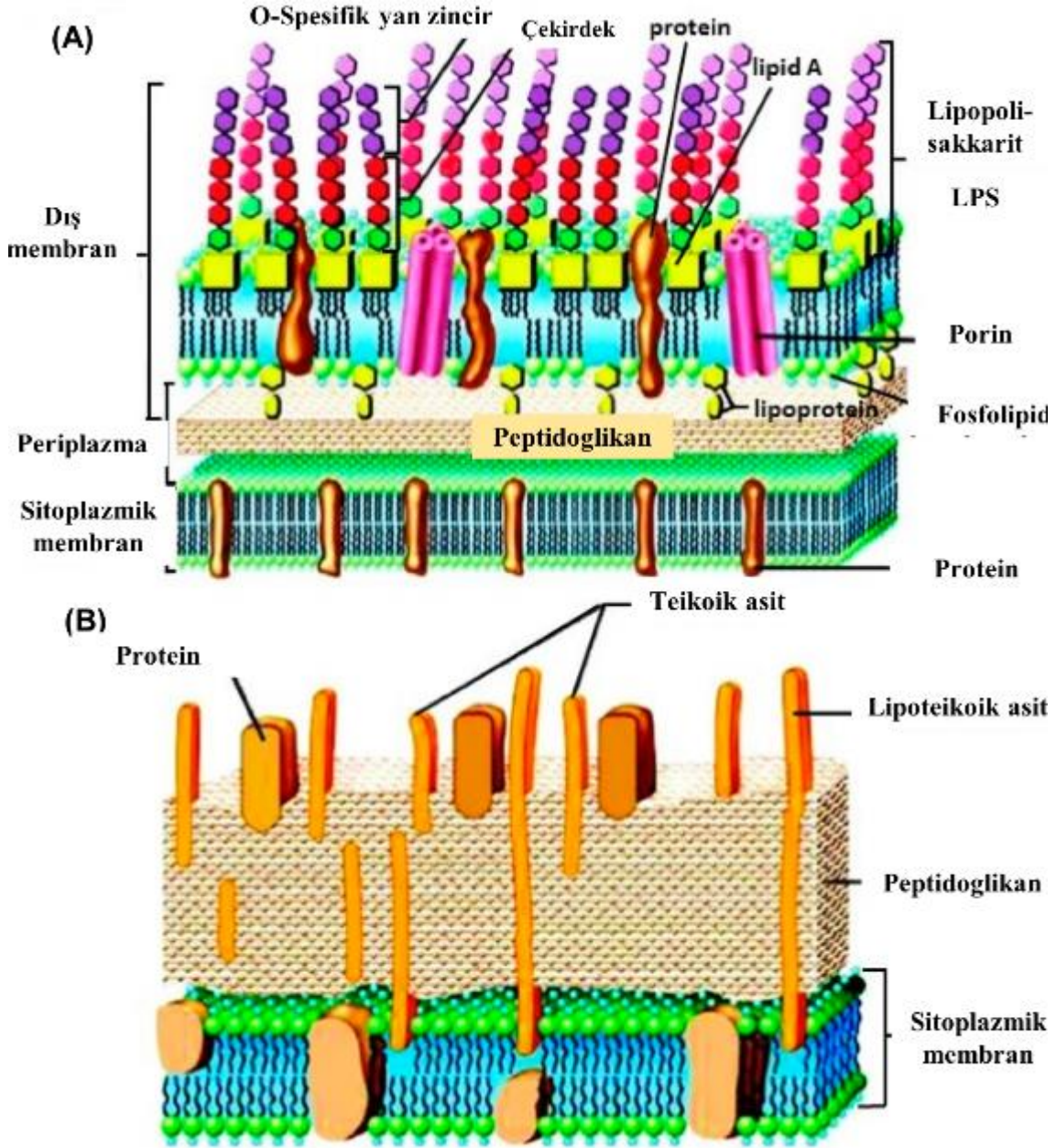
Şekil 2.1. Bakteri şekilleri.

Bakteriyel hücre duvarı, hücreye yapısal bütünlük sağlar [35]. Peptidoglikan, hücre zarının dışında gözenekli, ağ benzeri bir tabaka oluşturan şekerlerden ve amino asitlerden oluşan bir polimerdir. Şekil 2.1 (B)'de gösterildiği gibi, teikoik asitler olarak bilinen polialkoller, Gram-pozitif hücre duvarına gömülüdür. Bu polialkollerin bazıları, lipoteikoik asitler oluşturmak için lipide bağlantılıdır. Bu lipoteikoik asitler, hücre zarındaki lipidlere kovalent olarak bağlanır ve bu nedenle, peptidoglikanın hücre

duvarına bağlanmasından sorumludur. Gram negatif bakteriyel hücre dış kabuk, bir dış zar, periplazmik boşluktaki peptidoglikan katmanı ve bir hücre zarından oluşan çok katmanlı bir hücre yüzeyidir (şekil 2.2 (A)) [34, 35]. Gram negatif duvarın en dış katmanı, üç bölgeden oluşan dış membrandır: en tipik olarak lipit A, çekirdek polisakarit ve O-spesifik antijenlerden oluşur [33]. Dış zarda, besinlerin hücreye yayılmasını ve atıkların yayılmasını sağlayan porinler veya gözenek benzeri yapılar bulunur. Periplazmik boşluk, dış membran ile iç sitoplazmik membran arasında bulunur [36]. Amino asitler şekerleri, vitaminleri, iyonları ve ayrıca enzimleri parçalamak ve detoksifiye etmek için bağlayıcı proteinler içeren periplazma adı verilen jel benzeri bir matriks ile doldurulur. Hem Gram-pozitif hem de Gram-negatif bakterilerde, hücre zarı, malzemelerin hücre içindeki ve dışındaki hareketlerini kontrol eden yerleşik proteinlere sahip olan bir fosfolipid çift katmandır [37].

Hem ökaryotlarda hem de prokaryotlarda adenosin trifosfat (ATP) hücrelerde kimyasal enerjiyi depolamak ve taşımak için kullanılır. Ökaryotik hücrelerde ATP üretimi mitokondride meydana gelir. Bununla birlikte, bakteri gibi prokaryotlar mitokondriye sahip değildir. Bunun yerine, bakterilerde ATPase ve elektron taşıma zinciri, fosfolipid membranın iç ve dış duvarlarının hidrofobik kuyrukları arasındaki sitoplazmik zarın içinde bulunmaktadır [38]. Şekerin ve diğer yiyeceklerin parçalanması, zarın dışındaki pozitif yüklü protonların, zarın içindekilerden çok daha yüksek bir konsantrasyonda birikmesine neden olur. Bu durum, zarın dış kısmında aşırı pozitif yük ve iç kısımda nispeten negatif yük oluşturur. Bu yük farkının sonucu H_2O moleküllerinin H^+ ve OH^- iyonlarına ayrışmasıdır. Üretilen H^+ iyonları daha sonra hücrenin dışına taşınır ve OH^- iyonları içeride kalır. Bu bir el fener pili şarj edilerek üretilmiş olana benzer potansiyel bir enerji gradyanına neden olur. Potansiyel enerji gradyanının ürettiği kuvvete, ADP'yi ATP'ye dönüştürme de dahil olmak üzere çeşitli hücre görevlerini başarabilecek proton hareketine geçirme kuvveti denir. Sitoplazmik membran sadece hücrenin enerji dönüşüm ihtiyaçlarının bakımını yapmaz, aynı zamanda besinsel işlemlerin, yapısal makromoleküllerin sentezlenmesi ve yaşam için gereken birçok enzimin salgılanmasında sağlar. Görüleceği üzere, tüm bu aktivite bakteriler için elde edilen SERS spektral verilerini yorumlarken ilgilidir. Bazı bakteriler, hücre dış katmanının daha dışında olan bir kapsül içerebilir. Bakteriyel kapsüller, yüksek moleküler ağırlıklı polisakaritlerden ve/veya polipeptitlerden oluşur virülans ve biyofilm oluşumu ile

ilişkilidir [39]. Kapsül, hücreyi koruma ve makrofajlar tarafından yutulmaya karşı korur ve bakteriyofajların hücre yüzeyine bağlanmasını önler [40].



Şekil 2.2. Bakteri membrane yapısı: (A) Gram negatif bakteri, (B) Gram pozitif bakteri [33].

2.2. Bakteriyofajlar Giriş

Bakteriyofajlar (fajlar), 20. yüzyılın başlarında Twort ve d'Hérelle'nin bağımsız ve neredeyse eşzamanlı çalışmaları ile keşfedilmiş spesifik bakterilere özgü virüslerdir [41]. Araştırmacıların her biri, fajları, 19. ve 20. yüzyıllardan kalma faj benzeri olayların ipucunu izleyen bakteri patojenleri olarak nitelendirdi. 1930'ların sonları ve 1940'ların

başları, faj araştırmaları ve “Faj Grubu” araştırmaları da dahil olmak üzere biyolojik araştırmalar üzerindeki etkisi için en önemli dönemi temsil ediyordu [42]. Bu grup, Max Delbrück ve James Watson ve Francis Crick dahil olmak üzere diğer önemli genetikçilerin çalışmalarını içeriyordu [43]. Grup hızlıca fajın faj tedavisi olarak adlandırılan bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde kullanılabileceğini belirledi ve “faj terapi” olarak isimlendirdiler. Bakteriyofaj, bakteri yiyen anlamına karşılık gelir.

Faj biyolojisi ve faj genetiği araştırmaları ilgi çekerken, faj araştırması için birincil itici güç olan faj terapisi ve antibakteriyel potansiyel çalışmalarıdır [44, 45]. Ancak faj terapisi, başlangıçta öngörülen potansiyelinin beklentisiyle eşleşmediği için başarısız oldu, özellikle fajın kendilerini yetersiz ve zayıf karakterize edildiği bir zamanda ve 1950'lerde Batı Dünyasında küçük moleküllere olan ilgisinden dolayı bu yaklaşım engellendi [45, 46]. Her ne kadar faja dayalı terapötikler ilk ilgi alanlarının beklentilerini karşılamamış olsalar da, genetik ve moleküler biyoloji çalışmalarında [47] fajın kendisinden çok daha karmaşık organizmaların anlaşılmasına katkılarından dolayı çok önemli bir rol oynadılar. Faj çalışması, tıpta kendi ölümüne zemin hazırlamış olabilir [48, 49].

Faj tedavisi alanının ötesinde faja ve özellikle faj bazlı teknolojilere olan ilginin güçlü şekilde yeniden ortaya çıkmasına olanak sağlamıştır. Fajlar, gıda, tarım, biyoteknoloji, küresel besin döngüsü ve insan sağlığı ve hastalık endüstrilerinde büyük potansiyel ve etki sunmaktadır. Ayrıca, genetik, bakteriyoloji ve sentetik biyolojideki ilerlemeler, faj bazlı terapötiklerin daha fazla araştırılması için pekçok fırsatlara kapı açmıştır [47, 50].

2.2.1. Bakteriyofajların keşfi

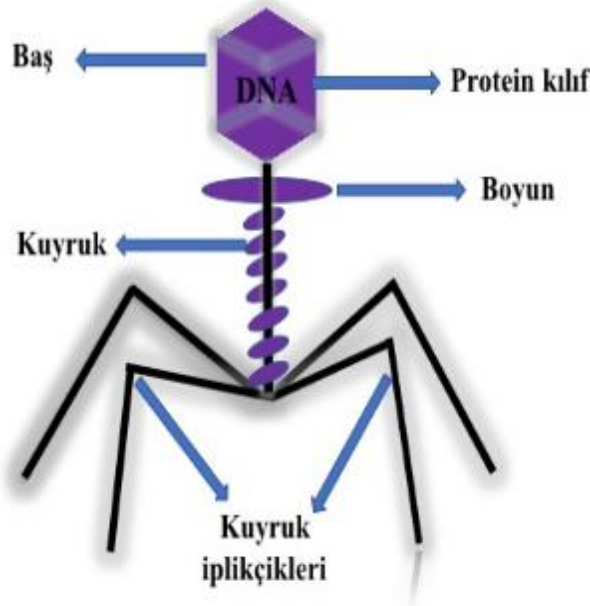
Bakteriyofajlar veya fajlar, bakteri hücrelerini istila eden ve litik fajlar durumunda bakteri metabolizmasını bozan ve bakterinin parçalanmasına neden olan bakteri virüsleridir. Bakteriyofaj keşif tarihi, öncelikli talepler üzerine bir tartışma da dahil olmak üzere uzun tartışmalara konu olmuştur. İngiliz bir bakteriyolog olan Ernest Hankin, 1896'da [51] Hindistan'daki Ganj ve Jumna nehirlerinin sularında gözlemlediği belirgin antibakteriyel aktivitenin (*Vibrio cholerae*'ye karşı) varlığını ve tanımlanamayan bir madde olduğunu söyledi. İnce porselen filtrelerden geçen ve ısıya karşı kararsız olan) bu olaydan ve kolera salgınlarının yayılmasının sınırlandırılmasından sorumluydu. İki yıl sonra, Rus bakteriyolog Gamaleya, *Bacillus subtilis* [52] ile çalışırken benzer bir fenomen gözlemledi ve diğer bazı araştırmacıların gözlemlerinin de bakteriyofaj fenomeniyle

ilişkili olduğu düşünülüyor [53]. Bununla birlikte, bu araştırmacıların hiçbiri bulgularını İngiltere'den tıbbi olarak eğitilmiş bir bakteriyolog olan Frederick Twort, Hankin'in gözleminden yaklaşık 20 yıl sonra benzer bir olayı rapor ederek ve diğer olasılıkların yanı sıra olabileceği hipotezini ileri sürerek konuyu tekrar ortaya koymadan önce virüsün bulgularını keşfetmedi [54]. Bununla birlikte, finansal zorluklar da dahil olmak üzere çeşitli nedenlerden dolayı Twort bu bulguyu takip etmedi ve iki yıl sonra bakterilerin, resmi olarak Paris'teki Institut Pasteur'deki Fransız-Kanadalı bir mikrobiyolog olan Felix d'Herelle tarafından “resmi olarak” keşfedildi [41, 54].

D'Herelle tarafından bakteriyofajların keşfi ya da yeniden keşfi, Temmuz-Ağustos 1915'te Maisons-Laffitte'de görevli Fransız birlikleri arasında (Paris'in eteklerinde) şiddetli hemorajik dizanteri salgını ile ilişkilidir, d'Herelle görünüşte ilk olarak 1910'da Meksika'daki çekirge epizootikini kontrol etmenin mikrobiyolojik yollarını araştırırken bakteriyofaj fenomenini gözlemledi. Birçok asker hastaneye kaldırıldı ve salgınla ilgili soruşturma yürütmek üzere d'Herelle atandı. Bu çalışmalar sırasında, hastaların dışkı örneklerinden bakteri barındırmayan filtreler yaptı ve bunları hastalardan izole edilen Shigella suşları ile karıştırdı ve kuluçkaladı. Karışımların bir kısmı deney hayvanlarına aşılandı (d'Herelle'in bakteriyel dizantere karşı bir aşı geliştirme çalışmalarının bir parçası olarak) ve bakterilerin büyümesini gözlemek için bir kısmı agar besiyerine yayıldı. Bu agar kültürleri üzerinde durdu ve d'Herelle, başlangıçta lekeler olarak adlandırdığı küçük, açık alanların görünümünü gözlemledi, daha sonra eskilere ve daha sonra da plaklara uyguladı [41]. D'Herelle'in bulguları, Eylül 1917 Bilimler Akademisi toplantısında sunuldu ve daha sonra toplantı sürecinde yayınlandı. Hankin ve Twort'un aksine, d'Herelle, fenomenin doğası hakkında çok az şüphe duyuyordu ve bunun bakterileri parazitleyebilecek bir virüsün neden olduğunu öne sürdü. “Bakteriyofaj” adı, onun hatırlamasına göre [41], 18 Ekim 1916'da en küçük kızlarının doğum gününden bir gün önce eşi Marie ile birlikte bu isme karar veren d'Herelle tarafından önerildi (1916 yazında, Maisons-Laffitte salgınından yaklaşık 1 yıl sonra d'Herelle, görünüşe göre ilk kez bakteriyofajları izole etti). Adı “bakteriler” ve “fajlar” dan (Yunanca yemek veya yutmak için) oluşturulmuş ve fajların bakterileri “yemek” veya “yok et” anlamına geldiği belirtildi [41].

Kendisini bakteriyofajların keşfeden birisi olarak kabul eden D'Herelle, Twort'un önceki keşfinden haberdar oldu [55, 56], ancak Twort tarafından tanımlanan fenomenin keşfinden farklı olduğunu iddia etti. Bu arada, Twort'un aksine, d'Herelle aktif olarak

bakteriyofajlar araştırdı ve fajların canlı virüsler olduğu ve araştırmacıların çoğunun düşündüğu gibi enzimler olmadığu fikrini kuvvetle destekledi. Öncelikli anlaşmazlık sonunda sona ermişti ve birçok bilim adamı bakteriyofajların bağımsız keşfini kabul ettiler ve basitçe “Twort-d’Herelle fenomeni” ve daha sonra “bakteriyofaj fenomeni” olarak adlandırdılar.



Şekil 2.3. Bakteriyofajın genel şeması.

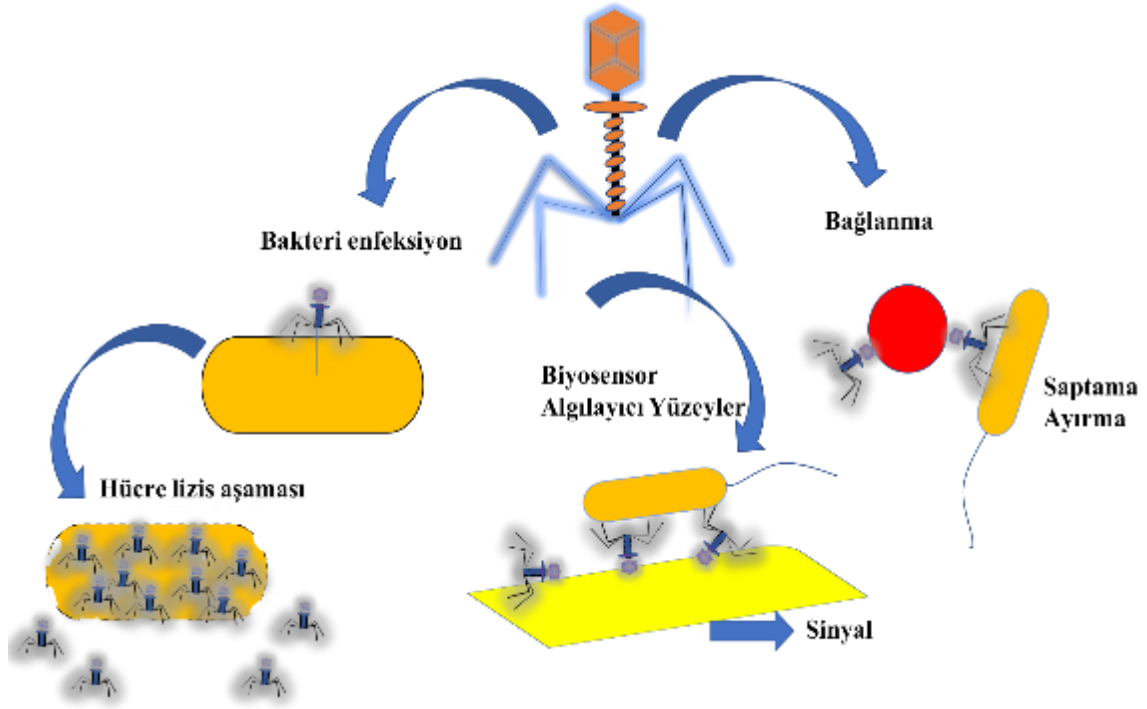
2.2.2. Bakteriyofajların yapısı

Bakteriyofajlar (kısaca fajlar), konakçı organizmalar olarak bakterileri enfekte eden virüslerdir. Virionun ortalama büyüklüğü (tek bakteriyofaj parçacığı) 50-200 nm'dir; bununla birlikte en büyük bakteriyofajların uzunluğu > 400 nm olabilir [57]. Bilinen tüm bakteriyofajların büyük çoğunluğu (>% 95) Caudovirales düzenine aittir ve şekil 2.3 de gösterildiği gibi ortak bir yapı tasarımını paylaşır (yani, genetik bilgi (çift sarmallı DNA), elyaflı bir sivri uçlu tutucunun bağlandığı ikosahedral bir kapide saklanır) [58]. Kuyruk uzunluğu ve sertliği familya ile ilişkilidir (uzun ve kasılma: Myoviridae (örneğin, T4)); uzun ve büzülmeyen: Siphoviridae (örneğin, faj); kısa: Podoviridae (örneğin, T7). Kuyruk lifleri önemli bir pozitif yüke sahiptir ve baş-kuyruk yapısı büyük bir negatif yüke sahiptir [59]. Yapının bu asimetrisi, virionun kalıcı dipol momenti ile sonuçlanır. Caudovirales'lere kıyasla çok daha az yaygın olanı genetik bilgilerini RNA veya tek iplikli DNA formunda saklayabilen filamentli (örneğin M13) veya neredeyse küresel (izometrik) (örneğin MS2) fajlarıdır. Bakteriyofajlar sadece canlı hücrelerin içinde çoğalabilir. Yalnızca uygun konakçı hücrenin tanınması, viryonların çoğalmasını sağlar,

bu yüzden çoğunlukla bir çok aşamalı "tanımlama" işlemi kullanılır. İlk tanıma elektrostatik etkileşimlere dayanır pozitif yüklü kuyruk lifleri, negatif yüklü bakteri yüzeyine çekilir. Konak tanınmanın bir sonraki aşamaları, bakterilerin uygun bir konak olup olmadığını ayırt eden spesifik reseptör bağlayıcı proteinleri kullanır. Fajlar evrime uğrarlar, bu nedenle belirli türler ve hatta bakteri türleri için oldukça verimli ve spesifiktirler. Fajlar çoğalmak için konakçı hücrelerin hücre-içi makinelerini kullanır. Tek bir bakteri hücrelerinin içine yüzlerce yeni viryon katlanır. Bazı özel durumların yanı sıra, bir noktada bakteri bozulmakta ve fajlar serbest kalmaktadır. Bu yol litik döngüdür. Bazı fajlar, viral genomlarının konakçı DNA ile entegre olduğu lizojenik bir çevrime girebilir. Profaj adı verilen entegre DNA bulaşıcı değildir ve bakteriyel kromozomun bir parçası olarak çoğalır. Bazı durumlarda, profaj eksize edilir ve bakterileri litik döngüde faj partikülleri üretmeye zorlar. Sadece litik döngüye girebilen fajlara virülan denir ve litik ve lizojenik çevrimlere girebilenlere ılıman adı verilir [60]. Aynı zamanda konakçı hücrelerini lize etmeyen filamentli fajlar gibi kronik fajlar da vardır, ancak soy viryonları sürekli salgılanır.

2.2.3. Bakterilerin tespitinde fajlar

Bakteriyofajlar ilk önce bakteriyofaj tipleme yöntemlerinde bakteriyel izolat türlerinin tanımlanmasında kullanılmıştır [61]. Bu teknik, belirli bir türe veya suşa özgü bakteriyofaj enfeksiyonunun neden olduğu bakteriyel çimlerde (plaklar denilen) bakteriyel yokluk lekelerinin basit bir şekilde izlenmesine dayanır. Zamanla, bu basit yöntemler yerine diğer, çok daha ileri teknikler uygulanmış ve fajlar yalnızca bakteri izolatu türlerinin tanımlanmasında değil aynı zamanda bakteri tespit yöntemlerinde de kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin, fajlar basit tanıma öğeleri olarak kullanılabilir. Bu gibi durumlarda, fajların varlığı hedef bakterilerin tasarlanmış tahlilin diğer bileşiklerine seçici olarak bağlanmasını sağlamıştır. Fajlar, algılama katmanını oluşturmak için katı substratlarda da biriktirebilir. Uygun dönüştürücü ile birlikte klasik anlamda biyosensörler oluştururlar. Ayrıca, bakteriyofajların kendine özgü bir özelliği olan bakterilerin enfeksiyonu, sinyal tetikleyici olaylar olarak kullanılabilir. Fajların çoğalmasının ve bakteri içeriğinin serbest kalmasıyla bakteriyel hücre erimesinin bakteri tespitinde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Açıklanan tüm yaklaşımlar, Şekil 2.4'de özetlenmiştir.



Şekil 2.4. Bakterilerin tespiti için bakteriyofaj bazlı yöntemler.

2.3. Faj Enfeksiyonu ve Yaşam Döngüsü

Faj enfeksiyonu, viryon, çok aşamalı enfeksiyon işleminin bir parçası olarak konakçı hücreye (adsorpsiyon) bağlandığında başlar. Bunu kısa bir süre sonra faj DNA'sının konak hücreye translokasyonu ve ardından konakçı içinde faj genomunun ekspresyonu izlenir [62, 63]. Faj enfeksiyon sonucunda, faja, konakçıya ve enfeksiyonun koşullarına bağlı olacaktır. Başarılı adsorpsiyon, dört durumdan biriyle sonuçlanacaktır: (i) faj, soy oluşturmak üzere yaşar ve çoğalır ve konak litik enfeksiyon yoluyla ölür; (ii) hem faj hem de konakçı bakteri, ılıman bakteriyofajların lizojenik döngüsü tarafından verilen lizojeniyle yaşar ve çoğalır; (iii) Faj, sınırlama endonükleazını kodlayan konakçıların enfeksiyonunun tipik bir sonucu [64] veya CRISPR-cas sistemlerinden dolayı soyları [65] ve konakçı yaşamlarını üretmez, ve (iv) hem faj hem de konak hücre, abortif enfeksiyon sistemi/sistemleri nedeniyle ölür [66].

2.3.1. Litik (parçalayıcı) faj

Çoğu faj, litik faj enfeksiyonu döngüsüne maruz kalması sayesinde, kız soyları, konakçı hücre lizisi ve ölüm pahasına üretilir ve salınır. Bunlar, enfeksiyonların hızlı bir şekilde viral nesillerin salınımına yol açtığı “üretken enfeksiyonlar” olarak kabul edilir. Viral genom, konak hücreye girdiğinde, faj kodlanmış genler, bakteriyel sitoplazmada eksprese

edilir; konakçı bakteriyel metabolizmasını işlevlerini ele geçirir [67]. Enfekte fajlar daha sonra faj partiküllerinin toplandığı ve eşik sayısı viryonların üretildiği bir latent süreye girer, faj gen ürünleri "holin" ve "lizin" (klasik çift sarmallı DNA fajları için), konakçı hücre duvarının tahrip edilmesinden ve faj soyunun hücre dışı matrikse ve komşu hücrelere bırakılmasından sorumludur [43, 66, 67].

2.3.2. İlıman Faj

Bir profaj olarak konaklarında stabil bir şekilde barındırılma yeteneğine sahip olan bakteriyofajlar, konağın lizojenize edilmesi, ılıman olarak adlandırılır. İlıman fajlar, genellikle konakçı kromozomuna entegre edilmiş bir profaj olarak mevcut olan, ancak konakçı veya diğer dış tehlike sinyallerine cevap olarak litik döngüye girme kapasitesine sahip olan litik ve lizojenik çevrimler arasında geçiş yapma kabiliyetine sahiptir [68, 69].

Lizojenik çevrimler iki özellik ile tanımlanır: (i) profaj yavru konak hücrelerinin, fajın DNA'sının en az bir kopyasını miras almasına izin verecek şekilde yeterince çoğaltılır; ve (ii) enfeksiyonlar, yapısal viryonların üretilmemesi nedeniyle üretken değildir, aksine, çoğaltma, konakçı replikasyon ve bölme ile dikey olarak meydana gelir.

Entegrasyon belki de daha yaygın bir lizojenik yol olsa da, bir profaj, konakçı genomuna entegre olmayan stabil bir kopya plazmid olarak ekstra kromozomal olarak ortaya çıkabilir. Entegrasyon, faj ve bakteriyel DNA'nın homolog parçalarını bağlayan bir entegrasyon gerektirir, bu da sahaya özgü rekombinasyona neden olur [43].

2.3.3. Faj Enfeksiyon Aşamaları

Faj enfeksiyonu işlemi, bakteriler içinde faj amplifikasyonu ve daha sonra bakteriyel hücre parçalanması üzerine faj salınımı ile sonuçlanır. Bu işlemde salınan hücre içi, çok sayıda bileşik içerir. Seçicilik deneyleri bakteri varlığının bir belirteci olarak kullanılabilir. Örneğin, Chen ve arkadaşları T7 fajları ile kaplanmış manyetik boncukların neden olduğu faj aracılı lizis üzerine salınan beta-galaktosidaz saptandı [70]. Beta-galaktosidaz, klorofenol kırmızısı-beta-d-galaktopiranosidin renginin sarıdan kırmızıya değişmesine ve bunun sonucunda kolorimetrik analizin etkin olmasına neden olmuştur. Bu yaklaşım, *Escherichia coli* bakterilerinin 10^4 kob/ml limitiyle saptanmasına neden oldu. Bir yıl sonra aynı grup tarafından daha karmaşık bir prosedür önerildi [71]. Serbest bırakılan beta-galaktosidaz, daha sonra altın nanopartiküller üzerinde gümüş bir tabaka

oluşturmak üzere iyonik gümüşü indirgeyen p-aminofenol (PAP) üreten reaksiyonu katalize etmek için kullanıldı. Bu, yüzey plazmon rezonans pik değerlerinde mavi bir kaymaya neden oldu. Ne yazık ki, bu yöntem algılama sınırını iyileştirmedi. Serbest bırakılan beta-galaktosidazın saptanması için bir başka olasılık, düzenlenen fajların elektrokimya ile birleştirmek olmuştur [72]. Modifiye edilmiş T7 fajları, PAP üretimini katalize eden enfekte *E. coli* hücrelerinde beta-galaktosidaz aşırı ekspresyonuna neden oldu. PAP daha sonra voltammetri kullanılarak izlenen bir elektrokimyasal reaksiyonla tespit edildi. Bununla birlikte, beta-galaktosidaz, faj aracılı lizis üzerine salınan bileşiklerin tespiti için kullanılan tek enzim değildir. Lusiferaz [73, 74], proteaz [75] veya alkalın fosfataz [76] kodlayan tasarlanmış fajlarının da bu tür testlerde faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Bu yöntemlerin hepsi benzer çalışma prensiplerine sahiptir ve kolorimetrik, luminesant veya kemilüminesan ürünler ile reaksiyonun enzimatik katalizine dayanmaktadır.

Faj aracılı bakterilerin parçalanması ayrıca çevrenin kimyasal özelliklerinde değişikliklere neden olur. Serbest bırakılan hücre içinin içeriği oldukça iletkendir. Sonuçta ortaya çıkan ortam iletkenlik değişiklikleri bakteri varlığının bir işareti olarak kullanılabilir. Örnek, özel olarak tasarlanmış bir mikroakışkan haznesi ile kombine edilmiş empedans spektroskopisi olabilir [77]. Bu yaklaşımın duyarlılığı diğer yöntemlerden daha düşüktü ($LOD > 10^5$ kob/mL). Bakteriyel enfeksiyonun bakteriyofajlarla asıl etkisi, birçok soy fajının çevreye salınmasıdır. Kirlenmiş çözeltiliye az miktarda faj eklenmesi, numunedeki faj konsantrasyonunun hızlı bir şekilde artmasına neden olacaktır. Faj sayısındaki bu artışın, bakterilerin tespiti için bir başka mükemmel sinyal olduğu kanıtlanmıştır. Örneğin, Anany ve arkadaşları *E. coli* enfeksiyonunda yaratılan bu tür soy fajlarının kantitatif gerçek zamanlı (rt) PCR ile tespit edilebileceğini göstermiştir [78]. Bu yaklaşım, *Brucella* türlerinin tespitinde de faydalı olmuştur [79]. Rees ve grubu Protein K fajlarının tripsin ile sindirilmesi üzerine oluşan proteinlerin ve peptitlerin tespiti için LC-MS/MS'ye dayanan bir teknik göstermiştir [80]. Bu yöntem aynı zamanda *Staphylococcus aureus* bakterilerinin antibiyotiklere duyarlılığının belirlenmesi için de uygundur. Bakteriyofaj amplifikasyonu antibiyotikli örneklerde tespit edildiyse, örnek bu antibiyotiklere dirençli olarak kabul edildi. İki yıl sonra aynı grup bu yöntemi hafifçe değiştirdi ve matris yardımcı lazer desorpsiyon/iyonizasyon kütle spektrometrisini tespit sistemi olarak kullandı [81]. Bununla birlikte, bu iki durumun ikisinde de tespit limitiyle ilgili bilgi verilmedi. Martelet ve arkadaşları tarafından daha

karmaşık bir yaklaşım önerilmiştir [82]. İlk immüno-manyetik ayırma basamağının eklenmesi, birkaç kob/mL aralığında (MS kullanılarak) *E. coli* bakteri algılama sınırının belirlenmesini sağladı, ancak yöntem 8 saatlik bir inkübasyon süresi gerektirdi.

2.4. *Salmonella* faj

Salmonella, geniş bir yelpazedeki gıda hayvanlarını enfekte eder veya kolonize eder ve sıklıkla insan gastroenteritinde görülür. Bu bakteri, çiğ sütün yanı sıra çeşitli etleri ve kümes hayvanlarını kontamine edebilir. Meyveler ve sebzeler de enfeksiyon salgınlarına neden olmuşlardır ve besin zincirindeki bakterinin kontrolü zorunludur [83]. *Salmonella* fajları, gıda üretim süreci boyunca, çiftlikten işlemeye ve ayrıca gıdaların paketlenmesi sırasında çeşitli aşamalarda uygulanabilir. BAFASAL® adlı ticari bir faj preparatı, yetiştirme aşamasında kümes hayvanlarına çiftlikte uygulanmasını ve SalmoFresh™ (Intralytix) ürünü, kırmızı et, kümes hayvanları, deniz ürünleri, meyveler ve sebzeler için bir gıda muamelesi olarak ilan edilir [84].

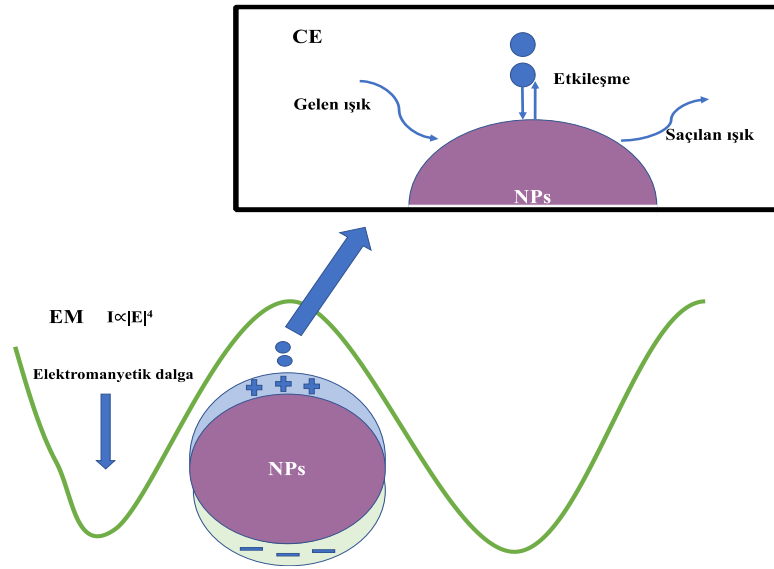
Salmonella'nın birincil rezervuarının bağırsak olduğu göz önüne alındığında, oral faj uygulamasının değerli bir çaba olduğu düşünülmektedir. Daha önce belirtildiği gibi, faj kapsülleme, düşük mide pH'sı boyunca geçiş sırasında fajın canlı kalmasını daha çok kolaylaştırır. Buna göre, Colom ve ark. *Salmonella* fajlarının etlik piliçlere verilmesi için bir lipozom kapsülleme tekniği geliştirmiş ve bakterilerin bulunduğu alt bağırsaklarda salınmasını sağlamıştır [85]. Araştırmacılar daha sonra aljinat/CaCO₃ mikrokapsüllerinin kullanımını göstermiştir [86]. İkinci çalışmada, muhtemelen CaCO₃'ün ilave antasit etkisinden dolayı kapsüllerin kapsüllenmemiş fajlara kıyaslandığında fajların veriminde üstün sonuçlar elde edilmiştir.

2.5. Yüzeyle Güçlendirilmiş Raman Spektroskopisi (SERS)

Raman spektroskopisi, molekül üzerine gönderilen şiddetli bir ışık demetinin molekülle etkileşmesi sonucu meydana gelen saçılmanın dedektör ile takibine dayanan bir tekniktir. Işık saçılması esnasında saçılan ışığın büyük bir kısmının enerjisi madde ile etkileşen ışığın enerjisine eşit olur, Rayleigh saçılması adını alan bu olay bir elastik saçılma olayıdır. Elastik saçılma olayından başka saçılan ışığın çok az bir miktarı Raman saçılması adını alan elastik olmayan saçılma olayını gerçekleştirir. Raman saçılması spektroskopik olarak incelenebilmektedir. Saçılan ışığın enerjisinde molekül ile etkileşen ışığına göre oluşan fazlalık veya azlık ışıkla etkileşmiş molekülün titreşim düzeyleri

arasında bilgi vermektedir. Moleküllerin titreşim düzeyleri arasındaki enerji farkından yola çıkarak molekül hakkında inceleme yapmaya izin veren bu spektroskopik yöntem Raman spektroskopisi olarak adlandırılır.

Fleischmann ve Van Duyne grubunun [87, 88] 1970'lerde gözlemlediği SERS'ler, Raman saçılımının bir uzantısı ve çeşitlenmesidir. Nanoboyutta altın, gümüş partiküller veya nanoyapılı metal yüzeyler, SERS'de zayıf Raman sinyalinin çeşitli büyüklük mertebeleri sayesinde (tipik olarak 10^6 ila 10^{14}) artırmak için kullanılır [89]. SERS tek molekül tespiti için uygun substrat kullanılarak 10^{14} 'e kadar yüksek hassasiyetle olanak sağlar. SERS etkisinin zenginleştirme faktörleri (EF) esas olarak iki mekanizmaya katkıda bulunur: elektromanyetik mekanizma (EM) ve kimyasal geliştirme (CE) (Şekil 2.5) [90, 91].



Şekil 2.5. SERS yöntemine katkıda bulunan iki mekanizma.

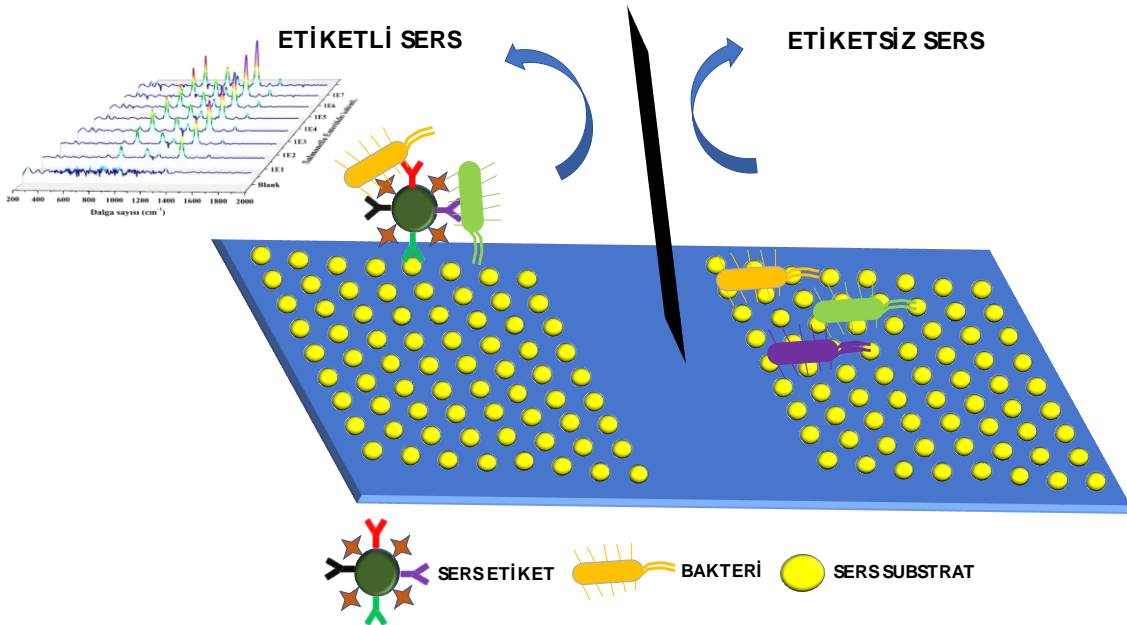
Hem uzun vadeli EM etkisinin hem de kısa süreli CE etkisinin eş zamanlı olarak etkili olduğuna inanılmaktadır [92]. Genellikle, EM için EF'nin 10^6 ila 10^8 arasında olduğu düşünülürken, kimyasal katkı sadece 10^2 düzeyinde olabilir. Kimyasal geliştirme için moleküller pürüzlü soy metal yüzeyinin belirli bölgelerinde absorbe edilir.

Moleküllerden gelen elektronların rezonans Raman saçılmasında benzer bir artış etkisine neden olan metal yüzeyinden gelen elektronlarla etkileşime girmesine olanak sağlar [93]. CE'ye bağlı SERS etkisi, substratlardan, adsorbe edilmiş moleküllerden ve karşılıklı adsorpsiyon alanlarından farklılık gösterir [94]. CE ile karşılaştırıldığında, lokalize yüzey plazmon rezonanslarının (LSPR) optik olarak uyarılmasından kaynaklanan EM artışının [95] SERS fenomenine önemli bir katkı olduğu düşünülmektedir. İletken elektronların

salınımı soy metal nanoparçacıklarında (NP'ler), keskin metal uçlarda veya kaba metal yüzeylerde oluşabilir. Bu süreçte, lokal alanın yeniden distribüsyonu ve NP etrafındaki belirli bir pozisyonda (“sıcak nokta” olarak adlandırılan) EM alanının büyük ölçüde iyileştirilmesine neden olur [96]. Bu geliştirme, güçlü bir analit mesafe bağımlılığı özelliğine sahiptir. SERS yoğunluğu I ve yerel EM kuvveti E arasındaki ilişki, $I \propto |E|^4$ olarak hesaplanır ve E ile nanopartiküller ve analitler arasındaki mesafe D , $E \propto (1/D)^{1/2}$ olarak tanımlanır. İki denklemden, bir dakikalık mesafenin azalmasının, intensitenin belirgin bir şekilde artmasına neden olduğu görülmektedir. Sadece metal yüzeye yakın veya çok yakın olan moleküller muazzam bir alan kuvveti sağlar. Bu nedenle, başarılı bir SERS tespiti başarmanın anahtarı, analit moleküllerinin SERS substrat yüzeyi ile mümkün olduğunca fazla noktaya temas etmesini ve mümkün olduğunca yakın olmasını sağlamaktır.

2.6. Patojen bakteri tespiti için SERS etiket yöntemleri

Günümüzde SERS kullanılarak patojen bakterilerin belirlenmesi genellikle iki yöntem ile gerçekleştirilir: raman etiketli (dolaylı) ve etiketsiz (doğrudan) yöntem (şekil 2.6).



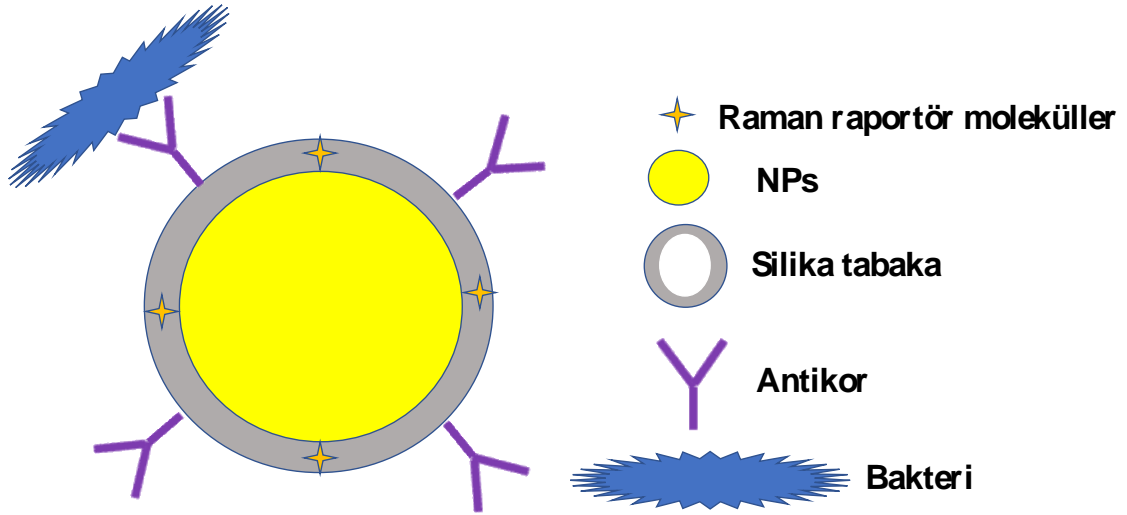
Şekil 2.6. Bakterilerin tespiti için SERS etiket ve etiketsiz yönteminin şematik gösterimi.

2.6.1. SERS etiketleri

Günümüzde, plazmonik nanoparçacıklar (PNP'ler), güçlü, karakteristik Raman sinyalleri üreten ve dolaylı olarak hedef molekülleri algılamak için kullanılabilen SERS etiketlerini

oluşturmak için spesifik organik Raman raportör molekülleri ve hedef tanıma elemanları ile modifiye edilebilmektedir [97]. Bu tür SERS etiketleri, organik boyalar ve kuantum noktaları (QD'ler) gibi floroforlara benzer optik etiketleme fonksiyonları sunar [19, 98, 99], ancak mültepleks, aşırı duyarlılık, yüksek fotostabilite ve nicel yetenekler sahip biyoanalizler için üst özellikler gerekmektedir [100, 101].

Tipik bir SERS analizinde, Raman raportör molekülleri ve tanımlama elemanları, yüksek Raman sinyali sağlamak için metalik NP'lerin yüzeyine doğrudan bağlanır [4, 102]. Bununla birlikte, metalik NP'lerin maruz kalan yüzeyi kararsız SERS sinyaline neden olan biyolojik matris içindeki diğer engelleyici molekülleri kolayca absorbe edebilir [23]. Bu nedenle, stabiliteyi arttırmanın yanı sıra, SERS sinyallerinin tekrarlanabilirliği için polimerler [103], lipozom [104] yada silika tabakası [105] gibi çeşitli yüzey kaplama malzemeleri olarak kullanılmaktadır. Bu temel yapı kurulduktan sonra, etiketlerin biyoyumluluk ve özgüllük ile elde edilmesi için antikor veya aptamer gibi bir tanımlama elementi eklenebilir. Bu nedenle, SERS etiketlerinin bakteri tespiti için hazırlanması, SERS substratının tasarımı, raportörün adsorpsiyonu, yüzey kaplaması ve yüzey ligandlarının tasarımını içeren çok aşamalı bir işlem gerektirir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Bakteri uygulamaları için SERS etiketlerinin modifikasyonu.

2.6.2. Bakterilerin tespiti için SERS etiketleri

Patojen bakteriler için etiket bazlı SERS tespitinin anahtarı, iyi özgünlüğü olan yüksek performanslı SERS etiketlerindedir. SERS etiketlerinin optik kalitesi bağlı moleküllerin türü ve molekül sayıları, SERS aktif substrat gibi çeşitli faktörlerle belirlenir [106, 107]. Au veya AgNP'lerin, Au-AgNP'lerin ve agregatlarının çeşitli şekilleri [101,

108, 109] SERS-aktif substrat olarak yaygın olarak kullanılmıştır. Seçilen Raman raportör moleküllerine bağlı olarak, SERS etiketlerinin EF'si 10^8 - 10^{13} 'de elde edilebilir [110]. Azot veya sülfür içeren boyalarla tipik Raman raporlayıcıları, Ag ve Au substratına yüksek afiniteleri nedeniyle sıklıkla kullanılır. 4-aminotiyofenol (4-ATP), 4-merkaptobenzoik asit (4-MBA), Rhodamin 6G (Rh6G), 4-merkaptopiridin (4-MPY) ve 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoik asit (DTNB) SERS etiketlerine dayalı bakteri testlerinde başarılı bir şekilde uygulanmıştır [111-113]. Ayrıca, antikor, aptamer veya küçük molekülü ligand gibi tanımlama elementleri, hedeflenen patojen bakterilerin özgünlüğünü sağlamak için SERS etiketlerine çapraz bağlanmalıdır.

a. Antikor, kovalent bağlanma reaksiyon kapsamında bakterilere özgüllüğü nedeniyle yaygın bir şekilde tanıma elemanı olarak kullanılır. Ag@silika çekirdek kabuk NP'leri [23], patlamış mısır şeklindeki AuNP'ler [114] ve tek duvarlı karbon nanotüpleri (SWCNT'ler) AuNP'leri gibi *Salmonella* veya çoklu ilaca dirençli (MDR) *Salmonella*'nın saptanması için monoklonal antikor ile konjüge edilmiş olan çeşitli SERS nanoprobaları kullanılmaktadır [111]. Son derece hassas bir algılama (LOD: 10 kob/mL) elde edilebilir [114]. Ek olarak, bu tür SERS tahlilleri, 15 dakika içerisinde MDR *Salmonella*'nın %99'unu imha etme kabiliyeti gösterir [111]. Hassas hedefli bakteri tespitini gerçekleştirmek için yüksek özgüllüklü tek domainli antikor (sdAb) özelliğine sahip nanoagrega gömülü boncuklar (NAEB'ler) adı verilen yeni bir SERS nanoprobe geliştirilmiştir (Şekil 4) [109, 115-117]. Bu tür NAEB'ler SERS etiketleri, yalın Ag veya AuNP'lere kıyasla daha fazla stabilite avantajı sağlayan az sayıda AuNP'nin silika kaplı, indüklenmiş boya kümeleşmeleridir. Bir saat içinde tek bir patojen bakteriyel *S. aureus*'un duyarlılığının yüksek olduğu tespit edildi [118]. *Salmonella* için NAEB'lerin hedefleme spesifikliğini geliştirmek için [117], hücre yüzeyindeki polisakaritlere bağlanması ile spesifik bir *Salmonella* tanınmasına sahip olan bir P22 bakteriyofajından özel olarak tasarlanmış kuyruk ucu proteinlerine (TSP) etiketler konjüge edildi. Bu tür TSP-NAEB SERS testi, tek bir hücre sınırına kadar yüksek duyarlılıkta ve *Salmonella* hücrelerinin spesifik tespitine olanak sağlar.

b. Aptamerler, spesifik hedef için yüksek bağlanma özelliklerine sahip, sekans tanımlı benzersiz yapısal formlar oluşturan tek zincirli DNA veya RNA molekülleridir. Aptamer bazlı SERS testi, metisiline dirençli *S. aureus* ve MDRB *Salmonella* DT104'ün fototermal aktivite tepkisini Rh6G Raman yoğunluğundaki değişikliklerle gözlemlendi [114]. Zhang

ve ark. Tarafından geliştirilen AuNPs-aptamer bazlı SERS biyosensörü [103], *S. typhimurium* ve *S. aureus*'un tespiti için aynı anda kullanılmaktadır. Sırasıyla *S. aureus* için 35 kob/mL LOD ve *S. typhimurium* için 15 kob/mL'lik yüksek bir duyarlılık elde edildi. Benzer şekilde, Duan ve ark. (2016), *S. typhimurium*'un kantitatif tespiti için Au@Ag-apt1-target-apt2-X-rodamin (ROX) bazlı SERS aptasensör yöntemini bildirmiştir [119]. 15 kob/mL LOD ile 10^1 den 10^5 hücre/mL'ye iyi bir lineer ilişki elde edildi. Böylece aptamer esaslı tahlil, antikor bazlı metot ile benzer yüksek duyarlılık göstermektedir. Aptamer küçük boyut, sentez ve etiketleme kolaylığı, immünojeniklik eksikliği ve antikora kıyasla düşük üretim maliyeti sergilediğinden, SERS biyoanalizinde bir antikora alternatif olabilir [120-123].

c. Glutaraldehit (GA), bakteri hücre duvarlarında peptidoglikan ile mükemmel bir çapraz bağlanma özelliği sunan küçük molekülü bir ligandır. Lin ve ark. stratejisi, GA ile fonksiyonel hale getirilmiş olan yeni bir Au@Rubpy/grafen oksit (GO) SERS etiketi *S. aureus* ve *E. coli*'nin tespiti ve yakalanması için tasarlanmıştır [116]. Her iki bakteri, grafen oksitin yapısal özellikleri kaplayan eşsiz tabaka benzerliği ve GA'nın çapraz bağlama kabiliyeti sayesinde etkili bir şekilde yakalanabilir. Sonuç, her iki bakteri için hassas Raman görüntüleme ve başarılı fototermal öldürme etkinliği olduğunu gösterdi. Ancak, halen hiçbir LOD değeri rapor edilmedi.

Ek olarak, manyetik nanopartiküller (MNP'ler), SERS etiketlerinin [124-127], Matriksten çok sayıda patojen bakteinin daha verimli yakalanması ve doğru şekilde tespitine yardımcı olması için kullanılmaktadır [115, 128-130]. Sonuç olarak, MNP'lere dayalı SERS deneyi, kompleks sistemde düşük konsantrasyonda patojen bakteri tespitini gerçekleştirmek gelecek vaat eden bir yoldur.

Etiket tabanlı SERS stratejisi, patojen bakterilerin yüksek duyarlı, multipleks tespitini sağlar. Bununla birlikte, bakteri hücrelerinin zengin içsel biyolojik bilgileri kaybolur. Ek olarak, ikincil etiket boyasının kullanılması toplam analitik süreyi, reaktan hacimlerini ve hazırlama adımlarını önemli ölçüde arttırır. Bu dezavantajlar, doğal yerinde yüksek verimli bakteri tespiti için uygulamayı sınırlandırmaktadır.

2.6.3. Bakteri tespiti için etiketsiz yöntem

Etiketsiz SERS yöntemi, yüksek duyarlılık ve zengin bilgilendirici spektrum özelliklerinin yanı sıra [131], bakteri tespiti için çekici bir nokta olarak kendini gösterir ve hücre bazlı analizlerin yeni sınırını sunar.

2.6.4. Patojen bakterilerin SERS profili

Kapsamlı bir mekanizma veya SERS bant tayininde veritabanlarının bulunmaması, açıklayıcı spektrumların sürecini, diğerlerinden daha az değerli hale getirecektir. Bu nedenle, etiketsiz SERS çalışmalarının çoğunun üzerinde durulan nokta, hem bakterilerin SERS spektrumlarını yorumlamak hem de yeni SERS yöntemlerini ve uygulamalarını araştırmaktır. *Bacillus* gibi spor oluşturan bakterilerin SERS tespiti, genellikle bakteri sporlarından kalsiyum dipikolinat (CaDPA) veya dipikolinik asit (DPA) gibi tipik biyobelirteçlere bağlıdır [132, 133]. Halka genişleme titreşiminde saptanan yaklaşık 1001 cm^{-1} deki temel belirleme piki DPA miktar belirleme ölçümü için kullanılmıştır [134]. CaDPA formundaki spor başına 1.8×10^{-12} g DPA kütlesi kabaca tahmin edilmiştir [135]. Önceki çalışmayla karşılaştırıldığında [7, 132], Cowcher ve ark. tarafından ilk olarak hızlı DPA biyobelirteçini (5 ppb (29.9 nM) seviyelerinde) kantitatif ölçmek için katı değil kolloidal SERS substrat kullanıldı ve buna göre *B. anthracis* hücrelerini inhalasyon şarbonsu için 10^4 'ün enfektif dozunun altında tuttu [136]. Araştırma, *Bacillus* bakteriyel sporların tespiti için portatif SERS'in ucuz kolloidal substrat ile uygulanabilirliğini göstermektedir. *Bacillus* türleri arasındaki yanlış pozitifleri elimine etmek için Farquharson ve grubu, 15 dakika içinde 1×10^3 spor/mL LOD içeren *Bacillus cereus*'a (*B. cereus*) karşı 100 kat seçiciliğe sahip olan *Bacillus anthracis* (*B. anthracis*)'i ayırt etmek için peptid işlevli AgNP'leri kullandı [137]. Bununla birlikte, bu peptid-spor kombinasyonu için bağlanma sabiti henüz bilinmemektedir.

Çoğu durumda, spor içermeyen bütün bakteri hücrelerinin SERS spektrumunun, bakteri hücrelerinin iç veya dışından kaynaklandığı bulundu. Jarvis ve arkadaşları ilk kez SERS'in, bir bakteri hücrelerinin iç yapısından, iç hücre zarına yakın olan sitoplazma içindeki Au (III) in vivo indirgenmesi yoluyla sinyalleri olduğunu bildirmiştir [6]. 1250 cm^{-1} 'deki SERS piki, hücre zarındaki proteinlerle ve sitozolik proteinlerle ilişkilidir. Bununla birlikte, ana SERS piklerinin, nükleik asitler, proteinler, polisakaritler, karbonhidratlar ve lipitler ve ayrıca kompleks moleküler toplanmalar gibi bakteri hücre çeperi bileşenlerinden kaynaklandığı bulunmuştur [138, 139]. SERS geliştirme mekanizmasının

mesafe bağımlılığı bu hipotezi desteklemektedir. Tipik hücre duvarından elde edilen SERS pikleri 624, 652, 735, 955, 1330 ve 1456 cm^{-1} 'de gözlemlenebilir. 735 cm^{-1} ve 1330 cm^{-1} de bulunan SERS pikleri, tipik olarak adenin veya adenozin monofosfattır [140], adenin düzlem içi halka solunum moduna veya adenin içeren diğer moleküllerden ve ayrıca purin grubunun farklı ürünlerini daha kesin bir şekilde tayin edebilir (FAD, NAD, vb.) [141].

AgNP'leri ve bakteri hücre çeperi arasında yakın bağlanmayı gösteren denatüre DNA'yı 735 cm^{-1} 'de en güçlü pikinin ve 1130 cm^{-1} 'de bulunan pikinin en bariz görünümünü gösterdi. Tüm bakteri türleri, belirli spektrumlar için frekansta bir miktar farklılık ile verilen 520 ve 1050 cm^{-1} 'deki spektral bölgede benzer spektrumlara sahiptir. Bakterilerin SERS profili, farklı bakteri türlerini ayırt etmek veya canlı ve ölü bakterileri karakterize etmek için [142, 143] kullanılabilen moleküler yapılarını, hücresel bileşimlerini ve fizyolojik durumların imzasını sunar [23, 144]. Örneğin, *E. coli* ve *S. aureus*'un belirgin farklılıkları yaklaşık olarak 1128 cm^{-1} -1388 cm^{-1} arasında bulunur. Wang ve diğerlerine göre, proteindeki CH deformasyonlarından kaynaklanan ~1330 cm^{-1} 'de SERS bandı, Gram negatif (G-) suşunun hücre duvarının, Gram pozitif (G+) olandan daha fazla protein içerdiğini gösterdi [145]. Ölü bakterilerin canlı olanlardan farklı SERS spektrumları, ölü bakteri hücre duvarının dış katmanının parçalanmasından kaynaklanabilir [146]. Ek olarak, SERS spektrumlarının yorumlanması, çok türlü biyofilmlerdeki karmaşık biyomatriksi karakterize etmeye ve farklı büyüme aşamalarındaki biyofilm matriksinde bulunan kimyasal bileşenleri değerlendirmeye yardımcı olur [147-149]. Örneğin, karbonhidratlara ve proteinlere tahsis edilen *P. aeruginosa* biyofilmlerinin 918, 1167, 1223 ve 1333 cm^{-1} 'deki spektrumları erken ve orta aşamada çok zayıftı, ancak en son aşamada önemli ölçüde arttı. Belirgin spektrumların değişmesiyle birlikte Feng ve ark. *P. aeruginosa* biyofilmlerini farklı gelişim evrelerinde (diğer bir deyişle erken, orta ve geç evrelerinde) karakterize etme ve ayırt etme yeteneğini göstermiştir [150].

2.6.5. Yeni etiketsiz SERS yöntemleri

Bakterilerin tespiti için en etkili etiketsiz SERS yaklaşımı, soy metal nanopartiküllerin çözeltideki bakteri hücreleri ile karıştırılması veya bakteriyel bağlanma için bir substrat üzerinde NP lerin ince bir tabaka oluşturulması ile mümkündür. SERS tarafından başarılı bir şekilde tespit etmek, ancak substratlar tekrarlanabilirse ve yüksek geliştirme sağlarsa mümkündür.

2.6.6. Nanoyapılı metal yüzeye dayalı SERS yöntemi.

Wang ve diğ. , üç ana patojenin (*E. coli O157*, *S. typhiumium* ve *S. aureus*'un başarılı bir şekilde sınıflandırılması için) Ag nanokristallerin (AgNCs) bir araya gelmesi ile oluşturulan sıcak noktalara sahip yeni monodispers bir Ag nano küresi (AgNS) SERS substratı olarak geliştirdi [146] . Ayrıca eşsiz yarı-3D (Q3D) plazmonik nano yapı dizileri, Xu grubu tarafından SERS substratı olarak geliştirildi. Her iki çalışma da patojen bakterilerin başarılı bir şekilde tanımlandığını gösterdi, ancak ideal nicel sonuçlarla başarısız oldu.

Yüzeye hücresel yapışmanın artmasının, analitik LOD'de önemli iyileşmeye yol açması gerektiği gösterilmiştir. Bir antibiyotik olan vankomisin (Van), bakteri hücrelerini, bakteri hücre duvarındaki peptidoglikan ile Van'ın karbonil ve amin grupları arasındaki hidrojen bağları vasıtasıyla güçlü şekilde bağlayabilir [151]. Van, SERS substratının sıcak birleşme noktalarına daha yakın hücre duvarının bir kısmını çekerek SERS sinyalinin çok büyük ve kararlı bir şekilde artmasına yol açabilir [152, 153]. Van kaplı AgNR'lerin katmanları bile G+ bakterilerini G- bakterilerden daha iyi yakaladı [154], Van kaplamalı Ag-Au hibrid substratının hem G+ hem de G- bakterilerinde daha iyi SERS artışı gösterdiği bulundu (*E. coli*, *S. enterica*, *S. epidermidis*, *B. megaterium* ve *S. epidermidis*), seftazidime hidrat kaplı substratla veya kaplı olmayan ile karşılaştırıldığında kan bileşenlerinden herhangi bir engel ve çakışma olmadığı görüldü [155]. Wu'nun gösterdiği Van fonksiyonelleştirilmiş AgNR substratlarına dayanan portatif ve elle kullanılan Raman sistemi, maş fasulyesi filizi için 10^3 kob/g LOD değerine ulaşabilir.

Wu ve ark.'nın gösterdiği Van işlevli AgNR substratlarına dayanan portatif ve elle kullanılan Raman sistemi. , maş fasulyesi filizi için 10^3 kob/g LOD değerine ulaşabilir [156]. Her ne kadar nanoyapılı metal yüzey bazlı yöntem göreceli olarak stabil ve tekrar üretilebilir bir SERS sinyali sağlayabilse de, karmaşık sentez ve yüksek maliyet uygulamayı sınırlandırmaktadır.

2.6.7. Soy metal NP'lerine dayalı SERS yöntemi.

Soy metal NP'leri basit bir şekilde sentezlenir ve daha sonra SERS biyoanalizinde yukarıdaki nanoyapılı metal yüzeye kıyasla daha yaygın olarak kullanılır. Popüler etiket içermeyen SERS bazlı bakteri analizinde genellikle, bakteri hücreleri ile basitçe

karıştırılarak inorganik tuzun indüklediği AuNPs veya AgNP'lerin koloidal veya parçacık agregaları kullanılmıştır [139, 157, 158]. Basitçe karıştırma stratejisi daha ucuz, daha kolay ve daha hızlı deteksiyon yapmasına rağmen, üretilen karışım her zaman homojen değildir, bu da NP'lerin patojen hücrelerin yüzeyinde rasgele dağılımına ve ardından tekrar edilemeyen SERS spektrumuna yol açar. NP'lere dayalı SERS yönteminin temel amacı, NP'lerin bakteri yüzeyiyle mümkün olduğunca fazla noktaya temas etmesini ve mümkün olduğunca yakın olmasını sağlamaktır. AgNP'ler, üstün SERS geliştirmelerinden dolayı bakterilerin saptanması için aktif bir SERS substratı olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır [159]. Bu inkübasyon, elektrostatik etkileşim, NP'lerin in situ sentezi gibi çeşitli stratejiler bu amaca ulaşmak için kabul edildi.

Bu makaleler kapsamında, bakteri hücre duvarındaki NP'leri verimli ve kesin bir şekilde üretmek için benimsenen elektrostatik çekim kuvveti stratejisi çok dikkat çekmektedir. Aslında dış zar lipopolisakaritleri veya teikoik asit varlığından dolayı negatif yüklü olan G- veya G+ bakterilerinin hücre duvarından kaynaklanmaktadır. Örneğin, Kahraman ve ark., tek bir hücrenin SERS tespiti için elektrostatik etkileşim yoluyla bakteri hücresi duvarında yüksek verimli ve hassas bir tortuya izin veren bir poli (alillamin hidroklorür) (PAH)/AuNP/PAH tabaka katman yapısını bildirmiştir [160]. Bununla birlikte, prosedür çok karmaşık ve miktar ölçümü gerçekleştirilmemiştir. In situ yaklaşımı, NP'lerin bakteriyel hücre duvarlarına homojen temasını sağlar. Zhou ve grubu, içme suyunda bakterilerin daha iyi SERS tespiti için elektrostatik etkileşimle bakterilerin hücre duvarında AgNP'lerin in situ sentezini sunmuştur [161]. Bu stratejiyi kullanarak bakterilerin Raman sinyalinin artırılması, basit bir şekilde karıştırılmış kolloid-bakteriyel süspansiyon (30 kat) veya ko-inkübasyon stratejisi durumunda olandan çok daha yüksektir [162]. Elde edilen LOD $2,5 \times 10^2$ hücre/mL idi. Ek olarak, esas olarak hücre duvarının zeta potansiyeline bağlı olarak AgNP sentezinden sonra bakterinin SERS sinyal yoğunluğunu bulduk. Dahası, doğal suşları ve antibiyotiğe dirençli mutant suşlarını ayırt etmek ve ayrıca SERS haritalaması ile canlı ve ölü bakterileri sayımını bu yaklaşımın mekanizmasını için araştırdık [143]. Sonuç, yükün yalnızca AgNP'lerin bakteri yüzeyindeki denovo sentezi ile ilgili olduğunu ve sürekli bağlanmalarıyla ilgili olmadığını göstermiştir.

Burada sunulan yöntemimiz, basit kullanım, düşük reaktant hacimleri, yüksek hassasiyet ve seçiciliğin yanı sıra iyi tekrarlanabilirlik gibi birçok avantaj sunar, gıda veya kan

örneği gibi daha karmaşık örneklerde kullanılmak üzere devam ettirilebilir. Ek olarak, filtre benzeri AuNPs@mesoporous NP'ler [116], patlamış mısır şeklindeki manyetik çekirdek-kabuk AuNPs'i [163] gibi çok işlevli hibrit SERS NP'leri ayırmak, konsantre etmek için çok hassas SERS bakteri tespiti için geliştirilmiştir. Fan ve arkadaşları, MRSA bakterileri için 10 kob/mL'lik bir LOD ile SERS sinyalinin mükemmel bir şekilde tekrarlanabilirliğini sergileyen, hibrit GO bazlı patlamış mısır şeklindeki AuNPs SERS probunu bildirmiştir [163]. Ondera ve Hamme, *E. coli* 49979'un $1,0 \times 10^2$ kob/mL'lik bir LOD'de hızlı bir şekilde saptanmasını sağlamak için hibrid AuNPs-SWNT'leri kullandı [164]. Ek olarak, çok fonksiyonlu hibrit SERS NP'leri klinik numunelerde MDRB'nin fototermal tahribatı vardır.

2.7. Bakterilerin tespiti için çok fonksiyonlu SERS platformu

Bakterilerin tespitinde gerçek kompleks örneklerde bulunan safsızlıklar ve yabancı maddeler ayrıca biyolojik nesnelere ilgili düşük sinyal/gürültü oranı SERS teknolojisinin avantajlarını sınırlamaktadır. Patojenlerin karışık numunelerden gerçek zamanlı tespitini gerçekleştirmek için başarının anahtarı, sadece yüksek SERS aktivitesine sahip olan bir platform oluşturmak değil, aynı zamanda matriksten bakterileri güçlü bir şekilde yakalama yeteneğine sahip bir sistem oluşturmak gerekmektedir [165]. İmmünoassay mikroçip bazlı etiket içermeyen SERS platformlarının, sulu ortamdaki [166] ve santimetre küp başına 144 partikül LOD'li aerosolden bakterileri yakaladığı ve tespit ettiği bildirildi [167]. Mikro-dizi tabanlı SERS yöntemi, SERS aktif ortam ve bakteriler arasında stabil bir etkileşim sağlar. Knauer ve grubu suda daha iyi bakteri miktarını elde etmek için önceki sabit mikro-dizi SERS çipine [166] dayanan bir akış sistemi geliştirmiştir [168]. SERS haritalama ile $4,3 \times 10^3$ ila $4,3 \times 10^5$ hücre/mL arasında doğrusal dağılım aralığı elde edildi. Ancak gerçek dünyadaki durumunu gösteremeyen algılanan bakteriler ölüdür. Zhou ve grubu, in situ AgNP'leri doğrudan bakterileri mikrodizi yüzeyinde sentezledi ve önceki çalışmadan 10 kat daha yüksek canlı bakteriyi hassas belirleme yöntemi geliştirdi [166]. Mikroarray'in duyarlılığı yüksek olmasına rağmen, sayma istatistikleri nedeniyle dinamik aralık sınırlıdır. Ayrıca, antikolar gibi ortak reseptörler suş seviyesinde seçicilik sağlamaz.

Filtrasyon, konsantrasyon, yakalama, tespit ve bakterilerin etkisiz hale getirilmesi gibi çoklu özelliklere entegre olan SERS platformları, gerçek numunelerde eşzamanlı uygulamaların geliştirilmesine olanak sağlamaktadır [129, 169]. Örneğin, Wang ve

grubu, insan kanındaki *E. coli* ve *S. aureus* için 4-merkaptofenil-boronik asit (4-MPBA) ile modifiye edilmiş ve AgNP'ler ile dekore edilmiş olan bir silikon levhadan yapılan çok işlevli bir SERS çip modeli bildirmiştir [129]. Çip, mükemmel tekrarlanabilirlik (göreceli standart sapma (RSD) < %11,0), düşük konsantrasyonlarda (500-2000 kob/mL), bakteri yakalama verimliliği (yaklaşık %60), yüksek hassasiyet (1.0×10^2 hücre/mL'ye kadar) ve yüksek antibakteriyel aktivite (yaklaşık %97 oranında bir antibakteriyel oran) gibi özellikleri göstermektedir. Kamińska [170] tarafından geliştirilen bir polimer mata dayalı yeni bir SERS substratının, beyin-sıvı numunelerinde bulunan üç menenjit patojenlerini ve *N. meningitidis*'in tek bakteriyel hücrelerinin eş zamanlı olarak filtrasyon, immobilizasyon ve tespitine olanak sağladığı gösterilmiştir.

Mikroakışkanların, SERS'in gıda kaynaklı farklı bakteri türlerini, *E. coli* suşlarını ve ayrıca ilaca dirençli veya hassas bakterileri hızlı bir şekilde ayırt etmelerine yardımcı olduğu gösterilmiştir [171-174]. Dielektroforez (DEP), uygulanan elektrik alanın yanı sıra nesnelere ve akışkanı çevreleyen elektriksel özellikleri nedeniyle nesnelere hareketinden dolayı düzensiz elektrik alanlarının kullanımına dayanmaktadır [175]. Biyolojik numunelerdeki hücreleri, bakterileri ve DNA'yı ayırmak ve konsantre etmek için mikroakışkan sistemler ile entegre etmek için kullanılmıştır [132, 133, 176]. DEP'in idrardan bakterileri sadece 35 dakika içerisinde tanımlamasında yardımcı olduğu bildirilmiştir [177]. Cheng grubu, herhangi bir antikor/kimyasal immobilizasyon ve reaksiyon işlemi kullanılmadan bakteri konsantrasyonu ve tespiti için DEP SERS mikroakışkan platformlarını bildirdi [178, 179]. Örneğin, Cheng ve ark., 5×10^3 kob/mL lik düşük bakteri konsantrasyonu sahip olan insan kanında ender görülen patojenleri dairesel bir DEP mikroakışkan sistem ile konsantre etti [178]. *S. aureus*, *E. coli* ve *P. aeruginosa* bir dakikadan daha kısa bir sürede başarıyla tanımlandı. Ek olarak, hastanedeki mevcut yöntemle karşılaştırıldığında, dairesel bir metalik tabakalı DEP SERS platformuna sahip yeni dörtlü elektrotlar, bakteri tespit oranını seyreltik kandan 2 günden birkaç dakikaya kadar hızlandırabilir [179].

Madiyar ve arkadaşları tarafından yapılan DEP tabanlı nano etiket ile işaretli SERS platformunun sadece ~50s yakalama süresi ile, 210 kob/mL lik daha düşük bir konsantrasyona sahip LOD değeri bulunmuştur [180]. ELISA ile karşılaştırıldığında, Lin ve arkadaşları tarafından bildirilen NAEB-DEP-SERS bazlı analiz daha yüksek hassasiyet (SERS için 70 kob/mL LOD ve 2×10^7 kob/mL ELISA) ve testte daha düşük

miktarda antikor gerektiren (100 kat daha az) avantajlar sağlar [116]. *S. Choleraesuis* ve *N. lactamica*'nın tüm tanı süresi 2 saatten az olarak tespit edildi. Sonuçlar, patojenlerin online, doğru ve yüksek hassasiyetli tespiti için kompakt DEP-SERS taşınabilir sisteminin umut verici potansiyelini göstermektedir.

3. DENEYSEL ÇALIŞMALAR

3.1. Kimyasal Maddeler

Tezde nanopartikül sentezi ve tüm deney prosedürü için santrifüj cihazı (Eppendorf), deiyonize su cihazı (Millipore Simplicity 185), ultrasonik banyo cihazı (Bandelin Sonorex), hassas terazi (Shimadzu), pH metre (SX-610 Pen Type) kullanılmıştır. Deneylerde kullanılan Cetyltrimetilamonyumbromür (CTAB), benzalkonyum klorür, altın klorür, $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, gümüş nitrat, askorbik asit, demirklorür (FeCl_3), demir sülfat hepta hidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), sodyum hidroksit (NaOH), perklorik asit (HClO_4), etanol, etilendiamintetraasetikasit (EDTA), merkaptoundekanoik asit (11-MUA), N-hidroksisüksinimid (NHS), (3-dimetilaminopropil) karbodiimid hidroklorür (EDC), MES, PBS içeriği, hidroksilaminklorür, 4-aminotiyofenol (4-ATP), 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB), tween 20, etanolamin, sukroz, bovin serum albumini (BSA), kazein Sigma-Aldrich (St. Lois, MO, A.B.D.) tarafından, trehaloz çözeltisi ise Life Sciences Advances tarafından, SpeedBeads™ manyetik altın nanopartiküller ise GE Healthcare tarafından sağlanmıştır. Monoklonal *E. coli* antikoru, biyotinli poliklonal *E.coli* antikoru, biyotinli poliklonal *Streptococcus* grup A antikoru, monoklonal *Streptococcus* group A antikoru, sekonder antikolar Fitzgerald (MA, A.B.D.) aracılığıyla elde edilmiştir. SERONORM™ PAEDIATRIC 6X3 mL, SERO AS, (Billingstad, Norway).

3.2. Kullanılan Cihazlar

Deneyler sırasında, SERS ölçümleri için Raman spektrofotometre (DELTA NU REPORTER PORTABLE RAMAN SPECTROSCOPY), UV spektroskopisi cihazı (SPECTRONIC GENESYS), santrifüj cihazı (EPPENDORF), deiyonize su cihazı (MILLIPORE SIMPLICITY 185), SEM analiz cihazı (JSM-6400), TEM Analiz Cihazı (Jeol), ultrasonik banyo cihazı (BANDELIN SONOREX), hassas terazi (SHIMADZU), pH metre (SX-610 PEN TYPE) ve Zetasizer cihazı (Malvern) kullanılmıştır.

3.3. Kullanılan Diğer Malzemeler

Örnek pedi, konjugasyon pedi, nitroselüöz membran (MILLIPORE HIFLOW), absorbant pedi, mikropipet (1-10,10-100,100-1000 μ l) deneyler esnasında kullanılmıştır.

3.4. Kullanılan Yöntemler

3.4.1. Çözeltiler

PBS (100 mM, pH 7.4), Na₂HPO₄, KH₂PO₄, NaCl kullanılarak ve pH'ı HCl veya NaOH ile ayarlayarak hazırlandı. Borat tamponu (100 mM, pH 8.8) H₃B₃O₃, sodyum tetra borat kullanılarak ve pH'ı HCl veya NaOH ile ayarlanarak hazırlandı. MES tamponu (50 mM, pH 6.5), pH'ı NaOH ile ayarlanarak hazırlandı. EDC / NHS çözeltisi (200 mM EDC ve 50 mM NHS), 50 mM MES tamponu (pH 6.5) ile hazırlandı. 100 mM PBS tamponu ile BSA çözeltisi (50 mg/mL) hazırlandı. Tüm çözeltiler, istenen konsantrasyon seviyelerine ulaşmak için Milli-Q kalitesinde su (18 MΩ cm) ile hazırlandı.

3.4.2. Benzalkonyum Klorür Kullanılarak Altın Nanopartikül Sentezi

Altın nanopartiküllerin (AuNPs) sentez yöntemi çoğunlukla iki tür indirgenme yolu ile gerçekleştirilmektedir: altın klorürün sodyum sitrat ve sodyum bor hidrür gibi kimyasalların kullanılması sonucu sentezlenmektedir. Sentez yöntemlerinin yöntemine göre partiküllerin boyutu etkilenmektedir, mesela sodyum sitrat ile indirgeme reaksiyonunda 10-100 nm boyutları arasında küresel nanopartiküller meydana gelirken, indirgeyici ajan sodyum bor hidrür 2-10 nm boyutunda küresel nanopartiküller elde edilmektedir. Kimyasal yöntemle çubuk şekilli nanopartikül sentezleyebilmek mümkün, öncelikle çekirdek çözeltisi hazırlanmakta, daha sonra hazırlanan bu çözeltisi vasıtası ile küresel nanopartiküller büyütülerek anisotropik (çubuk, küp vb) nanopartiküller elde edilmektedir.

Daha yüksek verimlilikte, tekrarlanabilir ve homojen monodispers dağılımlı altın nanopartikül sentezlemek için tohum (seed) büyütme yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde belirli bir boyuta sahip küresel yapıda nanopartiküller tohum olarak kullanılarak, misel içerisinde indirgenme reaksiyon sonucu farklı boyutlarda nanopartiküller sentezlenir. Hızlı ve tekrarlanabilir sonuçların alınması, yüksek verimde ve homojen ürün dağılımı oluşturması, maliyetinin düşük olması ve misel boyutunun ve partikül boyutunun kolayca kontrol edilebilmesi gibi avantajlarından dolayı bu tez kapsamında sitrat temelli AuNPs'in sentezi ve seed büyütme metodu tercih edilmiştir. Nanopartikül sentezinde kullanılan diğer bir yöntem ise elektrokimyasal yöntemdir. Bu yöntemin yüksek verimli olmasına rağmen zaman alıcı olması ve maliyetinin yüksek olması gibi dezavantajları bulunmaktadır. Bu yöntemlerden farklı olarak kalıp kullanma

metodu ile nanoporoz alimuna yada poli karbonat membranları kalıp materyal olarak kullanılarak yapılarında bulunan gözenekler içinde nanopartiküller sentezlenebilmektedir. Bu yöntemin membranların gözenek çapı ayarlanması ile nanopartikül boyunun kolayca kontrol edilebilme gibi avantajı olmasına rağmen düşük verimli olması ve homojen olmayan ürün dağılımı vermesi gibi dezavantajları olmasından dolayı tercih edilmedi.

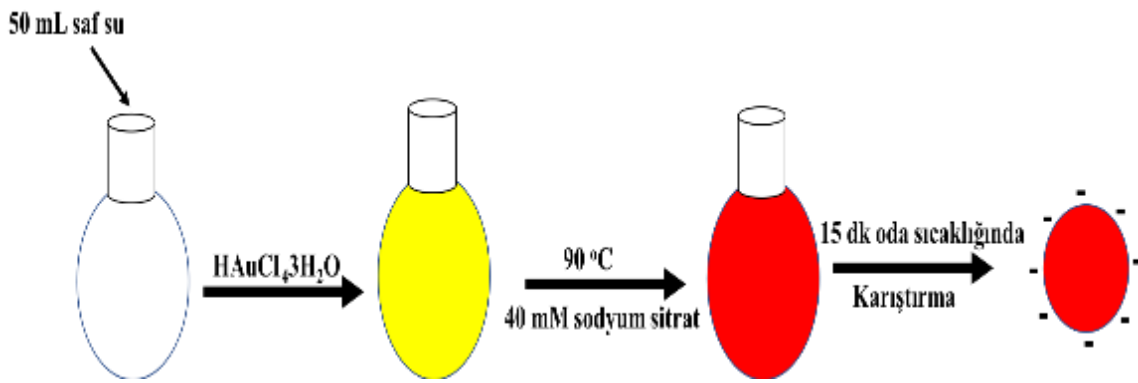
Raman saçılması deneylerinde yüksek hassasiyet elde edilmesinde sıklıkla cetyltrimetilamonyumbromür (CTAB) yüzey aktif maddesi kullanılarak sentezlenen anizotropik altın veya gümüş nanopartiküller tercih edilmektedir. Fakat CTAB maddesinin toksik özelliklerinden dolayı alternatif altın nanopartikül sentezleri yapılmaktadır. Bu sebeple sitrat bazlı ve benzalkonyum klorür (BAC) yüzey aktif maddesinin kullanımı ile altın nanopartiküller sentezlenmiş ve karakterizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Benzalkonyum klorür ile altın nanopartikül sentezlemek için ilk olarak tohum olarak kullanılacak küresel altın nanopartikülleri soğuk ortamda NaBH_4 ile indirgenerek elde edilmiştir. İki saatlik bekleme süresi sonrasında elde edilen nanoküreler tohum olarak kullanılarak yatay akış immünoassay (LFIA) striplerinde kullanılacak altın nanopartiküller sentezlenmiştir. Temiz bir vial içerisine 4.75 mL %10 benzalkonyum klorür konulduktan sonra üzerine 0.01 M $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ çözeltisi ilave edilerek portakal rengine sahip çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti üzerine 60 μL 0.01 M AgNO_3 ilavesinden sonra 250 μL 0.1 M askorbik asit (vitamin C) ilave edilmiş ve şeffaf renkli çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti üzerine küresel şekle sahip altın nanopartikül çözeltisinden ilave edilmiş ve hafifçe 10 saniye boyunca karıştırılmıştır. Bu işlem sonrasında en az 3 saat beklenmiş ve bu sürenin sonunda kırmızı renkli çözelti elde edilmiştir. Bu çözelti 10 dakika boyunca 12,500 rpm hızında üç defa santrifüjlenerek ortamdaki aşırı miktarda bulunan yüzey aktif maddeden (benzalkonyum klorür) uzaklaşması sağlanmıştır. Daha sonra elde edilen kalıntı deiyonize su içerisinde süspanse edilerek oda sıcaklığında saklanmıştır.

Sentez sonucunda sentezlenen altın nanopartiküllerin karakterizasyonu önem taşımaktadır. Bu sebeple altın nanopartiküllerin boyutu ve şekli optimize edilmiştir. TEM fotoğraflarında gözlenen bu nanopartikül oluşumları UV spektrumları alınarak konfirme edilmiştir.

3.4.3. Etiket Olarak Kullanılacak Küresel Sitrathlı Altın Nanopartikül Sentezi ve Yüzey Modifikasyonu

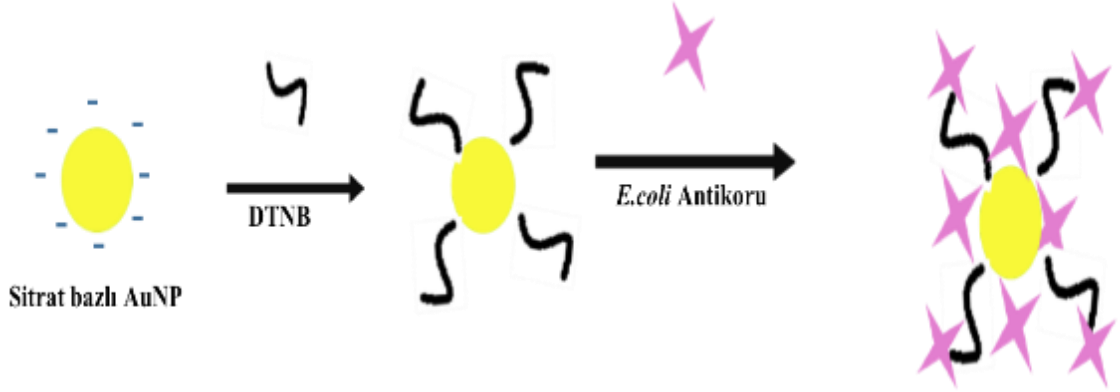
Küresel yapıda altın nanopartikülleri (AuNP) Turkevich metoduna göre sentezlemek için öncelikle kuvvetli bir şekilde karıştırılarak 18 µL % 30 luk H_{AuCl₄} çözeltisi 50 mL'ye distile su ile seyreltilir. Bu çözelti 250 mL lik balonda geri soğutucu altında kaynayanaya kadar ısıtılır. Daha sonra, sabit kaynama ile çözeltiliye 5 mL 40 mM sodyum sitrat çözeltisi eklenir ve renk şarap kırmızısına döndükten sonra 10 dk. daha karıştırma işlemi devam eder. Daha sonra çözelti sıcak yağ banyosundan çıkarılıp, oda sıcaklığında biraz daha olgunlaşması için 15 dk daha karıştırma işlemine devam edilir ve 4 °C'de karanlıkta muhafaza edilir. Sentezlenen altın nanopartiküllerin boyutları Malvern Zetasizer cihazı ile ölçülerek karakterize edilmiştir. Sitrath ile gerçekleştirilen nanopartiküllerin deneysel çalışmaları şematik olarak şekil 3.1'de özetlenmiştir.



Şekil 3.1. Sitrath bazlı altın nanopartiküllerin deneysel çalışmalarının şematik gösterimi.

Sentezlenen sitrathlı bazlı AuNP'ler raman etiket olarak kullanılmak üzere DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) ile modifiye edilmiştir. Bu amaçla AuNP çözeltisinin 1 mL'sine 20 µL, 20 mM DTNB (5,5'-ditiyobis (2-nitrobenzoik asit)) çözeltisi ilave edilir, 650 rpm hızda 1 gün boyunca karıştırılarak DTNB moleküllerinin nanopartikül yüzeyine bağlanması sağlanır. Modifiye partiküller 13000 rpm'de santrifüj edilerek bağlanmayan DTNB molekülleri uzaklaştırılır. 1 ml partikül çözeltisine 100 µl, 35 µg/mL monoklonal *E.coli* antikoruna ilave edilir ve 650 rpm'de 15 dk karıştırılarak antikorların bağlanması sağlanır (Şekil 3.2). Daha sonra spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için antikor bağlı nanopartiküller 100 µL, 1 mg/mL BSA çözeltisi ile 15 dk etkileştirilir. 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilir ve fazla BSA uzaklaştırılır. Antikor bağlı etiketli AuNP'ler 2 mM PBS tamponuna (pH 7.4, %10 sukroz içeren) alınarak konjugasyon pede

yüklenecek oda sıcaklığında kurumaya bırakılır. Daha sonra yatay akış test şeritleri ‘Yatay Akış İmmunoassay (LFIA) Platformunun Hazırlanışı’ bölümünde açıklandığı şekilde oluşturulmuştur. Şeritler tamamen kuruduktan sonra yüzeyde güçlendirilmiş Raman spektroskopisi ile ölçümler alınmıştır (150 mW lazer gücü, 20x objektif, 30 s. uygulama süresi).



Şekil 3.2. Sitrata kaplı altın nanopartikülünün yüzey modifikasyon işleminin şematik gösterimi.

3.4.4. Sentezlenen Altın Nanopartiküllerin SERS Etkileri

Yeni tip nanoparçacıkların üretimi bu parçacıkların yüzey plazmon rezonanslarının farklı olması ve parçacıklardaki toplanma bu parçacıkların yakınında bulunan moleküllerin SERS sinyallerini etkilemektedir. Yapılan çalışmalar farklı optik özelliklere ve yüzey plazmon rezonanslarına sahip nanoparçacıkların SERS etkilerinin farklı olduğunu göstermiştir. Özellikle de anizotropik altın nanoçubuklar, keskin köşelerinden yayılan güçlü elektromanyetik alan nedeniyle buralara yaklaşan moleküllerin SERS sinyallerini güçlü bir şekilde artırmaktadır. Ancak hedeflenen kantitatif bir analiz olduğunda sadece duyarlılığın artırılması yeterli olmaz. Bu durumda kolloidal kararlılıktan tekrar edilebilirliğe kadar çeşitli parametrelerin de dikkate alınması gerekmektedir. Bu nedenle yeni sentezlediğimiz ve parametrelerini optimize ettiğimiz altın nanoparçacıklar arasında, SERS sinyallerini yüksek analitik performansla (yüksek duyarlılık, tekrar üretilebilirlik, doğruluk ve kesinlik gibi analitik parametrelerde) güçlendirebileceğini düşündüğümüz altın nanopartiküller kullanılmıştır. Sentezlenen altın partiküllerin SERS etkileri sıklıkla kullanılan bir Raman etiketi (DTNB) üzerinde test edilmiştir.

3.4.5. Altın Kaplı Demir Oksit Manyetik Nanopartikül Sentezi Ve Yüzey Modifikasyonu

Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin hazırlanması için öncelikle demir (Fe_3O_4) nanopartiküller hazırlanır. Bu amaçla 1.28 M demir-3-klorür (FeCl_3) ve 0.64 M demir sülfat heptahidrat ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) çözeltileri 5'er mL deiyonize su içerisinde çözülerek oda sıcaklığında karıştırılır ve bir süre bekletilir. Bu çözelti üzerine 125 mL 0.1 M sodyum hidroksit (NaOH) bir büret yardımıyla yavaş yavaş eklenerek titrasyon yapılır ve renk dönüşümü gözlemlendikten sonra en az 40 dakika daha oda sıcaklığında iyice karıştırılır. Bu süre sonunda oluşan siyah çökelek bir mıknatıs yardımıyla toplanır ve çökelek üç kez deiyonize su ile yıkanır. Elde edilen siyah kalıntı üzerine 2M perklorik asit (HClO_4) çözeltisinden eklenerek oda sıcaklığında 24 saat karıştırıcıda karıştırılır. Elde edilen bu çökelek çözelti santrifüjlenerek demir nanopartiküller üç kez etanol ile yıkanır ve kurutulur.

Demir nanopartikülleri altın ile yüzeyini ince bir kaplama yapmak için öncelikle 10 mg demir nanopartikülü 5 mL deiyonize suda sonike edilir ve sonikatörde karıştırma işlemi devam ederken üzerine 5 mL 0.27 M EDTA ilave edilerek 2 dakika beklenir. Nanopartiküller bir magnet yardımıyla toplanarak üst faz atılır. Daha sonra bu partiküller üzerine sırasıyla 7 mL 0,1 M CTAB, 3 mL 0.01 M HAuCl_4 ve 300 μL 1M NaOH ilave edilir. Çözelti sonikatörde karıştırılırken üzerine 150 mg katı hidroksilaminklorür eklenir ve iyice karışması beklenir. Bu süre sonunda çözeltinin renginin koyu kırmızıya dönmesi istenir. Altın kaplı manyetik nanopartiküllerin ($\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$) oluşması için oda sıcaklığında 24 saat beklenir ve süre sonunda kullanmadan önce deiyonize su ile üç kez yıkanır.

Manyetik $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ partiküllerin modifikasyonu için öncelikle 1 mL partikül alkol (etanol) içerisine alınarak bir defa yıkanır. Etanol içindeki partiküllerin yüzeyinin 11-merkaptoundekanoik asit (11-MUA) bağlanması için 20 mM derişimde 1 mL çözeltisi hazırlanır ve karıştırıldıktan sonra tiyol ile $\text{Fe}_3\text{O}_4@Au$ arasında kovalent bağ oluşması için 24 saat bekletilir. Süre sonunda 11-MUA'nın aşırısının uzaklaştırılması için pH 6.5 MES tamponu ile iki kez yıkama yapılarak üst faz atılır. Bu işlem sonucunda manyetik nanopartiküller tekrar aynı hacimde pH 6,5 MES tamponuna alınır. Daha sonra 1 mL hacimde 0.05 M NHS ve 0.1 M EDC olacak şekilde belirtilen kimyasallar sırasıyla tartılarak çözelti hazırlanır ve 45 dakika çalkalanarak 11-MUA'nın karboksilik asit

uçlarının aktive edilmesi sağlanır. Daha sonra çözelti santrifüj işlemi ile uzaklaştırılarak 500 µL pH 6.5 MES tamponunda hazırlanmış 1 mg/mL avidin çözeltisi eklenir ve 1 saat süreyle bekletilir. Bu süre boyunca avidin karboksilik asit üzerinden kovalent bağ gerçekleştirmektedir. Çalışmamızda avidin kullanılmasının sebebi antikor oryantasyonunu sağlamak ve antikor üzerindeki biotin ile avidin-biotin etkileşimini sağlamaktır. Manyetik nanopartiküller yıkandıktan sonra üzerine 400 µL, 1 mM biyotinli tavşan antivadisi ilave edilir ve 1 saat süreyle bekletilir. Manyetik nanopartiküller yüzeylerindeki oluşabilecek nonspesifik etkileşimlerin engellenmesi amacıyla 1% (v/v) etanolamin ile 45 dakika muamele edilir. Yıkama işleminden sonra nanopartiküller bakteri tayinine hazırdır.

3.4.6. Demir Manyetik Nanopartiküllerin Altın ve Polietilen İmin ile Kaplanması:

Hazırlanan manyetik nanopartiküller yüksek derecede yük yoğunluğuna sahip bir polimer olan polietilenimin (PEI) kullanılarak altın kaplanacaktır. Burada PEI kullanılmasının amacı hem Au^{+3} 'ün indirgenerek Fe_3O_4 nanopartiküllerin yüzeyine kaplanmasına hem de yapısındaki amin grupları ile antikor immobilizasyona olanak sağlamaktır. Fe_3O_4/Au -PEI nanopartikülleri hazırlamak için, 1,5 ml 0.5 g/ml PEI çözeltisi 2, 5, 7, 10 mg/ml manyetik nanopartikül çözeltileri ve 6 ml distile su çözeltileri ile beraber sıcak su banyosuna yerleştirilir. Sıcaklık tam 90 °C olana kadar ısıtılır. Sıcaklık 90 °C de sabit olduğunu gözlemledikten sonra 10^{-2} M $H AuCl_4$ çözeltisinden 0.2 mL eklenir ve 15 dakika reaksiyonun oluşması için beklenir. $H AuCl_4$ eklendikten sonra rengin biraz şeffaflaşır yaklaşık 20 dk sonra partiküllerin kırmızı renge döndükten sonra oda sıcaklığına kadar soğutulan süspansiyon halindeki partiküller birkaç defa su ve etanol ile yıkanmıştır.. Yıkama işleminden sonra nanopartiküller bakteri tayinine hazırdır.

3.4.7. Farklı Raman Etiketlerinin AuNP Konjugasyonunda Optimizasyonu

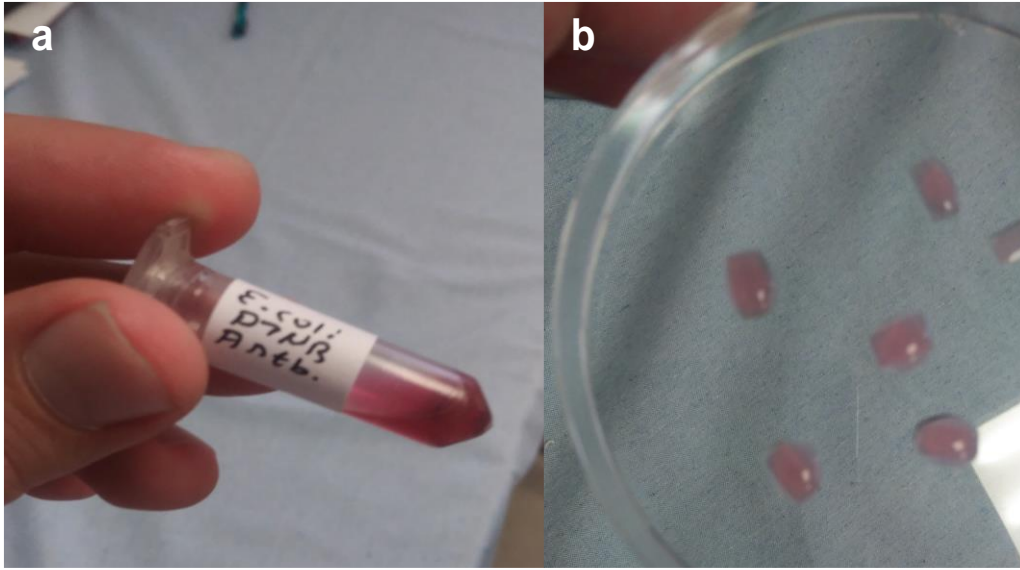
Sentezlenen AuNP lar iki farklı Raman etiketiyle modifiye edilmiştir ve en iyi sonuç veren etiketler kullanılmıştır. Kullanılan Raman etiketleri AuNP çözeltisinde agregasyona neden olmamaları ve en iyi sinyali vermeleri açısından kıyaslanmışlardır. Çalışmada suda çözünen glutatyon ve etanolde çözünen DTNB karşılaştırılmıştır. Tablo 2.1'de altın nanopartiküllerin Raman etiketleriyle modifikasyonuna ilişkin yöntemler aşağıda detaylı olarak açıklanmıştır.

Çizelge 3.1. Karşılaştırılan Raman etiketleri ve özellikleri

Kullanılan Raman etiketi	Çözücü	Konsantrasyon (mM)
DTNB	Etanol	1, 10, 20, 50
Glutasyon	Su	1, 10, 20, 50

DTNB için; 1,5 mL AuNP çözeltisi üzerine 15 µL farklı konsantrasyonlarında hazırlanan DTNB çözeltisi eklenmiş ve 4 °C'de 4 saat boyunca (500 rpm) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 100 µg/mL 100 µL monoklonal antikor çözeltisi eklenmiş ve bir gece boyunca 500 rpm de karıştırılarak inkübe edilmiştir. Daha sonra 13300 rpm de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek süzüntü uzaklaştırılmış ve çökeleklerin üzerine nonspesifik etkileşimleri azaltmak için 1,5 mL %10 luk BSA çözeltisi eklenmiştir. 500 rpm'de 4 °C'de 2 saat karıştırıldıktan sonra tekrar 13300 rpm de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelekler üzerine 300 µL %10 sukroz içeren 2 mM borat tamponu (pH:7,4) eklenmiş ve konjugasyon çözeltisi olarak kullanımına kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.

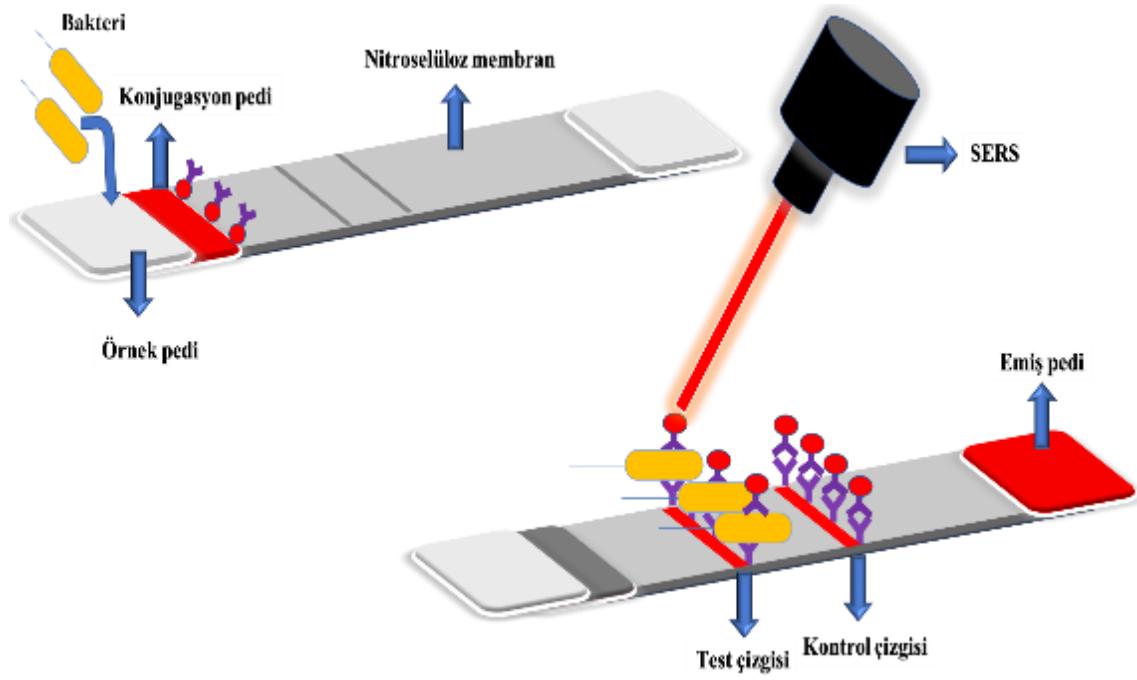
Glutasyon için; 1,5 mL AuNP çözeltisi üzerine 15 µL farklı konsantrasyonlarda hazırlanan glutasyon çözeltisi eklenmiş ve 4 °C'de 4 saat boyunca (200 rpm) karıştırılmıştır. Bu süre sonunda 100 µg/mL 100 µL monoklonal antikor çözeltisi eklenmiş ve bir gece boyunca 200 rpm de inkübe edilmiştir. Süre sonunda 13300 rpm de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek süpernatant uzaklaştırılarak üzerine 1,5 mL %10 luk BSA çözeltisi eklenmiş ve 200 rpm de 4 °C'de 2 saat karıştırılmıştır. Daha sonra 13300 rpm de 4 °C'de 20 dk santrifüj edilerek süzüntü uzaklaştırılmış ve çökelekler üzerine 300'er µL %10 sukroz içeren 2 mM borat tamponu (pH 7,4) eklenmiş ve konjugasyon çözeltisi olarak kullanımına kadar 4 °C'de muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.3. DTNB ile modifiye edilen konjugasyon çözeltilerinin (a) ve konjugasyon pedine emdirilen çözeltilerin (b) görünüşleri.

3.4.8. Yatay akışlı immunoassay striplerinin inşası

Tipik bir yatay akışlı immunoassay yapısı (şekil 4.3) incelendiğinde birbirinden farklı malzemelerden oluşan ve farklı amaçları olan bölgeler görülecektir. Numune stripin yakın ucu numunenin damlatıldığı fiber glass yapıdaki örnek pedi olmak üzere, ilgili bakteriyi yakalamak için modifiye nanopartiküllerin emdirildiği fiber glass yapısındaki konjugasyon pedi, kapiler akışın gerçekleştiği ve antikor çizgilerinin oluşturularak sonucun gözlemlendiği nitroselüloz membran kullanılmıştır. Son bölüm ise stripin son kısmı artan örneğin ve çözeltilerin emildiği absorpsiyon pedidir. Yatay akışlı bir sistemde uygulanan örnek örnek pedi aracılığıyla partikül konjuge edilmiş konjugasyon pedine gelmektedir. Konjugasyon pedinde yaklaşık 20 nm boyutunda sentezlemiş olduğumuz altın nanoküre partiküller bulunmaktadır. Numune (bakteri çözeltisi) kurutulmuş konjugatı harekete geçirir ve bakteri ile etkileşime geçen bu partiküller stripin bir sonraki test bölgesine gelirler. Test bölgesi üzerinde antikor immobilize edilmiş test şeridi ve kontrol şeridi bulunmaktadır. Bu şeritlerin test kısmında ilgili analiti yakalamak için antikorlar, kontrol kısmında ise sistemin çalıştığını doğrulamak için anti-antikorlar immobilize edilmiştir. Sonuçlar partiküllerden gelen renk değişimi ile hem kolorimetrik hem de etiket içeren modifiye altın küreler ile SERS sinyali takibi ile yorumlanmıştır.



Şekil 3.4. Yatay akışlı immuno assay strip yapısı ve SERS ölçümü

3.4.9. Yatay akış immunoassay platformu için test membranı belirlenmesi

Yatay akış immunoassay şeritlerinde kullanılacak en uygun test membranını (nitroselüloz membran) belirlemek için farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla; 5, 8, 10 ve 15 μm gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Daha önce en uygun AuNP olarak belirlenmiş olan %0.01 HAuCl₄ kullanılarak sentezlenen parçacıklar kullanılmıştır. Bahsi geçen sitratlı AuNP'lerden 1'er mL alınarak üzerlerine 20 mM DTNB çözeltisi eklenmiş ve 1 gece inkübe edilmiştir. Daha sonra 13000 rpm'de santrifüj edilerek bağlanmayan DTNB uzaklaştırılmıştır. Çözeltiler cam viyallere alınarak üzerlerine 100'er μL 15 $\mu\text{g/mL}$ monoklonal *E. coli* antikoru (pH 9 borat tamponu içerisinde hazırlanan) ilave edilmiş ve 650 rpm'de karıştırıcıda 20 dk inkübe edilmiştir. Süre sonunda üzerlerine spesifik olmayan bağlanmaları engellemek için 1 mg/mL BSA çözeltisinden 100'er μL ilave edilip tekrar inkübasyona bırakılmıştır. Inkübasyon sonunda 14000 rpm'de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılmıştır. Çökelekler üzerine 2 mM borat tamponu (pH:7.4, %10 sukroz içeren) eklenerek konjugasyon için kullanılmıştır. Elde edilen bu konjugasyon çözeltisi konjugasyon pedlerine emdirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

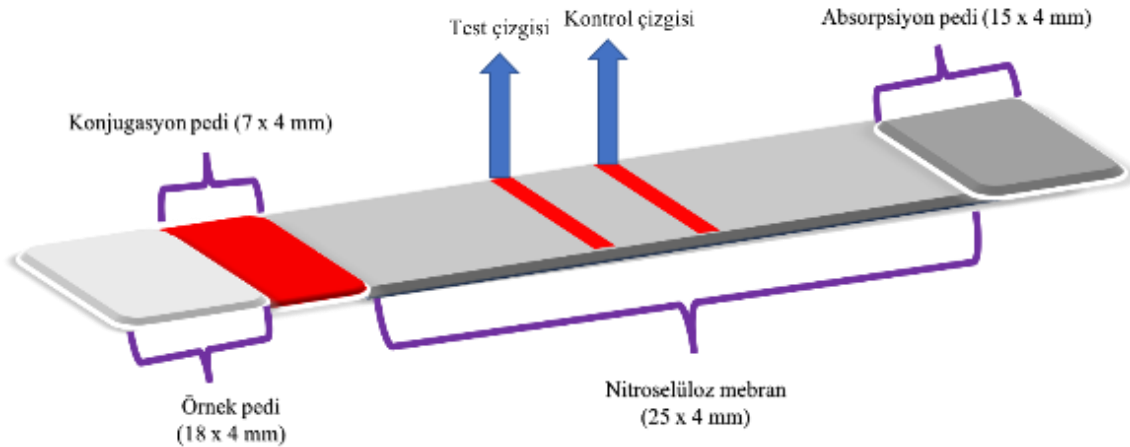
3.4.10. Altın nanopartiküllerin agregasyon testi

Yatay akış immunoassay deneyi için kullanılacak en uygun antikor miktarının belirlenebilmesi için AuNP agregasyon testi yapılmıştır. Bu amaçla, 5'er mL'lik altın nanoparçacık çözeltileri üç değişik pH değerine 10 mM borat tamponu (pH: 7) ve 100 mM borat tamponları (pH: 8 ve 9) eklenerek pH'ları 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Antikor çözeltisi (75'er µL) 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 8, 6, 4, 0 µg/mL olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda suda hazırlanmıştır. Bir 96'lık well plate içerisine değişik pH'larda hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden 150'şer µL eklenmiş (iki tekrarlı) ve üzerlerine her bir kolon, bir konsantrasyondaki antikor çözeltisinden içerecek şekilde 10'ar µL antikor çözeltisi eklenmiştir. Well-plate çalkalayıcıya koyulup 300 rpm de 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğa (0 µg/mL antikor kolonu hariç) 20 µL %10'luk NaCl çözeltisi eklenmiş ve 5 dk daha çalkalayıcıda yüksek hızda çalkalanmıştır. Daha sonra 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçülmüş ve 520 nm ve 580 nm deki değerler alınmıştır. 580 nm'deki absorpsiyon değeri 520 nm'deki değerden çıkarılmış ve elde edilen en yüksek fark, en verimli konjugasyon olarak değerlendirilmiştir.

Sentezlenen AuNPs Raman etiketiyle modifiye edilmiştir. Raman etiketi olarak 5,5-ditiyo-bis-(2-nitrobenzoik asit (DTNB) kullanılmıştır. Bu amaçla 1 mL AuNP çözeltisi üzerine 10 µL 1mM DTNB çözeltisi eklenmiş ve 1 gece boyunca karıştırıcıda (300 rpm) bekletilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 13000 rpm de 10 dk santrifüj edilmiş, üstte kalan süpernatant atılarak çökelek üzerine 1 mL ultradistile su ilave edilmiştir. Elde edilen çözelti cam bir vialle aktarılıp üzerine agregasyon testinde belirlenmiş olan konsantrasyonda (15 µg/mL) 100 µL antikor çözeltisi (suda hazırlanan) sürekli karıştırılarak eklenmiş ve 20 dk boyunca 300 rpm de inkübe edilmiştir. Daha sonra üzerine 100 µL 1mg/mL sığır serum albümin (BSA) çözeltisi sürekli karıştırılarak çözeltilere eklenmiş ve 300 rpm de 20 dk karıştırılmaya devam edilmiştir. Bu süre sonunda çözelti 14000 rpm de 20 dk santrifüj edilmiş ve süpernatant uzaklaştırılarak çökelek üzerine 200 µL 2 mM borat tamponu (pH: 7.4, %10 sukroz içeren) eklenmiştir. Elde edilen çözelti konjugasyon pedine emdirilerek oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır.

3.4.11. Kağıt tabanlı yatay akış immunoassay sisteminin inşa çalışmaları

E. coli bakterisini daha etkin yürütebilmek amacıyla, bu deneyler ışığında örnek pedi 4x18 mm, konjugasyon pedi 4x7 mm, nitroselüloz membran 4x25 mm ve absorpsiyon pedi 4x30 mm veya 4x15 mm ölçülerde (şekil 2.2) hazırlanmıştır. Daha sonra bu malzemeler bir araya gelmeden önce hazırlanan örnek pedleri % 0.5 bovine serum albumin (BSA) ve % 0.05 Tween 20 içeren 10 mM fosfat tamponu (PBS) (pH: 7.4) ile muamele edilmiş ve 60 °C’de 2 saat kurumaya bırakılmıştır.



Şekil 3.5. Kağıt tabanlı yatay akış sisteminin hazırlanması

Tez kapsamında belirtilen antikorların test şeritlerine immobilize edilmesi esnasında antikorların serbest haldeki aktifliklerini sağlamak önemlidir. Buna ek olarak nitroselüloz membran üzerinde antikorların sık bir şekilde dizilmiş olması sistemin hassasiyetini artıracaktır. Ayrıca test çizgisinde bakteri-antikor etkileşmesi için belli bir zamana ihtiyaç duyulmaktadır. Test çizgisindeki bu etkileşme zamanını artırmak amacı ile dopamin molekülünün alkali ortamda okstidatif, kendiliğinden polimerleşmesi özelliği kullanarak nitroselüloz membranlar polimerler ile kaplanmıştır. Bu kapsamda 20 mg ağırlığında nitroselüloz membran kağıt kesilmiş ve kağıt ağırlığı ile 1:1 oranda dopamin tartılarak 10 mM Tris-HCl tamponunda çözeltisi hazırlanmıştır. Kesilen kağıt bu çözelti içerisinde 24 saat süreyle polimerizasyon reaksiyonu için bırakıldı. Kağıt yüzeyinde renk oluşumu dopaminin nitroselüloz membran üzerinde tutunduğunu göstermiştir fakat gerçekleştirilen polimerizasyonun sonucu arzu edilmeyen koyu renk oluşumu nedeniyle test çizgisinin polidopamin ile modifikasyon işleminden vazgeçilmiştir.

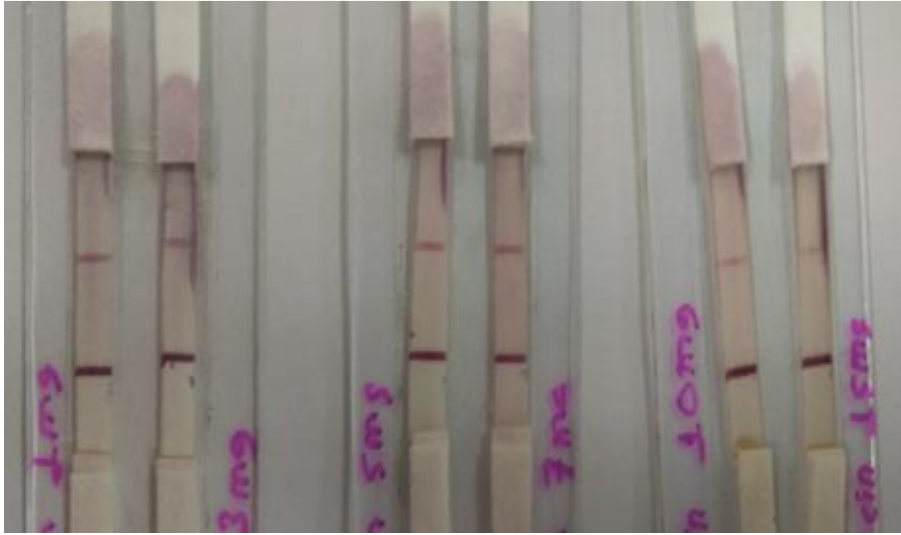
Test bölgesindeki antikorların immobilize edilmesi için nitroselüloz membranlar kullanılmaktadır. Ön çalışmalarda test çizgileri pipet kullanılarak oluşturulmuştur. Fakat

yapılan çalışmalarda en önemli sorunun test çizgisinin akış yönüne doğru kayması görülmüştür. Bu nedenle laboratuvarında pipet kullanılarak test çizgisi oluşturmak yerine şırınga pompaları kullanılarak mikrodispenser inşa edilmiştir (şekil 3.6). Pompalardan biri şırıngasız olarak sadece dikey ekseninde hareket sağlarken diğer pompa istenen antikor çözeltisinin bir şırınga yardımıyla nitroselüloz membran üzerine çizilmesi için kullanılmıştır. Şırıngasız pompa düzeneği üzerine nitroselüloz membranın sabitlenmesi için bir platform yapılmış ve dikey yönde şeritlerin çizilmesi için hareket özelliği kullanılmıştır. İkinci pompa bir şırınga içermektedir ve yüzeye immobilize edilecek antikor çözeltileri bu şırınga yardımıyla akıtılmaktadır. Şırınga bağlı pompanın akış hızı ve akış hacmi optimize edilmiştir. Optimisasyon sonucu birinci pompa hız: 5 μ L/dk ve çap: 2 mm, ikinci pompa: hız 975 mL/dk ve çap: 100 mm olarak belirlenmiştir. Böylelikle dikey test ve kontrol şeritleri nitroselüloz membranlar üzerine 12 mm ve 14 mm uzaklıklarda *E. coli* antikoruna ile test çizgileri çizilmiştir (Şekil 3.6). Daha sonra 10 mM PBS (% 0.5 BSA ve % 0.05 Tween 20 içeren) tamponunda 5 dk bekletilerek spesifik olmayan bağlanmalar bloke edilmiştir. Membranların kesim işlemi bahsedilen çizim ve bloklama işlemlerinden sonra yapılmıştır.



Şekil 3.6. Nitroselüloz membran üzerine antikor çizgilerinin oluşturulması için kullanılan ikili enjektör şırınga sistemi.

Absorpsiyon pedleri ise % 0.5 (BSA) ve % 0.05 Tween 20 içeren 10 mM fosfat tamponu (PBS) (pH: 7.4) ile muamele edilmiş ve 60 °C'de 2 saat kurumaya bırakılmıştır. Bahsedilen tüm hazırlık işlemleri tamamlandıktan sonra *E. coli* tayini için farklı derişimlerde bakteri süspansiyonları steril olarak hazırlanmıştır. Bunun için bir gecelik taze bakteri kültürleri kullanılmış ve seyreltmeler PBS (pH: 7.4) tamponu içerisinde yapılmıştır. Bu amaçla, ilk olarak bakteri yoğunluğu 0.5 McFarland bulanıklık standardına göre ayarlanmış (bu değer yaklaşık $1-2 \times 10^8$ kob/mL'ye karşılık gelmektedir) ve 10^1 kob/mL'ye kadar dilüsyonlar yapılmıştır. Hazırlanan bakteri dilüsyonları (antijen) 150 µL olacak şekilde sisteme verilmiştir. Bu antijenler konjugasyon pedine emdirilmiş olan altı nanopartikül-antikor kompleksiyle birleşerek nitroselüloz membran üzerine çizilmiş olan sabit antikorlarla sandviç modelinde birleşmiştir. Oluşan antikor-antijen-konjugat kompleksi test bölgesi üzerinde kırmızı-pembe renkte bir bant şeklinde görsel olarak belirlenebilmiştir (şekil 3.7).



Şekil 3.7. Test bölgesinde oluşan antikor-bakteri-antijen kompleks bölgesi (kırmızı çizgiler)

Elde edilen kırmızı çizgilerde bakteri varlığını kanıtlamak amacıyla boş yüzeyler ve antikor çizilmiş test bölgesiyle karşılaştırılmalı SEM görüntüleri alınmıştır.

3.4.12. Yatay akış immunoassay platformunun *E. coli* tayininde yapay idrar, referans kan ve ticari süt örneklerinde uygulanması

Geliştirilen yatay akış immunoassay platformlarının gerçek örnek uygulaması için yapay idrar, kan ve süt örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla 900 µL örnek üzerine 100 µL *E. coli*

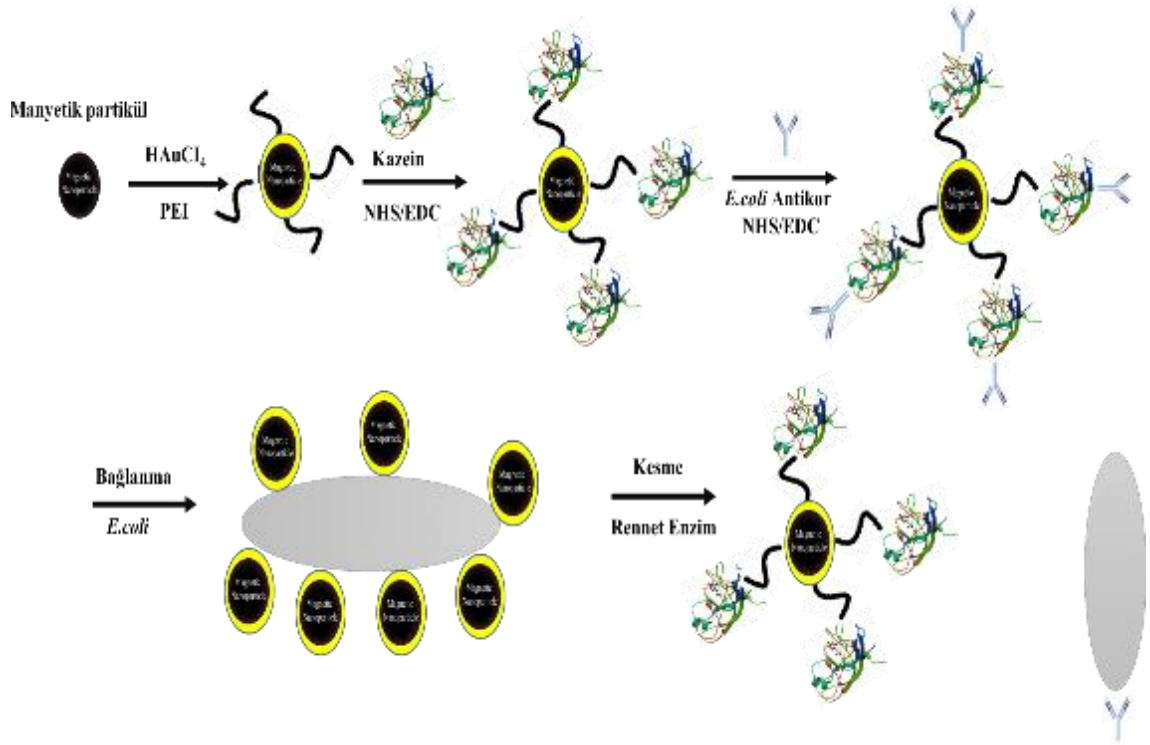
stoklarından farklı konsantrasyonlarda eklenmiştir. Kör çözeltisi için ise yine 900 µL örnek üzerine 100 µL PBS tamponu eklenmiştir. Hazırlanan örneklerden sisteme 75'er µL verilmiş (Şekil 16) ve stripler tamamen kuruduktan sonra test çizgileri Raman spektrometresi ile 300 mW lazer gücü, 10x objektif, 30 s. uygulama süresi kullanılarak ölçülmüştür. Raman ölçümleri için aksi belirtilmedikçe her zaman bu parametreler kullanılmıştır. Her bir ölçüm için en az 5 noktadan 10 farklı noktaya kadar tekrarlı olarak alınmıştır.

3.4.13. Manyetik nanoekstraksiyon sonrası *E. coli* için Yatay Akış İmmunoassay Yöntemi

Yatay akış immunoassay yönteminin daha yüksek performansla *E. coli* analizinde kullanılabilmesi için öncelikle numuneden *E. coli* antikoru ile modifiye edilmiş manyetik nanopartiküller kullanılarak ekstrakte edilmesi, ardından ekstraksiyon aşamasında bakteri ile manyetik parçacıkların bağlantısının kesilerek çıkarılması, son olarak da yatay akış immunoassay şeritlerinde analiz edilmesi hedeflenmiştir (şekil 3.8). Bunun için öncelikle altın ve PEI içeren demir manyetik nanopartiküllerin üzerine kazeinin kovalent immobilizasyonu için karboksilik asit grupları EDC/NHS ile aktifleştirilmiştir. Bu amaçla 5 mg/mL Fe₃O₄/Au-PEI nanopartikül çözeltisine 0.1 g EDC ve 0.3 g NHS ilave edilmiş ve karışım oda sıcaklığında minimum 2 saat boyunca karıştırılmıştır. Bu süre sonunda Fe₃O₄/Au-PEI partiküller mıknatıs yardımıyla toplandıktan sonra üç kez PBS tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır ve tekrar PBS tamponu içerisinde dağıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltiye farklı konsantrasyonlarda kazein çözeltisi eklenmiş ve karışım 24 saat +4 °C'de karanlıkta karıştırılmıştır. Bu süre sonunda Fe₃O₄/Au-PEI partiküller mıknatısla toplandıktan sonra fazla kazeini uzaklaştırmak için PBS tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra bakteri ile etkileşimi sağlamak için *E. coli* antibadisi yine EDC/NHS aktivasyonu ile kovalent olarak kazein proteinine bağlanmıştır. Yıkamalar PBS tampon ile yapıldıktan sonra Fe₃O₄/Au-PEI partiküller bakteri ile etkileşime hazır hale getirilmiştir. Modifiye manyetik partiküller farklı konsantrasyonlardaki bakteri numuneleri ile etkileştirilmiştir. Bir mıknatıs yardımıyla modifiye olmuş Fe₃O₄/Au-PEI partiküller ve etkileşen bakteriler deney tüp içinde toplanmış ve ardından Fe₃O₄/Au-PEI partiküller yıkanarak numune ortamındaki diğer bileşenler uzaklaştırılmıştır. Optimum koşulları ve bunların SERS şiddetleri üzerindeki etkilerini bulmak ve *E. coli* tespiti için DTNB etiketli AuNP'ler, Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküller, kazein ve enzim gibi çeşitli parametrelerin optimum miktarları tespit edildi. DTNB etiketli AuNP miktarlarının (5-30 µL) SERS şiddetleri

üzerindeki etkisi araştırıldı. Kağıt tabanlı yatay akış sisteminin konjugasyon pedinde farklı miktarlarda AuNP'ler immobilize edildi ve test çizgisinde SERS sinyalleri ölçüldü. Fe₃O₄/Au-PEI nanoparçacık miktarlarının (50-500 µL) SERS şiddetleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Optimum Fe₃O₄/Au-PEI nanoparçacık miktarı SERS ölçümleri ile tespit edildi. Kazein miktarlarının (1-15 mg/mL) SERS şiddetleri üzerindeki etkisi de incelenmiştir. Kazein Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerinin yüzeyindeki spesifik hedef bakterileri yakalamak için bir bağlayıcı olarak kullanılmıştır. Kazein, Rennet enzimi (1/16000 ölçekli mikrobiyal peynir mayası) ile Phe105-Met106 peptid bağında spesifik olarak parçalanır. Rennet enzimi *E. coli*'yi manyetik nanoparçacıktan ayırmak için kazeini keserek, serbest bakterilerin manyetik bir alanla kazein içeren manyetik parçacıktan ayrılması ve bir SERS bazlı kağıt test şeritleri ile tespit edilmesi sağlanmıştır. Rennet enzim miktarlarının (1-10 µL) SERS şiddetleri üzerindeki etkisi araştırıldı. Fe₃O₄/Au-PEI nanopartikülleri bakteri konjugatlarına farklı miktarlarda enzim hedef bakterilerden manyetik nanoparçacıkları ayırmak için eklenmiştir. Bakteriler yatay akış immün sisteminde test çizgisi üzerindeki hedef antibadi ile etkileştikten sonra oluşan kırmızı çizgilerden SERS spektrumları kaydedildi.

Yöntemin seçiciliği için *E. coli* K12 ile birlikte *Salmonella enteritidis*, *Bacillus subtilis*, *Micrococcus luteus* gibi çeşitli bakterileri manyetik nanoekstraksiyon uygulandıktan sonra test şeritlerinde analiz edilerek test edilmiş ve SERS spektrumları ölçülmüştür. Ardından farklı derişimlerde *E. coli* içeren örnekler yukarıda anlatıldığı şekilde manyetik nanoekstraksiyon metodu ile ekstrakte edilmiş ve test şeritlerine uygulanmıştır. Optimum değerler belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki (10¹-10⁷ kob/mL) bakteri örneklerine yöntem uygulanmış SERS spektrumları ölçülmüştür. *E. coli* konsantrasyonları ile 1335 cm⁻¹'deki pik şiddeti arasındaki ilişki doğrusallığın öngörülmesinde ve determinasyon katsayısı (R²) hesaplanmasında kullanılmıştır. Algılama Sınırı (Limit of Detection, LOD) ve Kantitatif Ölçme Sınırı (Limit of Quantitative Measurement, LOQ) değerleri lineerliği tanımlayan kalibrasyon eğrilerinden hesaplandı. Kalibrasyon için kullanılacak bu deney üç farklı günde farklı örnekler kullanılarak tekrarlanmıştır. Son olarak örnekler içerisine 10⁴, 10⁵ ve 10⁶ kob/mL *E. coli* eklenerek yöntemin uygulanması gerçekleştirilmiştir. *E. coli* konsantrasyonları ile 1335 cm⁻¹'deki pik şiddeti arasındaki ilişkiyi göstermek için test çizgisi üzerinden en az 5 spektrum alınarak haritalandırma yapıldı.



Şekil 3.8. $Fe_3O_4/Au-PEI$ partiküllerinin *E. coli* için nanoekstraksiyon basamakları.

4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

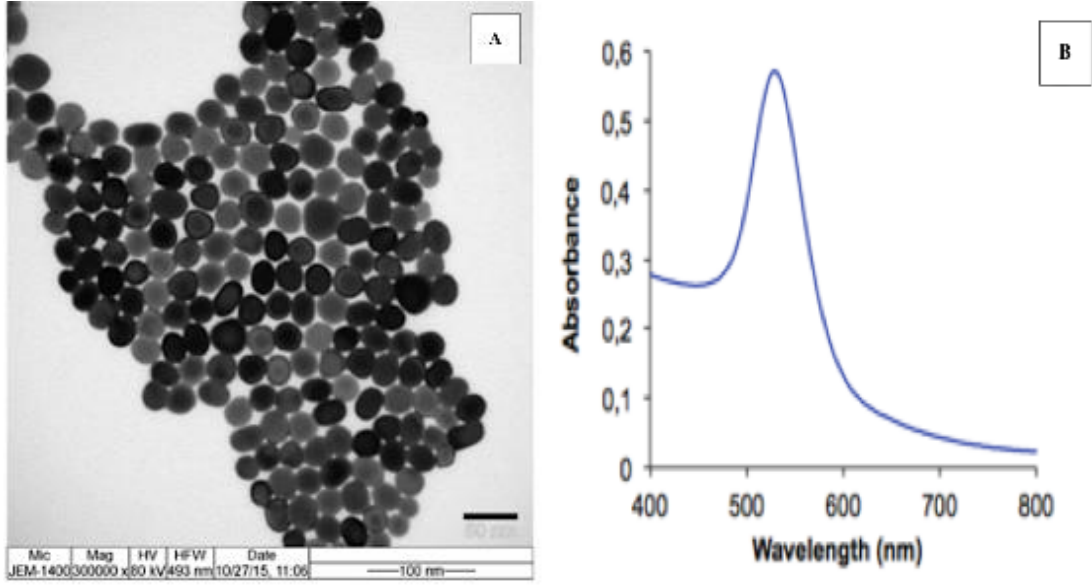
4.1. Manyetik ekstraksiyona dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem

Manyetik nanopartiküller kullanılarak ilgili bakteriyi ortamdan ekstraksiyon ederek kağıt tabanlı sistem üzerinde uygulanması sonucunda kolorimetrik ve kantitatif analiz yöntemi geliştirildi. Tüm optimizasyon, validasyon ve gerçek örnek denemeleri aşağıda detaylı olarak verildi.

4.1.1. Benzalkonyum klorür temelli altın nanopartikül karakterizasyonu

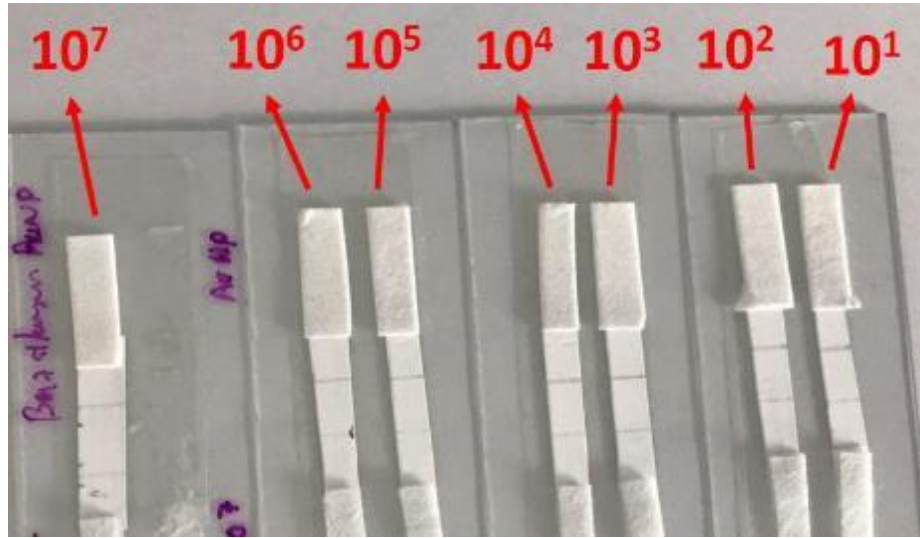
Kağıt tabanlı yatay akışlı immunoassay sistemlerin konjugasyon etkileşiminde rol oynamak üzere ilk olarak benzalkonyum klorür ile nanopartiküller sentezlenmiştir. Bu partiküllerin sentezinde ilk olarak benzalkonyum klorür miktarı optimize edilmiştir. Benzalkonyum ile sentezlenen altın nanopartiküllerinin TEM fotoğrafları ve UV spektrumları şekil 4.1’de verilmiştir.

Benzalkonyum klorür farklı miktarları kullanıldığında küp, küre ve çubuk şeklinde partikül oluşumları gözlenmiştir. Tohum olgunlaşma esnasında kullanılan sufaktan madde miktarı partikülün şeklini etkilemektedir. Seed nanopartiküllerin gelişmesi sırasında tohum altın nanopartiküller çekirdekleşme merkezi olarak davranmakta ve ortamda serbest olarak bulunan altın iyonları bu çekirdekleşme merkezine yaklaşarak indirgenmekte küp, küre ve çubuk yapısına sahip nanopartiküller elde edilmektedir. Kağıt tabanlı yatay akış sisteminde küresel şekilli AuNP’ler kullanılarak test striplerinde kolorimetrik olarak (şekil 4.2) başarılı bir bakteri algılama gözlemlenmesine rağmen raman etiketi olarak kullanılan DTNB ile yapılan çalışmalarda kantitatif olarak uygun kalibrasyon grafiği elde edilememiştir.

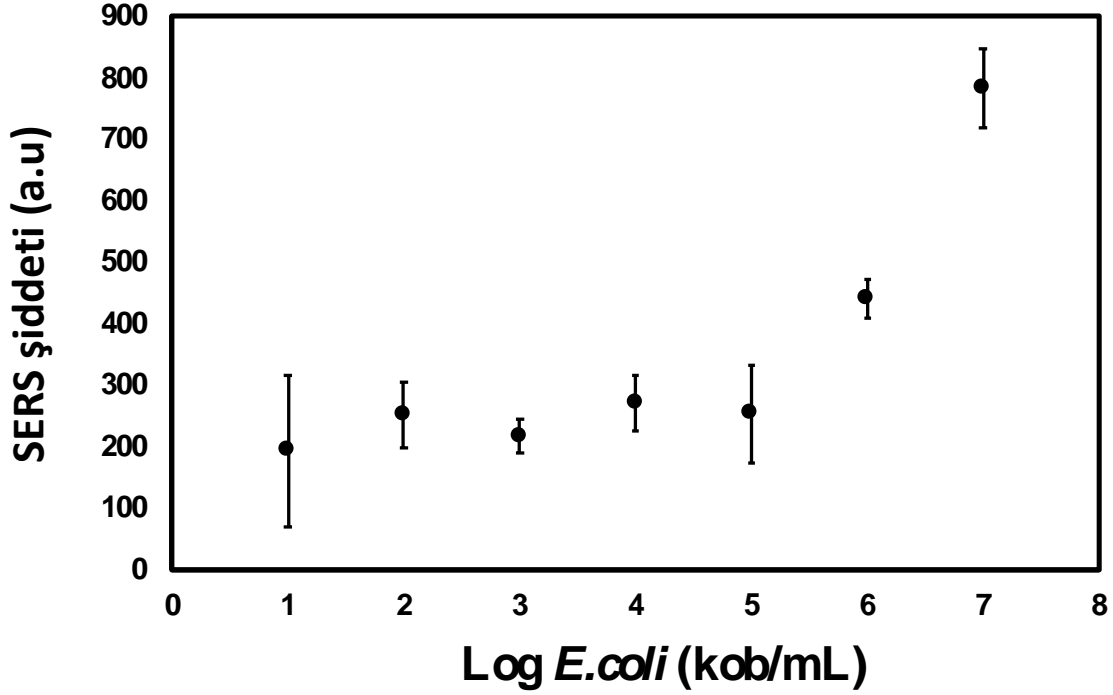


Şekil 4.1. Benzalyum klorür AuNP'lerin A) TEM ve B) UV sonuçları.

Kalibrasyon grafiğinin başarılı olmamasındaki etken yüksek intensite değerleri elde edilemediği için bakterilerde yüksek konsantrasyondan düşük konsantrasyona doğru gidildikçe duyarlılığın düşük olması elde edilen piklerin çakışmasına neden oldu (şekil 4.3).



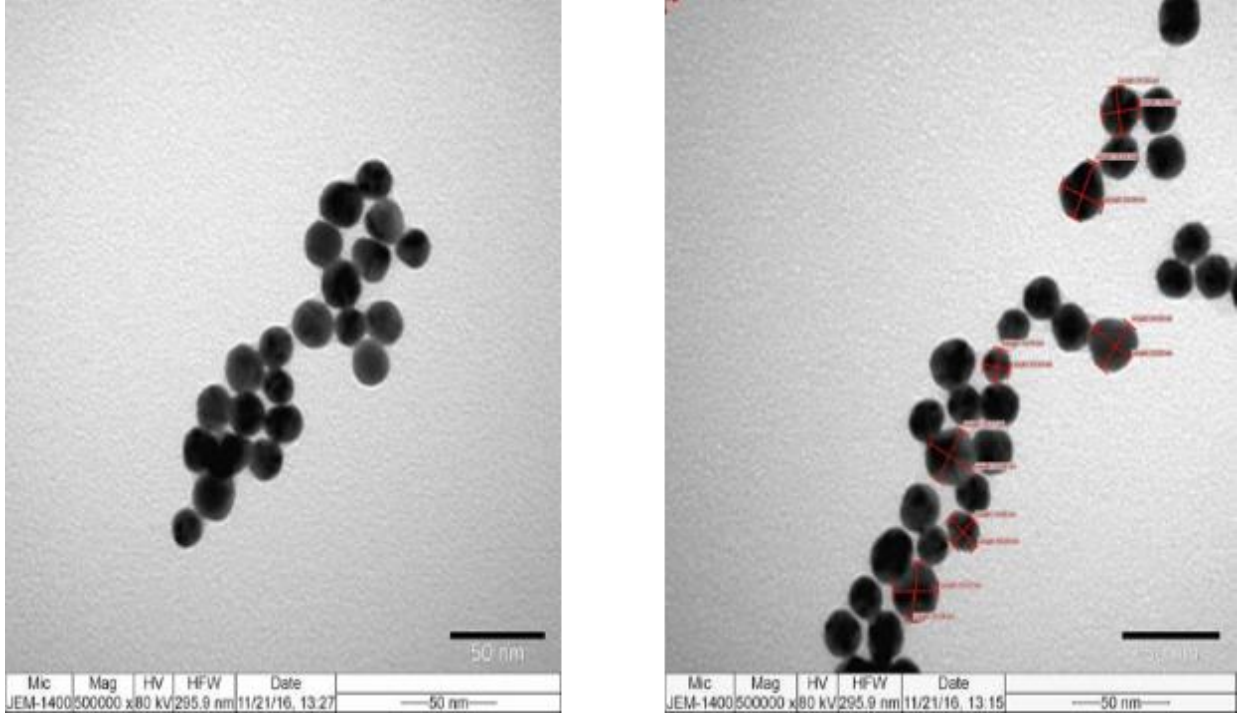
Şekil 4.2. Benzalkonyum klorür ile sentezlenen altın nanopartiküllerin yatay akışlı immunoassay sistemi.



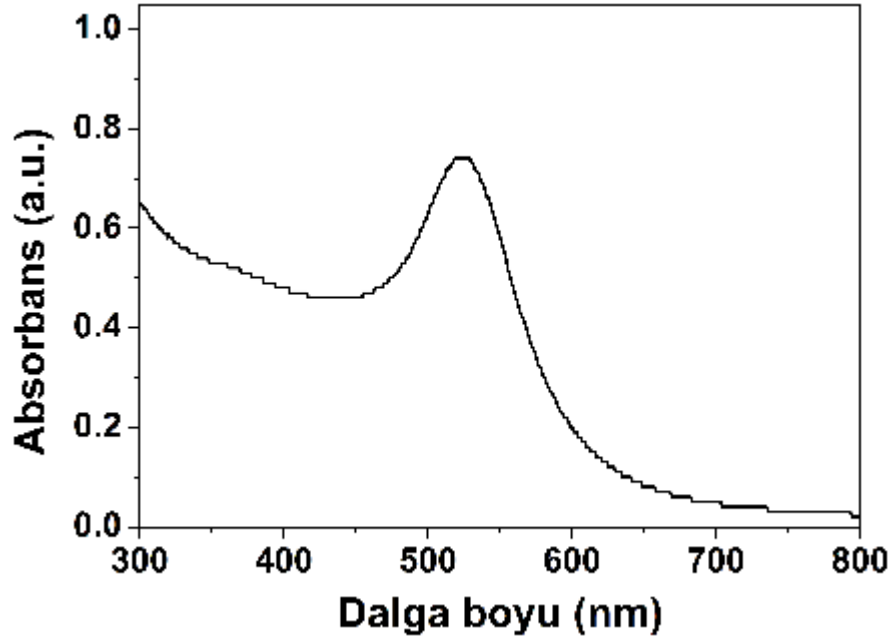
Şekil 4.3. DTNB ile modifiye edilen benzalkonyum temelli AuNPs'in NO₂ gerilme piklerinden elde edilen SERS kalibrasyon grafiği.

4.1.2. Sitrat varlığında AuNP sentezi ve optimizasyon çalışmaları

Au nanoparçacıklar Turkevich metoduna göre sentezlenmiştir. Bu amaçla öncelikle 18 uL stok HAuCl₄ solüsyonu 50 mL distile su içerisinde sürekli karıştırılarak, 250 mL lik balonda geri soğutucu altında kaynayana kadar ısıtılmıştır. Kaynadıktan sonra 5 mL 40 mM sodyum sitrat çözeltisi eklenmiş ve renk kırmızıya döndükten sonra 10 dk. daha kaynatılmıştır. Daha sonra çözeltiler sürekli karıştırılarak oda sıcaklığına soğutulmuş ve 4 °C'de karanlıkta muhafaza edilmiştir. Sitratlı ortamda sentezlenen sitratlı AuNP'lerin yaklaşık olarak 20 nm boyutunda ve monodispers dağılımlı olarak elde edilen partiküllerin TEM görüntüleri şekil 4.4'de ve UV-görünür bölge absorpsiyon spektrumunun 525 nm plazmon bandı içerdiği şekil 4.5'de görülmektedir.



Şekil 4.4. Sitrallı Altın nanopartiküllerin TEM görüntüsü.

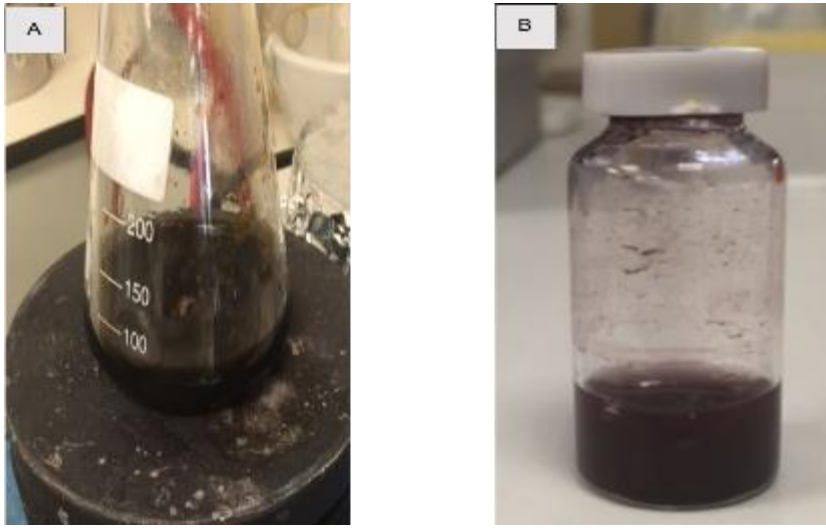


Şekil 4.5. Sitrallı Altın nanopartiküllerin UV-vis spektrumu.

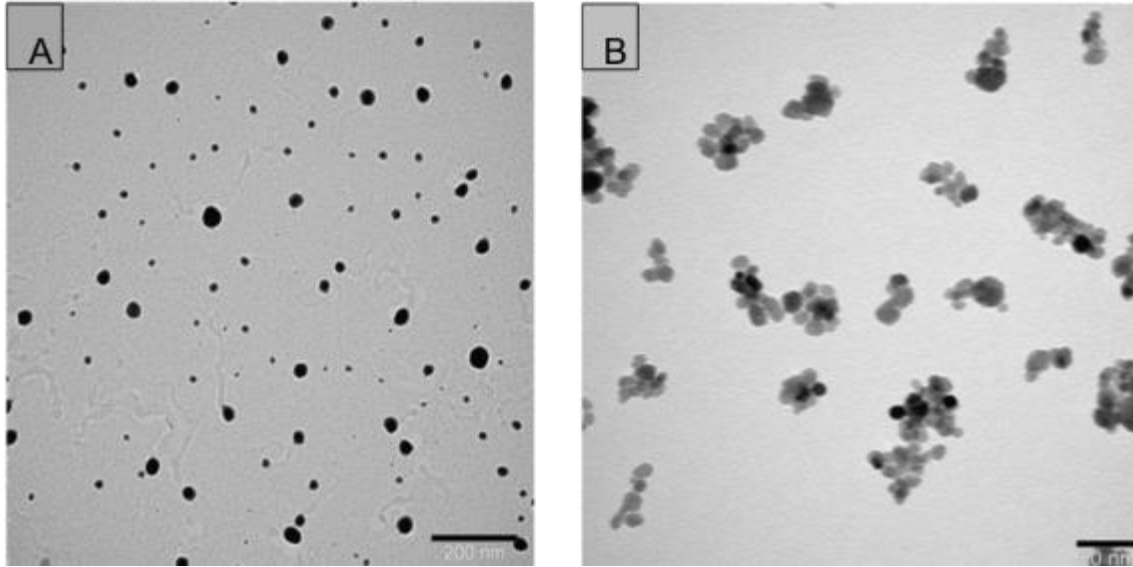
4.1.3. $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ partiküllerinin sentez ve karakterizasyonu

Fe_3O_4 nanopartiküller manyetik özelliklere sahip olup, Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının oranı alkali çözelti içerisinde 1/2 oranında tutularak, bu iyonların termal olarak birlikte çöktürme yöntemi ile sentezi yapılmıştır. Reaksiyonlar argon atmosferinde

gerçekleştirilmiştir böylece Fe^{2+} ve Fe^{3+} iyonlarının oksidasyonunu ve yan reaksiyonların oluşumu engellenmiştir. Şekil 4.6'da sentezlenen Fe_3O_4 nanopartiküller ve $Fe_3O_4/Au-PEI$ partiküllerinin görüntüleri gösterilmiştir ve şekil 4.7'de elde edilen nanopartiküllerin TEM görüntüleri bulunmaktadır. $Fe_3O_4/Au-PEI$ partiküllerinin ortalama büyüklükleri yaklaşık olarak 20 nm boyutunda monodispers dağılım göstermişlerdir. Farklı Fe_3O_4 nanopartikül derişimlerinde yapılan sentez çalışmalarında en iyi sonuç 5 mg/mL olarak belirlendi. 2 mg/mL konsantrasyonda yapılan denemede renk siyah olarak gözlemlendi, 10 mg/mL derişimdeki partiküllerin TEM sonuçlarında agregasyon çok fazla olmasından dolayı tercih edilmedi.

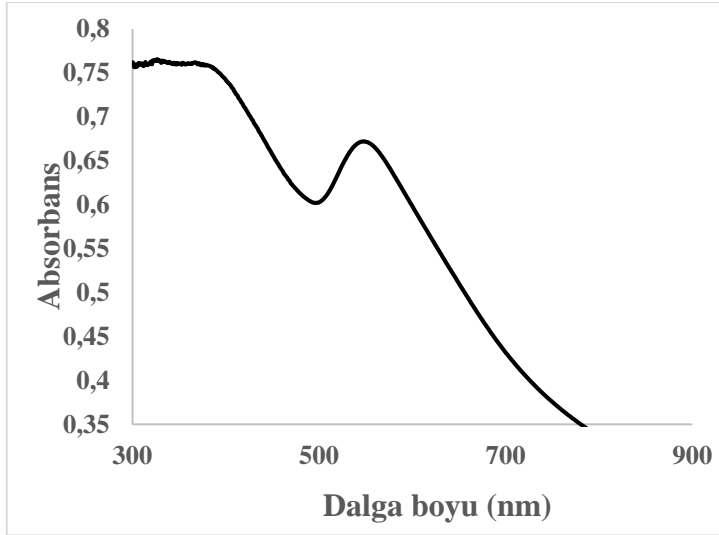


Şekil 4.6. A) Fe_3O_4 nanopartiküller B) $Fe_3O_4/Au-PEI$ NPs.



Şekil 4.7. TEM sonuçları: A) Fe_3O_4 B) $Fe_3O_4/Au-PEI$ nanopartikülleri.

Şekil 4.8’de Fe₃O₄/Au-PEI partiküllere ait UV-Vis spektrumları görülmektedir. UV-Vis spektruma bakıldığında altın kaplı PEI içeren manyetik nanopartikülünün 530 nm civarında tipik küresel nanopartiküllerine ait absorpsiyondan kaynaklanmakta olan bir plazmon bandına sahip olduğu görülmektedir.



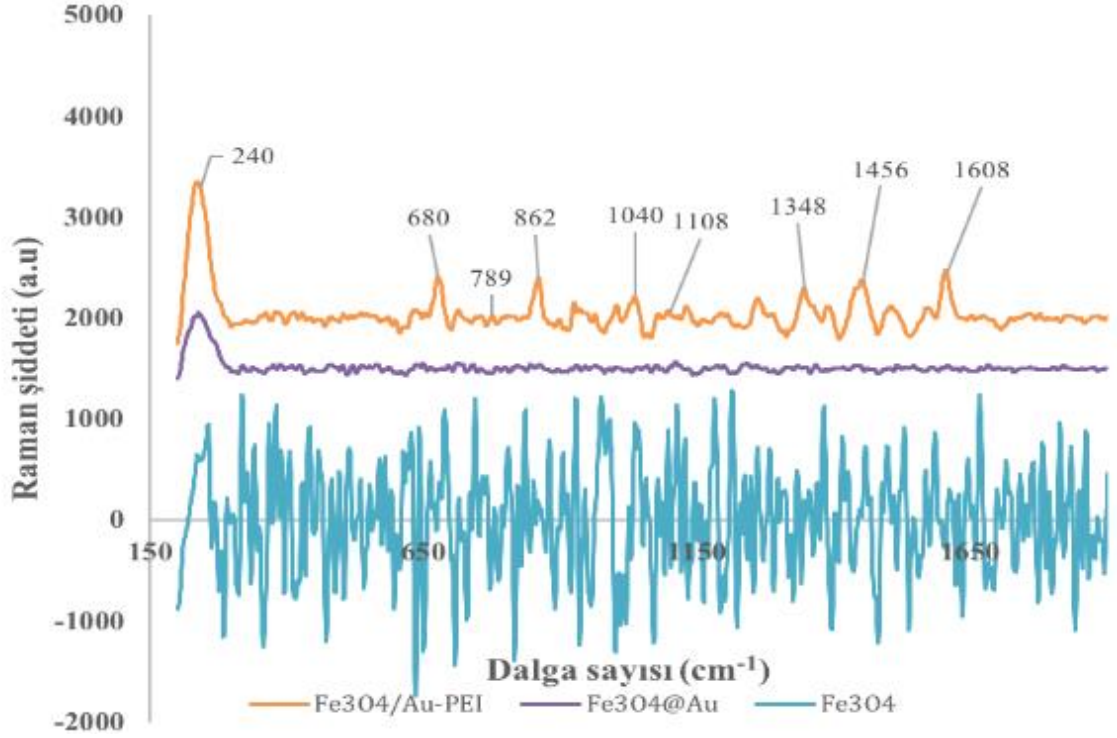
Şekil 4.8. Fe₃O₄/Au-PEI partiküllerinin UV-Vis spektrumu.

Çizelge 4.1’de referans [mendeles] olarak verilen 50 %’lik (ağırlık / hacim) saf PEI çözeltisinin yapılan titreşim bantlarının temel ana bant değerleri verilmiştir. % 50 (w/v) PEI spektrumları: -CH₂-CH₂- 788 ve 877 cm⁻¹’de sallanma titreşim hareketleri; 1067, 1112 ve 1305 cm⁻¹’de CH₂ sallanma ve bükülme hareketleri; 1456 cm⁻¹’de CH₂ bükülme modu; 1602 cm⁻¹’de NH₂ bükülme bandı; 2854 ve 2923 cm⁻¹’de CH simetrik / asimetric gerilme modları; ve 3309 cm⁻¹’de NH germe bandı olduğu bildirilmiştir. Yapılan çalışmada sentezlenen Fe₃O₄, Fe₃O₄@Au, ve Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküller arasındaki bağlanma bilgilerini araştırmak için SERS kullanılmıştır. Şekil 4.9’da SERS spektrumları gösterilmiştir. SERS moleküler titreşimler hakkında bilgi verdiği için elde edilen partiküllerin tanımlanmasında büyük rol oynamaktadır. Saf PEI için verilen raman spektrumlar 1456, 1305 ve 788 cm⁻¹’de ortaya çıkan bantlar yukarıdaki bilgiler kapsamında CH₂ bükülmesi (CH₂), metilen grubunun (CH₂) sallanma ve titreşim bantlarıdır. 1600 ve 1080 cm⁻¹’deki diğer bantlar, amin bükülmesine (NH₂) ve amin gerilmesine (NC₃) bağlandı. Fe₃O₄ partiküllerin SERS sonucunda gürültü tarzında bir spektrum elde edilmiştir. Fe₃O₄@Au partikülleri 240 cm⁻¹’de tek bir spektrum göstermektedir muhtemelene demir partiküllerin yüzeyini kaplayan altından kaynaklanmaktadır. Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerin SERS sonuçları yukarıda verilen temel spektrum bilgileri ile örtüşmektedir. Özellikle 1456 cm⁻¹’de CH₂ bükülmesinden

kaynaklı spektrum ve ayrıca 1608 ve 1040 cm^{-1} 'de NH_2 bükülme titreşimsel hareketlerinden kaynaklanan pikler elde edilmiştir. 789 ve 862 cm^{-1} 'de sallanma titreşim hareketleri; 1040, 1108 ve 1348 cm^{-1} 'de CH_2 sallanma ve bükülme hareketlerinden kaynaklı elde ettiğimiz spektrumlar üst kısımda verilen değerler ile karşılaştırıldığında spektrum değerlerinde kaymalar görülmüştür. SERS piklerinde görülen kaymaların altında yatan sebep altın metal yüzeyi ve üzerini kaplayan PEI'nin etkileşiminden dolayı NH_2 gruplarının oluşturduğu protonasyon durumundan kaynaklanmaktadır.

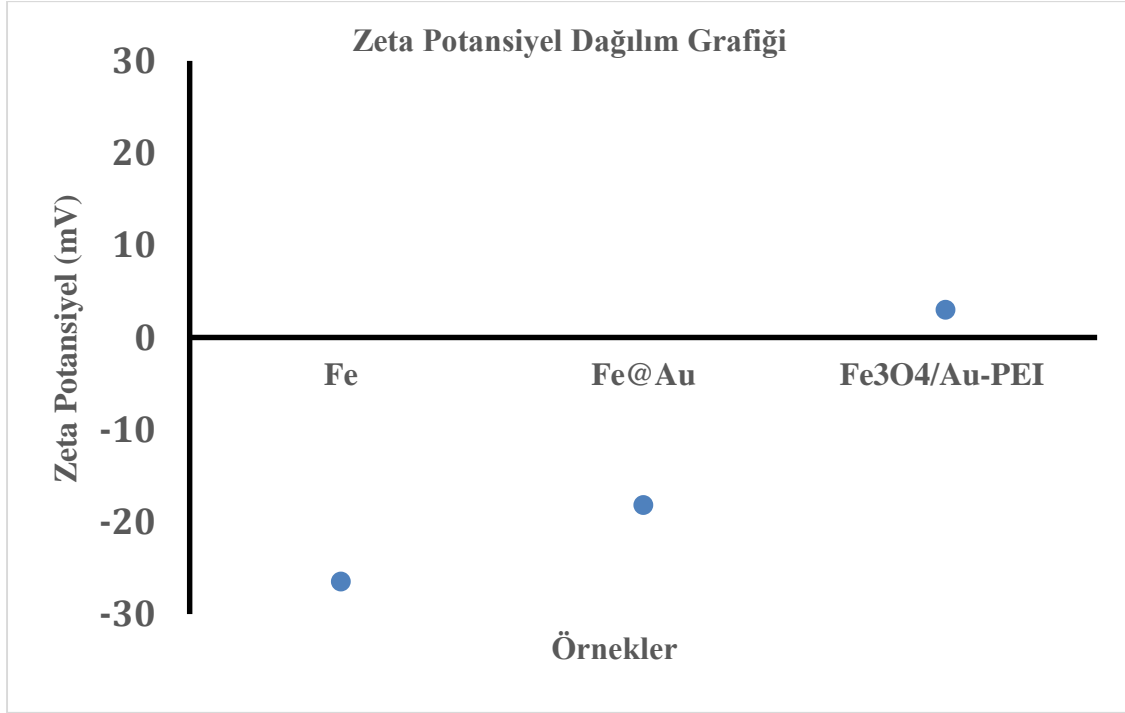
Çizelge 4.1. PEI çözeltisinin raman spektrumunun titreşimsel modları [181].

PEI (cm^{-1})	Titreşimsel modları
788	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ sallanma
877	$-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ sallanma
1034	NH_2 düzlem içi sallanma
1067	CH_2 sallanma ve bükme
1112	CH_2 sallanma ve bükme
1383	C-N gerilme
1456	CH_2 bükülme
1601	NH_2 bükülme
2854	CH simetrik gerilme
2923	CH asimetrik gerilme
3309	NH gerilme



Şekil 4.9. Fe₃O₄/Au-PEI, Fe₃O₄@Au, ve Fe₃O₄ nanopartiküllerinin SERS grafikleri.

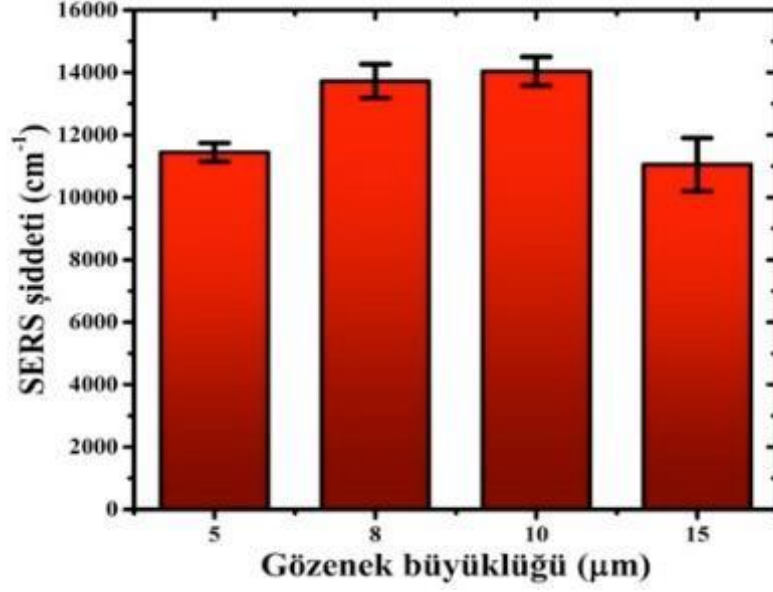
Poliyetenimin altın kaplı manyetik partiküllerinin zeta potansiyel sonuçları şekil 4.10 da gösterilmiştir. Zeta potansiyel ölçümlerinin temel mantığında partiküllerin birbirlerini itme ve çekme değerlerinin belirlendiği ve böylece elektrostatik olarak partikül yüzey dağılım hakkında bilgi vermektedir. Sentezlenen partiküllerimizin kademeli olarak yapılan zeta potansiyel denemelerinde ilk olarak Fe₃O₄ partiküllerinin davranışından başlayarak diğer partiküllerin yüzeyde oluşan yüzey dağılımlarını gözlemledik. İlk olarak Fe₃O₄ partiküllerinin kayma yüzeylerindeki zeta potansiyel ölçümleri negatif yüklü (-25 mV) bir dağılım oluşturdu. İkinci olarak, altın kaplı demir partiküllerinin ölçümleri yapıldı ve zeta potansiyel değeri pozitif yöne doğru bir etkileşim oluşturdu. Son olarak polietilen iminin yapısında ihtiva ettiği amin gruplarının etkisi ile elde edilen partikülün zeta potansiyel yüzey dağılım pozitif yükten dolayı artı zeta potansiyel değerlerini elde etti. Ölçülen zeta potansiyel değerleri sentezlenen Fe₃O₄/Au-PEI NPs'inin yüzeyinde oluşan NH₂ grupları karakterizasyon sonuçları kapsamında elde edilen partiküllerin başarılı olduğunu göstermektedir.



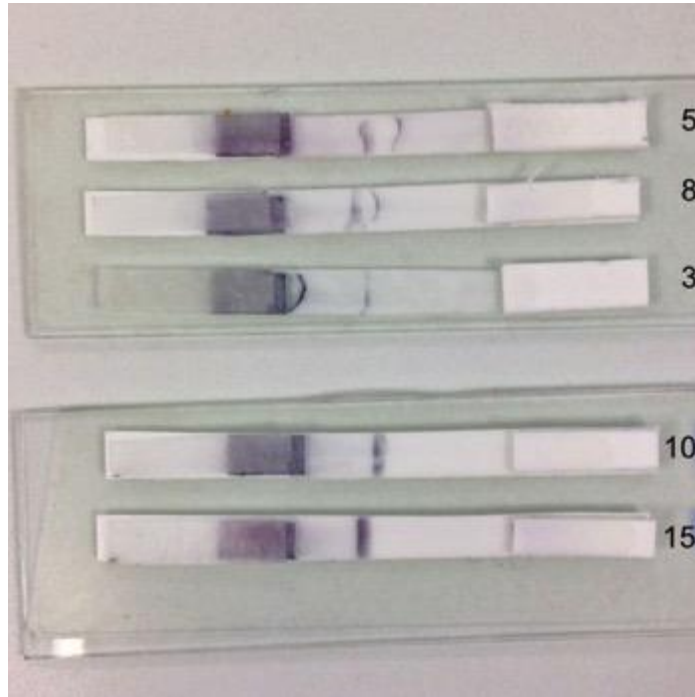
Şekil 4.10. Fe₃O₄/Au-PEI, Fe₃O₄@ Au, Fe₃O₄ nanopartiküllerinin zeta potansiyel değişim değerleri.

4.1.4. Nitroselüloz membranda gözenek büyüklük etkileşimleri

Yatay akış immunoassay şeritlerinde kullanılacak en uygun test membranını (nitroselüloz membran) belirlemek için farklı gözenek boyutlarına sahip membranlar kullanılarak optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Bu amaçla; 5, 8, 10 ve 15 µm gözenek büyüklüğüne sahip nitroselüloz membranlar kullanılmıştır. Daha sonra yatay akış test şeritleri ‘Yatay Akış İmmunoassay Platformunun Hazırlanışı’ bölümünde açıklandığı şekilde oluşturulmuştur. Her bir test şeridi için 10³ *E. coli* konsantrasyonu kullanılarak bakteri örnekleri (100’er µL) sisteme verilmiştir. Şeritler tamamen kurduktan sonra SERS ölçümleri alınmıştır. Elde edilen veriler ışığında en uygun membranın 10 µm gözenek büyüklüğüne sahip olan membran olduğu gözlemlenmiştir (Şekil 4.11). Şekil 4.12’de kağıt tabanlı sistemde yürütülen altın nanopartiküllerin görüntüsü verilmiştir.



Şekil 4.11. Nitroselüloz membran optimizasyonundan elde edilen SERS şiddetleri.

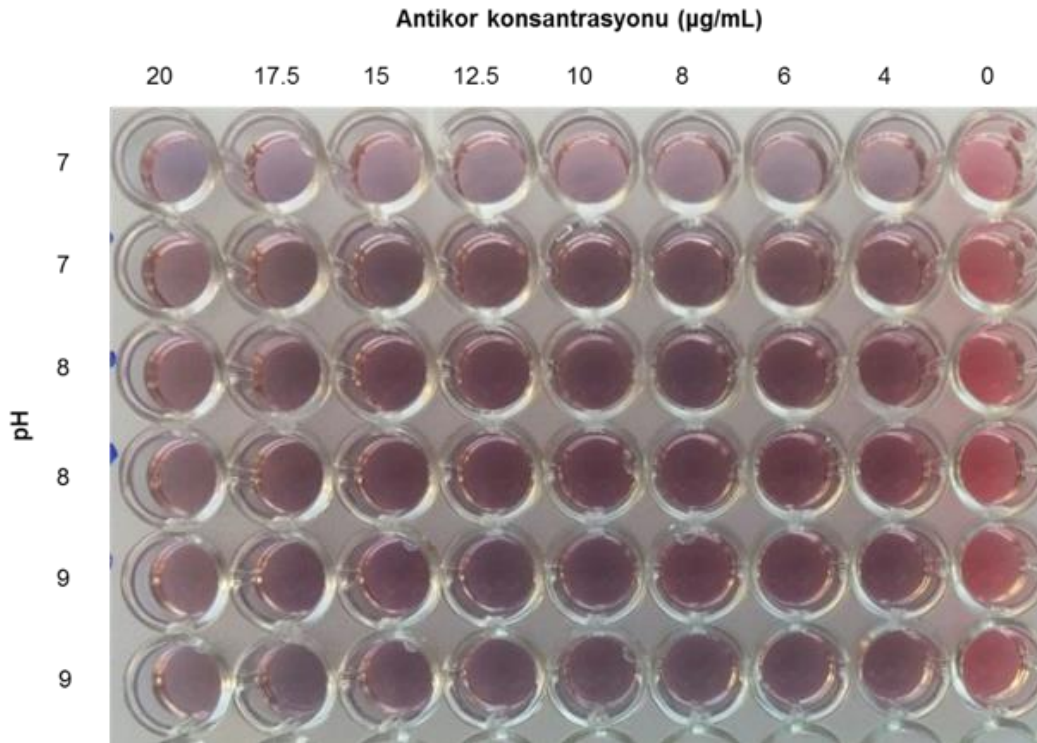


Şekil 4.12. Nitroselüloz membran optimizasyonu deneylerinden elde edilen görüntüler.

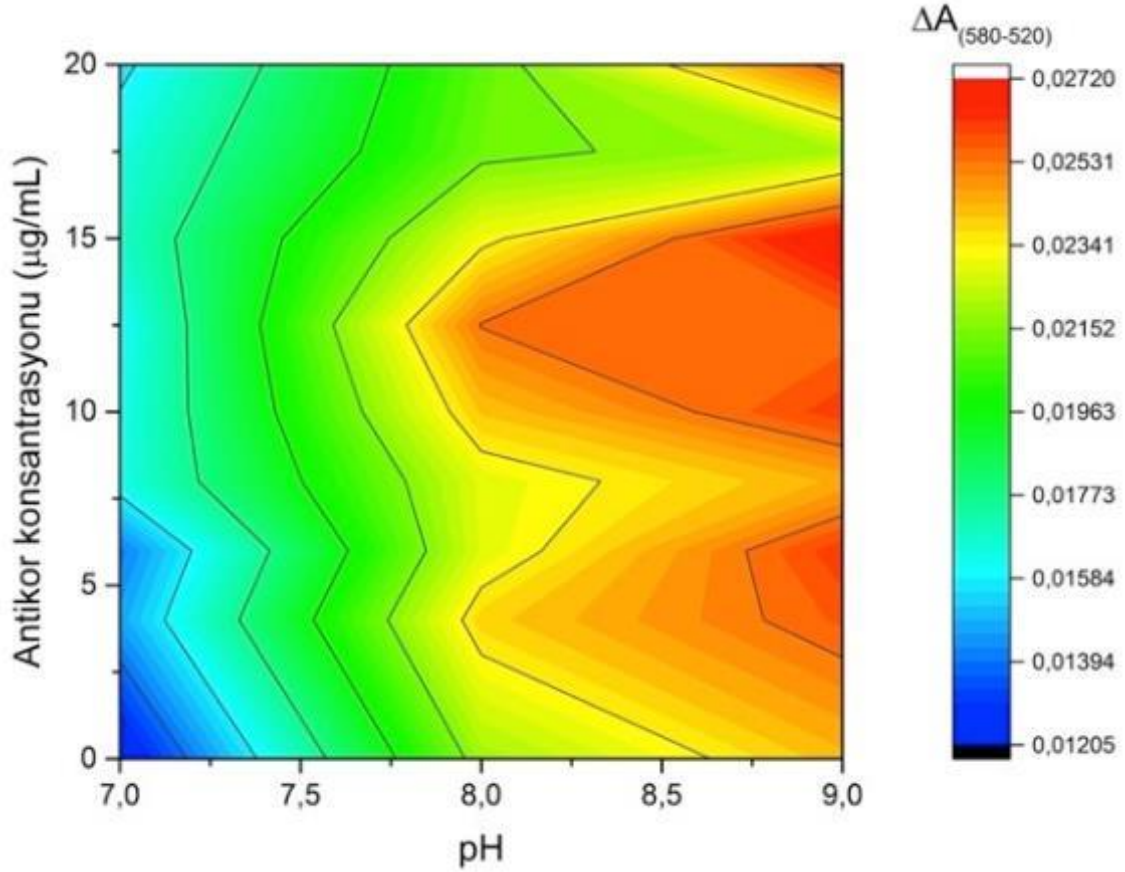
4.1.5. Altın nanopartikül agregasyon testi

Konjugasyon pedinde kullanılacak altın nanopartikül üzerindeki en uygun antikor miktarını saptamak için agregasyon testi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4.13). Bu amaçla, 5'er mL'lik altın nanoparçacık çözeltileri üç değişik pH değerine 10 mM borat tamponu (pH:

7) ve 100 mM borat tamponları (pH: 8 ve 9) eklenerek pH ları 7, 8 ve 9'a ayarlanmıştır. Antikor çözeltisi (75'er μL) 20, 17,5, 15, 12,5, 10, 8, 6, 4, ve 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olacak şekilde değişik konsantrasyonlarda suda hazırlanmıştır. Bir 96'lık plaka (well plate) içerisine değişik pH larda hazırlanmış olan AuNP çözeltilerinden 150'şer μL eklenmiş (iki tekrarlı) ve üzerlerine her bir kolon, bir konsantrasyondaki antikor çözeltisinden içerecek şekilde 10'ar μL antikor çözeltisi eklenmiştir. Örnekler çalkalayıcıya koyulup 300 rpm de 20 dk boyunca çalkalanmıştır. Süre sonunda her bir kuyucuğa (0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ antikor kolonu hariç) 20 μL %10 luk NaCl çözeltisi eklenmiş ve 5 dk daha çalkalayıcıda yüksek hızda çalkalanmıştır. Daha sonra 400-600 nm aralığındaki absorpsiyon spektrumları ölçülmüş ve 520 nm ve 580 nm deki değerler alınmıştır. 580 nm'deki absorpsiyon değeri 520 nm'deki değerden çıkarılmış ve elde edilen en yüksek fark, en verimli konjugasyon olarak değerlendirilmiştir. Yürütülen deney sonucunda en uygun pH 9, antikor konsantrasyonu ise 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ olarak bulunmuştur (Şekil 4.14). Tüm deney boyunca elde edilen bu pH daki AuNP ve belirlenen konsantrasyondaki antikor konjugasyon için kullanılmıştır.



Şekil 4.13. AuNP agregasyon denemeler sonunda elde edilen kolorimetrik görüntü.



Şekil 4.14. Agregasyon pH bağımlı test sonuçları [182].

4.1.6. Farklı Raman Etiketleri ile altın nanopartikül modifikasyonu

Hazırlanan konjugasyon çözeltileri konjugasyon pedlerine 5 sn emdirilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Yatay akış immunoassay platformları hazırlanıp *E.coli* örnekleri sisteme verilmiş ve Raman spektroskopisi (SERS) ile test çizgileri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda 20 ve 50 mM DTNB içeren çözeltilerde agregasyon gözlemlenmiş, 1 ve 10 mM DTNB içeren çözeltilerde ise agregasyon gözlemlenmemiştir. Glutatyon kullanılan çözeltilerin ise hiçbirinde agregasyon gözlemlenmemiştir. Ancak glutatyon ile hazırlanan konjugasyonların kullanıldığı örneklerde tüm konsantrasyonlardaki SERS sinyalleri çok düşük çıkmıştır. Bunun nedeni glutatyonun Raman sinyallerinin DTNB'ye kıyasla düşük olmasından kaynaklanmaktadır. Bu nedenle etiket olarak DTNB kullanımına karar verilmiştir. 1 mM DTNB içeren konjugasyon çözeltisi kullanılan örneklerde sinyallerin yeterince yüksek olması ve daha az madde sarfiyatı için 1 mM DTNB konsantrasyonu tercih edilmiştir.

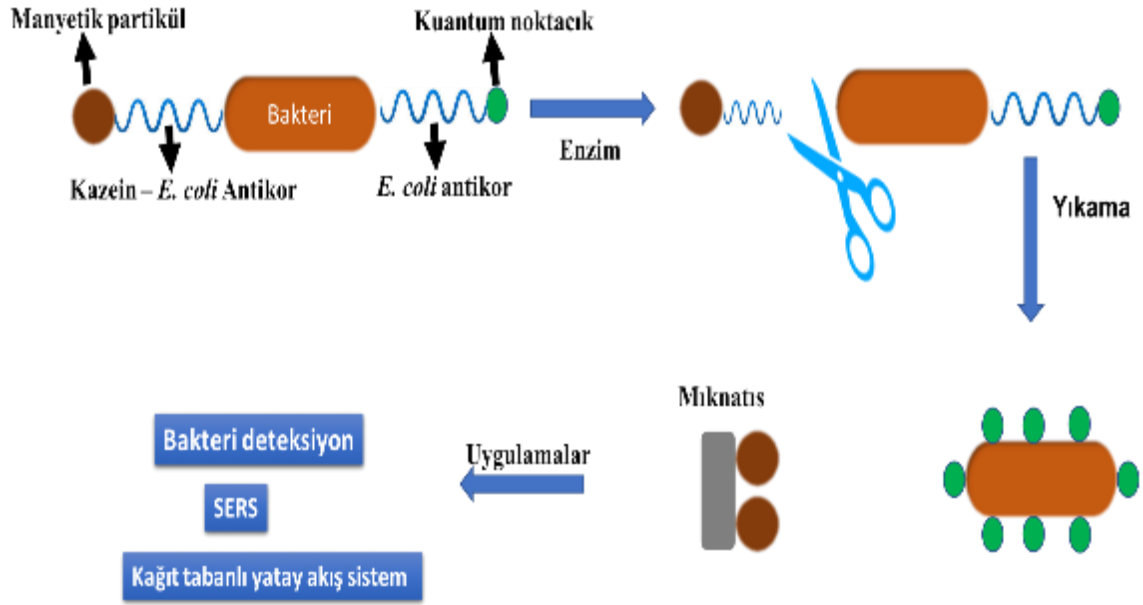
4.1.7. Manyetik ekstraksiyona dayalı yatay akış immünoassay çalışmaları

Yatay akış immünoassay yönteminin daha yüksek performansla *E. coli* tayininde kullanılabilmesi için öncelikle nanoekstraksiyon yöntemi ile manyetik nanoparçacıklar kullanılarak numuneden *E. coli*'nin seçimli bir şekilde yakalanmasını sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla kazein modifiye manyetik nanoparçacıklara *E. coli* antibadisi EDC/NHS prosedürü ile kovalent olarak bağlanır ve bu manyetik partiküller numuneden hedef bakterinin yakalanması için kullanılmıştır. *E. coli* antikoruna bağlı manyetik nanoparçacıklar farklı konsantrasyonlarda *E. coli* içeren örnekler ile etkileştirilir ve mıknatıs yardımı ile örnek içerisinden hedef bakteri toplanır. Ardından borat tampon ortamına alınan manyetik partikülleri bakteriden ayırmak için rennet enzimi (mikrobiyal peynir mayası (1/15000)) kullanılır. Böylece manyetik partiküller kesilerek mıknatıs yardımıyla toplanır. Manyetik partiküller uzaklaştırıldıktan sonra bakteri örnekleri yatay akış immünoassay striplerine uygulanır ve analitik membran boyunca ilerleyip test ve kontrol hatları ile etkileşmeleri için beklenir. İmmünoreaksiyon gerçekleştikten sonra, yatay akış immünoassay striplerinin okuması hatlarda oluşan partikül yoğunluğuna dayalı olarak kolorimetrik olarak gözlemlenmiştir. İkinci bir okuma yöntemi ise AuNP'lere bağlanmış olan DTNB etiket üzerinden SERS sinyalinin takibi ile yapılmıştır. Manyetik ekstraksiyonun kolaylığı ve yüksek performansı sayesinde yatay akış sistem ile *E. coli* analizinin analitik performansının artırılması hedeflenmiştir. Bu yöntem ile gerçekleştirilen çalışmalar miktar optimizasyonları, seçicilik, kalibrasyon çalışması, test çizgilerinde raman etiket kullanarak haritalandırma ve gerçek örnek denemeleri yapılmıştır. Yöntemin optimizasyonu çalışmalarında ilk olarak aynı derişimdeki *E. coli* (10^5 kob/mL) örnekleri kullanılarak analiz ve optimizasyon basamakları gerçekleştirilmiştir. Aşağıda kademeli olarak manyetik ekstraksiyon yönteminin bütün optimizasyon ve uygulama safhaları detaylı bir şekilde gösterilmiştir.

4.1.8. Kuantum noktacıkların *E. coli* antikoruna ile modifikasyonu ve enzim ile bölünmesi

Manyetik nano ekstraksiyon yönteminde ilk olarak kazein kaplı modifiye manyetik nanopartiküllerin kesme işlemi için rennet enzimi yardımıyla hedef bakteri ile *E. coli* antibadi ile modifiye olmuş olan kuantum noktacıklar kullanılarak kolorimetrik olarak sistemin çalıştığı gösterilmiştir. İlk olarak; sentezlemiş olduğumuz $Fe_3O_4/Au-PEI$ partiküllerini kademeli olarak kazein ve *E. coli* antikorunun kovalent immobilizasyonu

için EDC/NHS ile aktifleştirilip bağlanma işlemi gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada bir eppendorf tüp içerisinde 10^5 (kob/mL) bakteri konsantrasyonu, kazein bağlı $Fe_3O_4/Au-PEI$ NP'leri ile oda sıcaklığında minimum 30 dk boyunca karıştırıldı. Daha sonra bakteri antibadisi ile modifiye edilmiş olan kuantum noktacıklar çözelti ortamına eklenerek bakteri ile etkileşip sandviç yapısı oluşturulmuştur. Mıknatıs yardımı ile toplanarak üç kez fosfat tamponu ile yıkandıktan sonra tekrar fosfat tampon ortamına alınmıştır (şekil 4.15). Elde edilen sandviç kompleks çözeltisi daha sonra bir cam lamel üzerine alınarak UV ışık altında etkileştirmiş olduğumuz çözeltinin enzim varlığında ve yokluğunda kuantum noktacıkların etkisi ile vermiş olduğu kolorimetrik tepkiyi gözlemledik (Şekil 4.16 ve 4.17). İlk olarak sandviç yapılı çözelti cam lamel üzerine alınıp mıknatıs yardımıyla manyetik alan oluşturulup bakteri ile etkileşen partiküller bir noktada toplandı. Partiküllere çıplak göz ile baktığımızda sandviç yapılı manyetik partiküllerden dolayı siyah renkli görünürken, UV ışık altında bakıldığında manyetik partiküllerin üzerinde bakteriye bağlı olan kuantum noktacıklardan dolayı yeşilimsi bir renk gözlemledik. En son aşamada sandviç yapılı dispers edilip karıştırıldı ve içerisine rennet enzimi ilave edilip oda sıcaklığında 20 dk karıştırıldı. Karıştırma işlemi tamamlandıktan sonra enzim manyetik partiküllerin kazein kısmından keserek manyetik partikülleri bakteri ve ona kovalent bağlı olan kuantum noktacıklardan ayırdı. Tampon ortamına geçen bakteri ve kuantum noktacıklar tekrar cam lamel üzerine konulup manyetik alan ile tekrar tek bir noktada toplandı. Çıplak göz ile baktığımızda partiküller siyah renkli görünürken, UV ışık altında manyetik partiküller kuantum noktacıklardan ayrıldığı için siyah renk gözlenirken, sıvı kısım bakteri ve kuantum noktacıklardan dolayı parlak renkte görüldü. Bu yapılan ön deneme ile manyetik ekstraksiyon sisteminde enzimin gayet iyi çalıştığı görülmüştür.



Şekil 4.15. Manyetik nanoekstraksiyon yöntemi ile kuantum noktacıların bakteri etkileşim metodu.

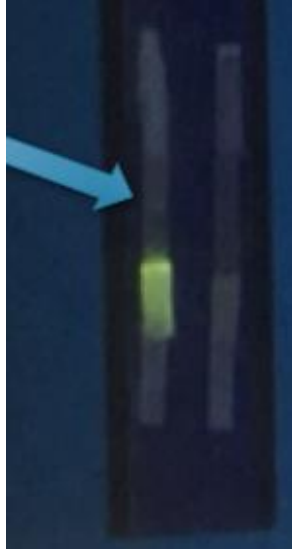


Şekil 4.16. A) Kuantum noktacılar ile sandviç kompleks oluşturmuş bakteri ve manyetik partikül etkileşimi. B) UV ışık altındaki görüntüsü.



Şekil 4.17. A) Rennet enzim varlığında elde edilen sandviç yapısı ve B) UV lamba altındaki görüntüsü.

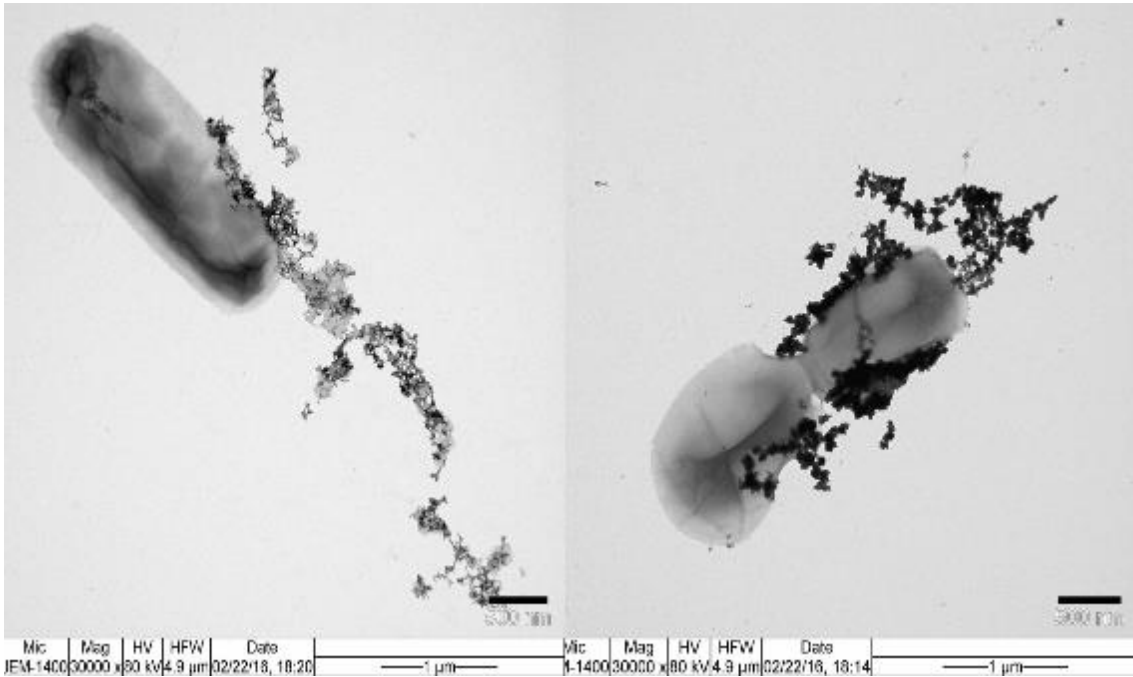
Şekil 4.18’de modifiye kuantum noktacıklar kullanılarak kağıt tabanlı yatay akış sistemleri üzerinde bakteri uygulaması yapılmıştır. Konjugasyon pedinde bulunan modifiye edilmiş kuantum noktacıklar numune pedine damlatılan bakteri ile nitroselüloz membran üzerinde yürütüldükten sonra, UV ışık altında numune ped kısmına bakıldığında sarı-yeşil arasında bir renk olarak görülmektedir. Test çizgisi üzerinde çok hafif bir yeşilimsi bir renk olmasına rağmen şekil 4.13’de çok zayıf bir renk olarak görülmektedir. Hem kuantum noktacıklarının sentez ve verim aşamalarının zorluğu, hemde bakteri antikor ile kuantum noktacıkların modifikasyon aşamasında yıkama yapılırken 300.000 rpm gibi yüksek santrifüj değerlerinde çökmesinden dolayı kağıt tabanlı kuantum nokta-bakteri çalışmalarından vazgeçilmiştir.



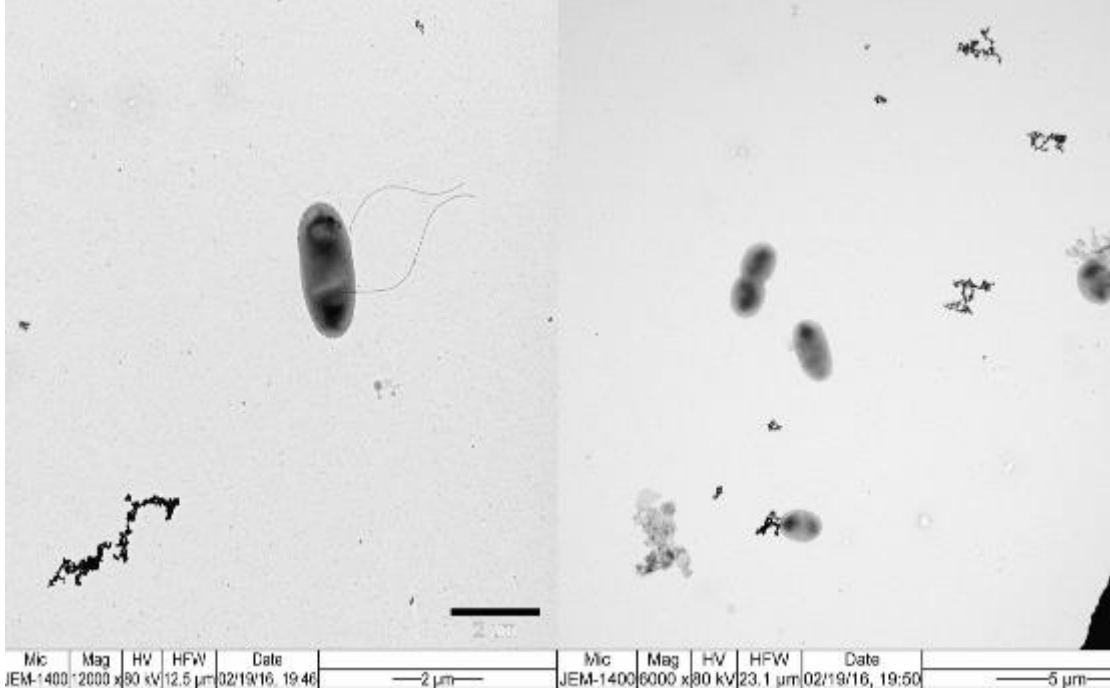
Şekil 4.18. Kuantum noktacı kullanarak elde edilen yatay akış sistem resmi.

4.1.9. Manyetik nanopartiküllerin *E. coli* antikoruna ile modifikasyonu ve enzim ile bölünmesi

Kazein modifiye $Fe_3O_4/Au-PEI$ nanopartiküllerinin hazırlanması ve *E. coli*'ye özgü nanopartiküllerin uygun yüzey modifikasyonu, kağıt bazlı test şeritlerinde bakterilerin saptanması için geliştirilmiştir. TEM görüntüleri $Fe_3O_4/Au-PEI$ nanopartiküllerinin hedef bakteri ile konjuge olduğunu doğruladı (şekil 4.19).



Şekil 4.19. $Fe_3O_4/Au-PEI@Casein$ partiküllerinin bakteri ile etkileşim TEM görüntüsü [183].



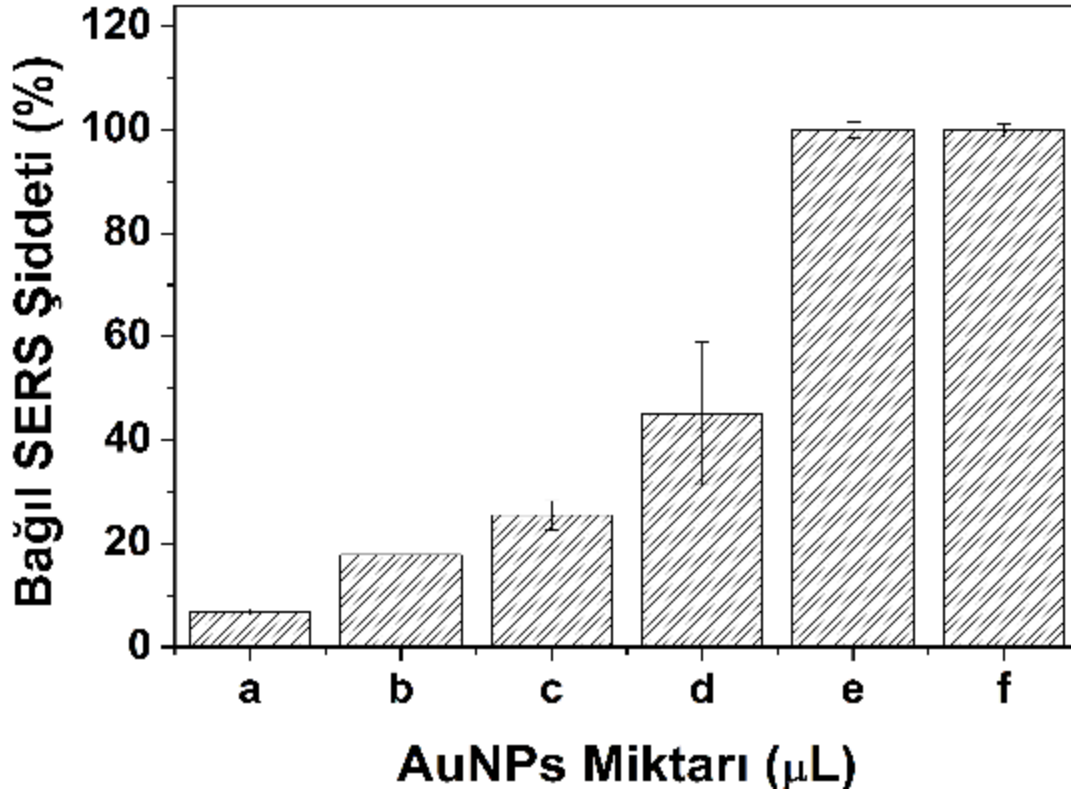
Şekil 4.20. Fe₃O₄/Au-PEI@Casein partiküllerinin enzim kesim işleminden sonra bakteri etkileşim TEM görüntüsü [183].

Daha sonra, Fe₃O₄/Au-PEI nanoparçacıkları, test şeridi üzerinde bakteri hareketini sağlamak için ekstraksiyon işleminden sonra *E. coli*'den ayrıldı. Bu işlem için kazein ve bağ parçalama için rennet enzimi kullanılmıştır. Modifiye Fe₃O₄/Au-PEI nanopartikülleri üzerindeki kazeinin amid bağları, *E. coli*'yi manyetik partikülden salmak için enzim ile ayrıldı (şekil 4.20). Fe₃O₄/Au-PEI nanoparçacıkları çözeltiden bir mıknatısla çıkarıldı ve çözelti içindeki hedef bakteri, test şeritlerinde SERS ölçümleri alınabilmesi için kağıt bazlı immünoassay sistemde verimli bir şekilde tespit edilebilecek duruma getirilmiş oldu.

4.1.10. Manyetik ekstraksiyon ile geliştirilmiş kağıt bazlı LFIA parametrelerinin optimizasyonu

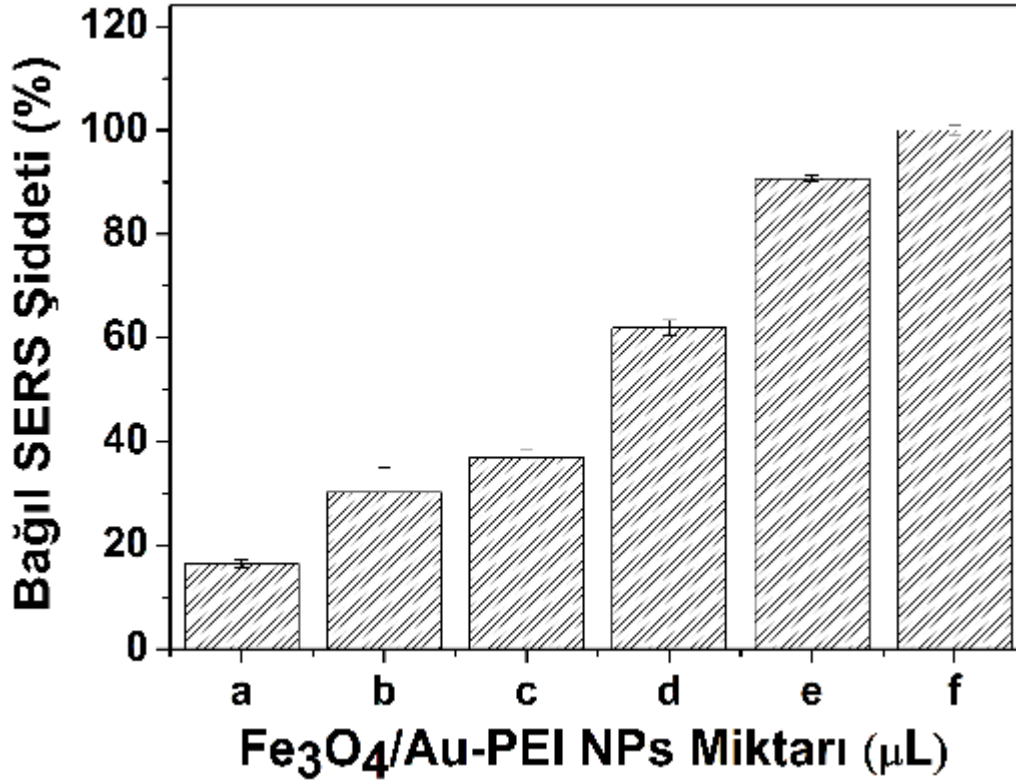
Yöntemin optimizasyonu çalışmalarında diğer bir aşama olarak konjugasyon pedindeki AuNP miktarı optimize edilmiştir. DTNB etiketli AuNP'ler, hedef bakterilerin kantitatif hesaplamaları için hem renk maddesi hem de SERS tespit problemleri olarak kullanıldı. Bu amaçla LFIA sisteminin konjugasyon pedinde farklı miktarlarda AuNP emdirildi, konjugasyon pedlerine 5–30 μL aralığında AuNP'ler konjugasyon pedlerine uygulandı ve aynı bakteri konsantrasyonu (10⁵ kob/mL) için analiz edildi. 1 mL nanoparçacık çözeltisindeki AuNP sayısı, 8.25 x 10¹⁶ olarak hesaplandı. Daha sonra, nanopartiküller sisteme 4.13x10¹⁴-2.48x10¹⁵ partikül/mL (5 μL-30 μL) miktarlarında uygulandı. Oluşan

AuNP-*E. coli* konjugatları, test hattında nitroselüloz zarı üzerinde immobilize olan antikorlar tarafından yakalandı ve test hattında kırmızı renk gözlemlendi. Elde edilen sonuçlara göre konjugasyon pedine emdirilen AuNP arttıkça SERS sinyalleri de artmıştır. SERS sonuçlarından en yüksek 2.06×10^{15} partikül/mL (Şekil 4.21'de 25 μ L'ye karşılık gelir) optimum AuNP sayısı olarak tanımlandı. SERS şiddeti, beklendiği gibi modifiye AuNP'lerin konsantrasyonundaki artışla orantılı olarak artmıştır.



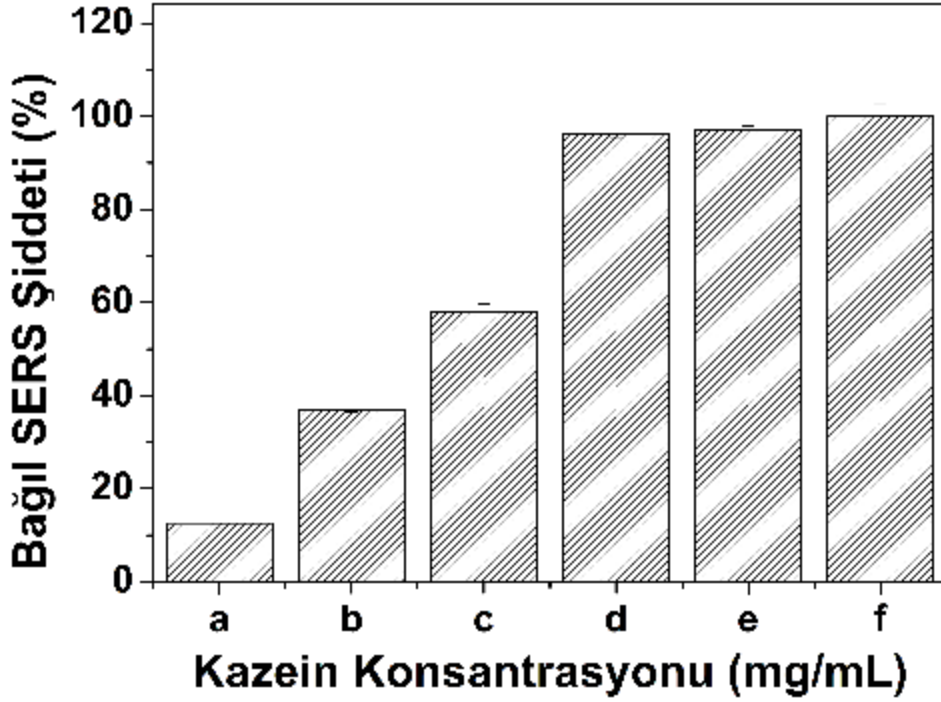
Şekil 4.21. DTNB etiketli AuNPs hacmi (a) 5 μ L, (b) 10 μ L, (c) 15 μ L, (d) 20 μ L, (e) 25 μ L, (f) 30 μ L [183].

1 mL nanoparçacık çözeltisindeki $Fe_3O_4/Au-PEI$ nanopartiküllerinin sayısı 4.52×10^{14} olarak hesaplandı. Daha sonra nanopartiküller kağıt tabanlı LFIA sisteme partikül sayısı 2.26×10^{13} - 2.26×10^{14} partikül/mL (50 μ L-500 μ L) olacak şekilde uygulandı (şekil 4.16). SERS sonuçlarından optimum $Fe_3O_4/Au-PEI$ nanopartikül sayısı olarak en yüksek verimin elde edildiği 1.28×10^{14} partikül/mL (Şekil 4.23'de 250 μ L'ye karşılık gelmektedir) olarak belirlendi.



Şekil 4.22. Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerin hacmi (a) 50 μL, (b) 100 μL, (c) 150 μL, (d) 200 μL, (e) 250 μL, (f) 500 μL [183].

Kazein miktarı, Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerinin yüzeyi üzerinde spesifik hedef bakterileri yakalamak için substrat olarak kovalent olarak bağlanan kazein için optimize edildi. Rennet enzimi *E. coli*'nin manyetik nanopartikülden serbest kalması için kazeini kestiğinde, serbest bakteriler Fe₃O₄/Au-PEI nanopartiküllerinden manyetik alanla ayrılır ve SERS bazlı yatay akış ümmünoassay sisteminin test şeritleri ile tespit edilir. Farklı kazein çözeltilerin konsantrasyonlarının SERS spektrumları (1-15 mg/mL) şekil 4.23'de gösterilmiştir. Kazein konsantrasyonu arttıkça, DTNB sinyalinin şiddetide de artış göstermektedir. Tüm konsantrasyonlarda kaydedilen SERS şiddeti 7 mg/mL kazein miktarından sonra önemli ölçüde değişmedi ve bu konsantrasyon optimum konsantrasyon olarak seçildi.



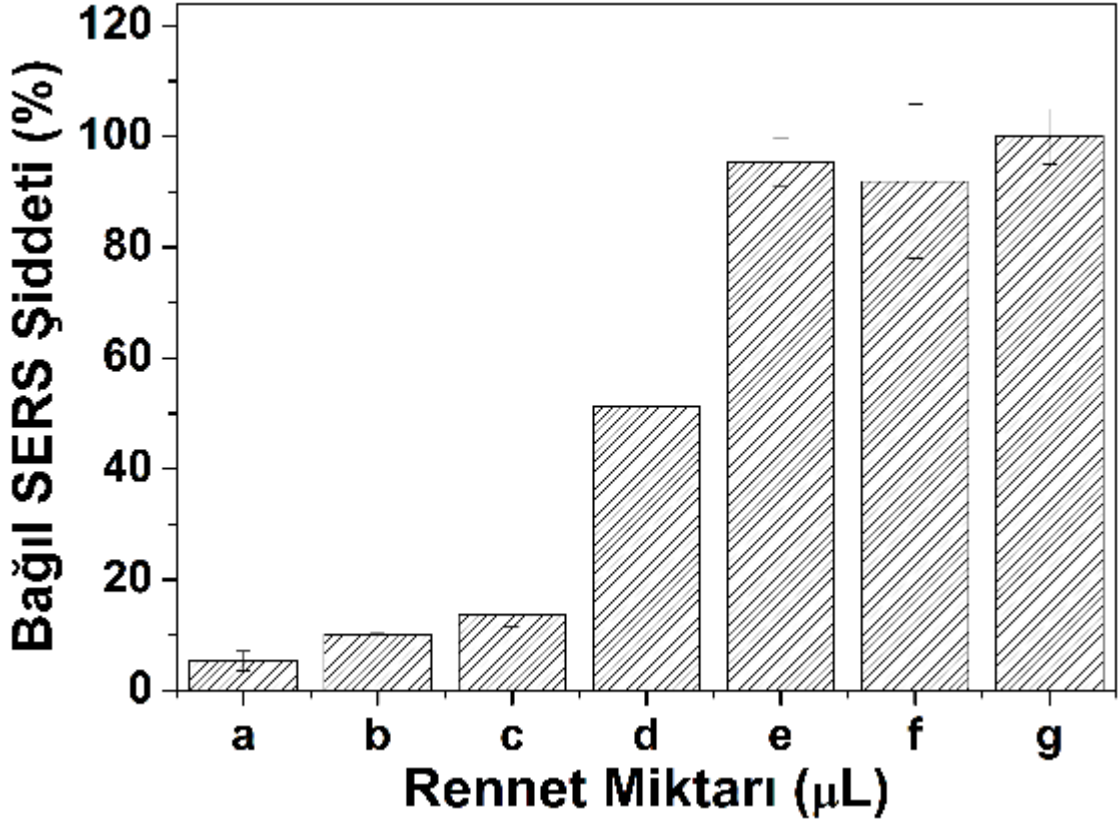
Şekil 4.23. Kazein konsantrasyonu (a) 1 mg/mL, (b) 3 mg/mL, (c) 5 mg/mL, (d) 7 mg/mL, (e) 10 mg/mL, (f) 15 mg/mL [183].



Şekil 4.24. Yatay akış immünoassay şeritlerine farklı enzim konsantrasyonlarında *E. coli* örnekleri verildikten sonra görünüşleri.

Manyetik nanopartikül-bakteri konjugatlarına manyetik nanoparçacıkları hedef bakterilerden ayırmak için farklı miktarlarda enzim eklenmiştir. Enzim varlığında manyetik alan uygulayarak bakteriler manyetik partiküllerden ayrılması sağlandıktan sonra, başka tampon ortamına alınan bakterilerin SERS spektrumlarını elde etmek için kağıt tabanlı LFIA sistemine yüklenmiştir. 2 μ L 1/16000 ölçekli rennet enzimi

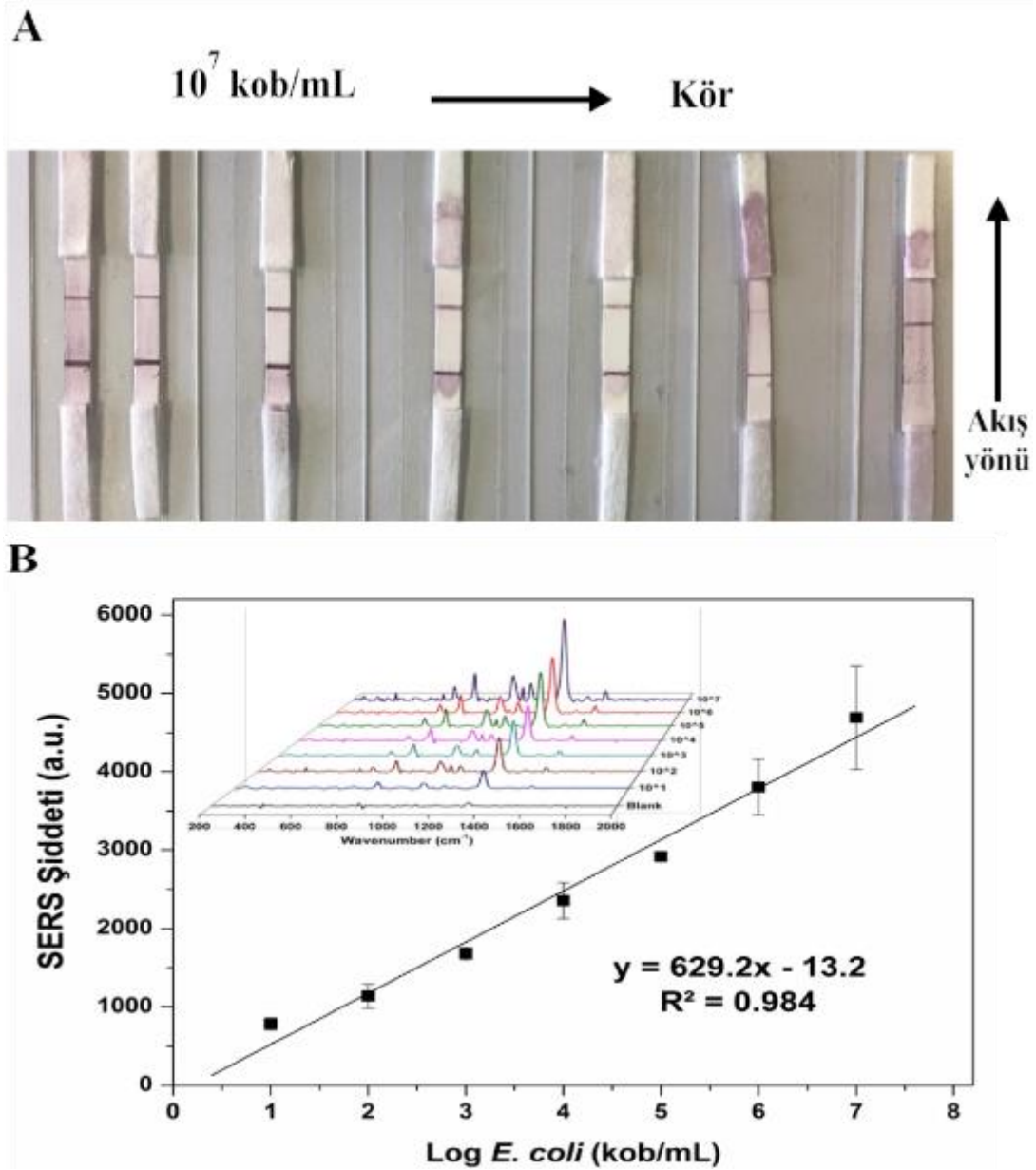
eklendikten sonra SERS sinyallerinin daha belirgin ve anlamlı hale geldiği görülmüştür (şekil 4.26). LFIA sisteminde uygulanan farklı enzim konsantrasyonlarının sonucunda en iyi optimum değer 5 µL rennet enzimi olarak belirlendi (Şekil 4.26).



Şekil 4.25. Rennet enzim hacmi (a) 1.0 µL, (b) 1.5 µL, (c) 2.0 µL, (d) 2.5 µL, (e) 5 µL, (f) 7.5 µL, (g) 10 µL [183].

4.1.11. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için kalibrasyon çalışması

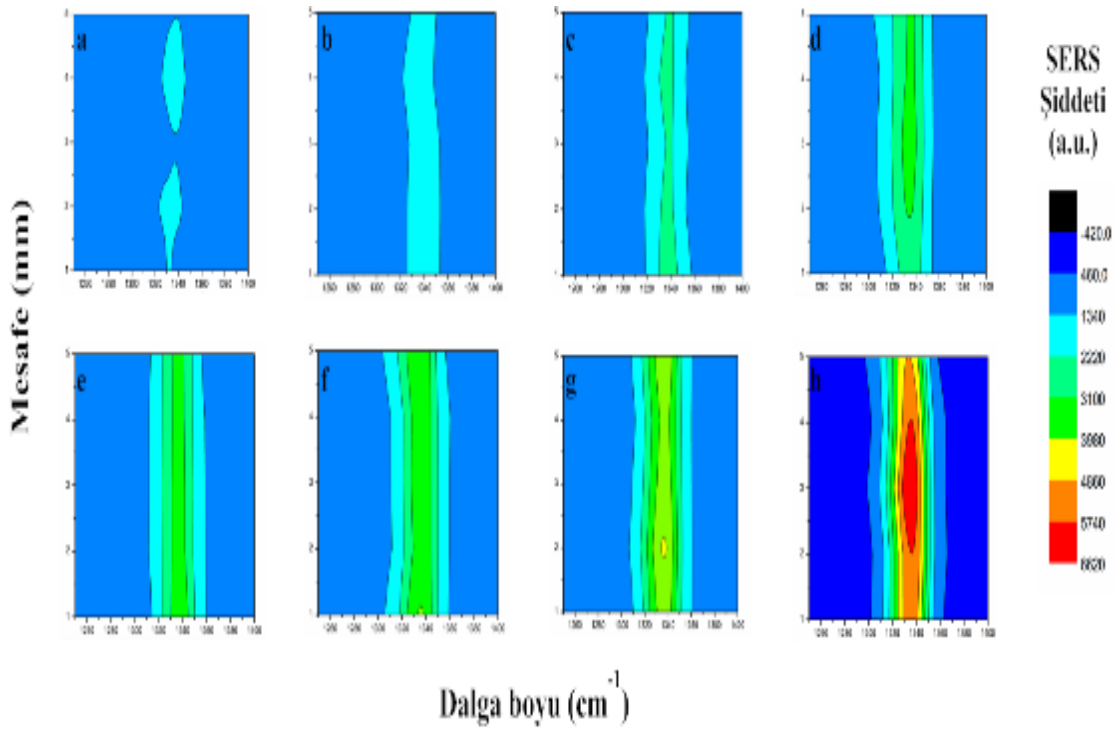
Kağıt bazlı LFIA optimizasyon çalışmalarının tamamlanmasından sonra, 10^1 ile 10^7 kob/mL *E. coli* içeren örnekler kullanılarak test edilmiştir (Şekil 4.26 (A)). Tampon çözelti içerisindeki farklı derişimlerdeki *E. coli* örneklerine uygulanarak geliştirilen yöntemin kantitatif performansı test edilmiştir. Bunun için daha önce anlatıldığı şekilde yatay akış immünoassay platformu oluşturulmuş ve 75 µL fosfat (pH: 7.4) tamponunda 10^1 'den 10^7 kob/mL'ye değişen konsantrasyonlarda hazırlanan *E. coli* örnekleri uygulanmıştır.



Şekil 4.26. A) Kağıt bazlı LFIA şeritlerinin fotoğrafı ve B) kalibrasyon eğrisi ve SERS grafiği [183].

AuNP'lerden yapılmış bir Raman etiketi DTNB kullanılarak gerçekleştirilen *E. coli* deneyleri için SERS spektrumu, farklı *E. coli* konsantrasyonlarının ilavesinden sonra immünoassay sisteminin tipik bir SERS tepkisini gösteren SERS kalibrasyon grafiği şekil 4.26 (B) kısmında gösterilmiştir. Manyetik nanopartiküller ile yapılan zenginleştirme işleminden sonra SERS ölçümleri test şeridinde oluşan kırmızı renkli çizgilerden elde edilmiştir. Kalibrasyon grafikleri çizilirken DTNB ye ait olan simetrik NO₂ gerilme bandının 1335 cm⁻¹'deki keskin ve şiddetli pikin verileri ile elde edilmiştir. DTNB etiketi içeren AuNPs farklı konsantrasyonlardaki bakterilerin eklmesine bağlı olarak raman

sinyalinde doğrusal bir artış olduğu elde edilen kalibrasyon grafiğinde görülmektedir. Kalibrasyon eğrisi, DTNB'nin pik şiddetlerinin farklı *E. coli* konsantrasyonlarındaki (10^1 - 10^7 kob/mL) değişimleriyle çizildi. DTNB pik şiddetine göre çizilen kalibrasyon eğrisi grafiğinde farklı derişimler (10^1 - 10^7 kob/mL) arasında doğrusallık 0,984 korelasyon kat sayısı (R^2) elde edilmiştir. Yapılan deneylerin doğruluğunu göstermek için hiç bakteri kullanılmadan yapılan kör denemelerde yatay akış immünoassay sistemde kolorimetrik olarak şekil 4.26 (A)'da gösterilen resimde test şeridinde gözle görülemeyecek kadar çok zayıf ince bir çizgi oluşurken, kontrol çizgisinde daha kalın bir kırmızı çizginin belirmesi sistemin çalıştığını ve kağıt tabanlı LFIA sistem üzerinde oluşma ihtimali olan nonspesifik etkileşimlerin minimize edildiğini göstermektedir (şekil 4.26 (A)).

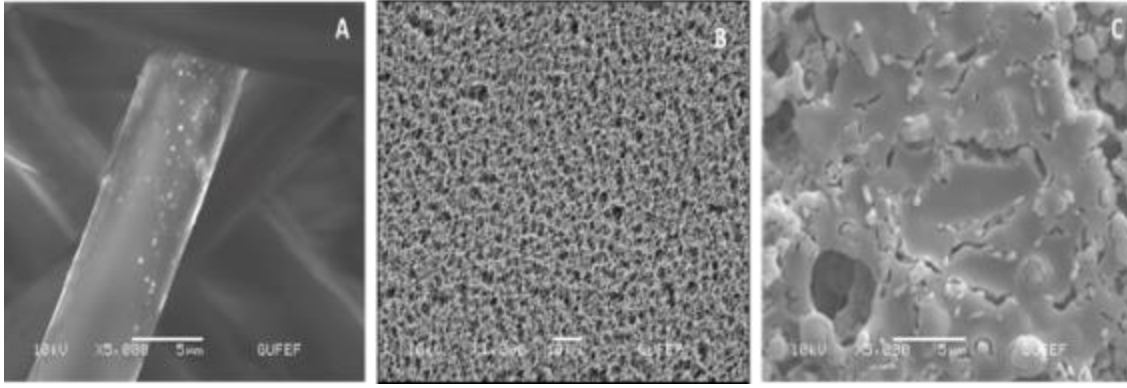


Şekil 4.27. Farklı konsantrasyonlardaki (10^1 - 10^7 kob/mL) *E. coli* için test çizgisi üzerinden elde edilen raman haritalandırma (a) kör, (b) 10^1 kob/mL, (c) 10^2 kob/mL, (d) 10^3 kob/mL, (e) 10^4 kob/mL, (f) 10^5 kob/mL, (g) 10^6 kob/mL, (h) 10^7 kob/mL [183].

Tez kapsamında yapılan diğer bir yöntemimiz AuNPs'de bulunan raman etiketini (DTNB) referans olarak farklı konsantrasyonlarda bulunan bakterilerin test çizgisinde bulunan spesifik antikorlardan dolayı yakalanmasından yola çıkarak kırmızı renkli yüzeyin haritalandırmasını spesifik nitro titreşim bandı (1335 cm^{-1}) ile tespit ettik. SERS spektrumları, test çizgisindeki (4 mm) 5 farklı eşit noktadan, her noktada farklılıkları

ortaya çıkararak haritalandırma yoluyla gösterildi. Şekil 4.27’de haritalandırma kalibrasyon grafiğine bakıldığında kör deneme için test çizgisindeki yüzeyinin düşük SERS şiddetine sahip olan mavi renk ile bir dağılım gösterirken, artan bakteri konsantrasyonuna bağlı olarak yüksek derişimlerdeki bakterilerin test şeridindeki yüzey haritalandırma yüksek SERS şiddetinin göstergesi olan kırmızı renge doğru 1335 cm^{-1} ’de bulunan bandın şiddetinden dolayı geçiş yapmaktadır.

Elde edilen test şeritlerinde *E. coli* varlığını göstermek için nitroselüloz membran yüzeyi ve antibadi çizilmiş test bölgesiyle karşılaştırılmalı SEM görüntüleri alınmıştır.



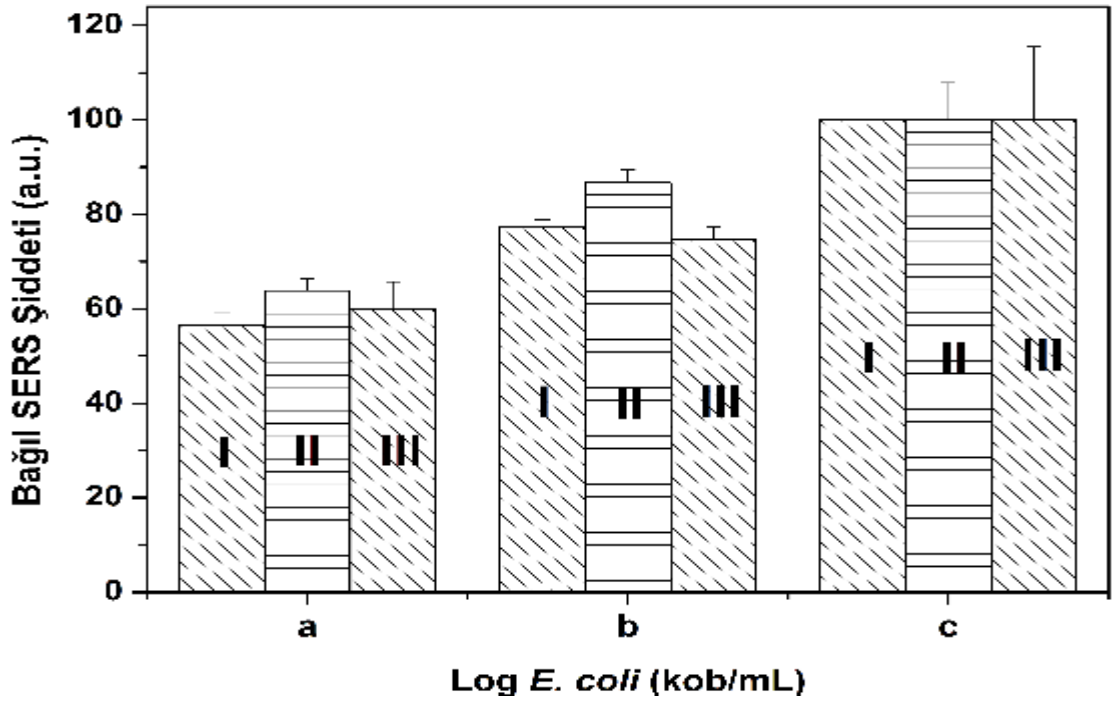
Şekil 4.28. A) Konjugasyon pedindeki AuNPs SEM görüntüsü, B) Nitroselüloz membran SEM görüntüsü, C) Nitroselüz membran test bölgesinde *E. coli* etkileşiminin SEM görüntüsü [182].

Şekil 28 (A)’da konjugasyon pedinin iç kısımlarında bulunan AuNPs görülmektedir. Şekil 28 (B)’de nitroselüloz membranın boş yapısı görülmektedir. Şekil 28 (C)’de ise test şeridinde etkileşen *E. coli* görülmektedir. Geliştirilen yatay akış immunoassay platformunun *E. coli* için çalıştığı kanıtlanmıştır.

4.1.12. Geliştirilen kağıt tabanlı LFIA sisteminin örnek denemeleri

Geliştirilmiş kağıt tabanlı immünoassay platformunda, farklı *E. coli* konsantrasyonlarını artırarak idrar, kan ve süte uygulanmıştır. Şekil 4.29’da manyetik zenginleştirme sonrası idrar, kan ve süt numunelerinin test şeritlerinden elde edilen SERS spektrumları. Yöntemin doğruluğunu kontrollü bir şekilde gerçekleştirmek için gerçek numune örnekleri klasik sayma yöntemiyle desteklenmiştir (çizelge 4.2). Gerçek örnek denemeleri idrar, kan ve süt geliştirilen manyetik ekstraksiyon yönteminden tayin edilmiş, *E. coli* için çizilen kalibrasyon garfiğinden SERS spektrumlarını kullanarak örneklerdeki bakteri konsantrasyonları kantitatif olarak tayin edilmiştir. Bu sonuçlar

klasik sayma yöntemin sonuçları ile desteklenmiştir. Yüzde yakalama etkisini araştırmak için idrar, süt ve kanda sırasıyla 10^4 kob/mL için % 86, % 89 ve % 87; 10^5 kob/mL için % 95, % 96 ve % 97; 10^6 kob/mL için % 90, % 95 ve % 108 olarak bulundu (çizelge 4.2). Elde edilen sonuçlar, *E. coli* içermeyen idrar, kan ve süt örneklerinin SERS pikleri içermediğini, ancak *E. coli* içeren idrar, kan ve süt örneklerinin DTNB'den kaynaklanan güçlü SERS piklerini göstermiştir. Ek olarak, numunelere ekilen bakteri konsantrasyonundaki artıştan dolayı SERS sinyal şiddetinde bir artış oldu. Yöntem, bağıl standart sapma açısından oldukça tatmin edici sonuçlar verdi.



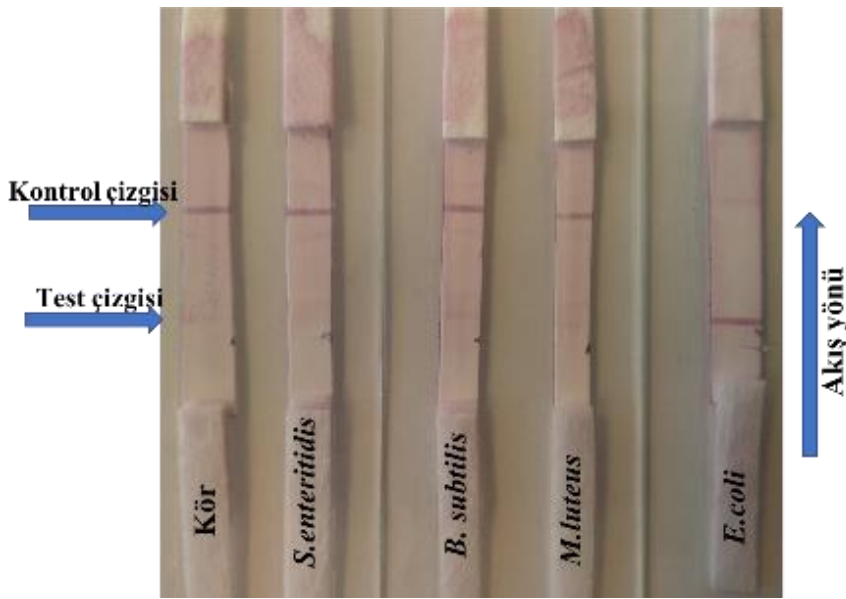
Şekil 4.29. Bağıl SERS spektrumlar sırasıyla (I) yapay idrar (II) referans kan (III) süt konsantrasyonlar a) 4.23 log *E. coli*, (b) 5.23 log *E. coli*, (c) 6.23 log *E. coli* [183].

Çizelge 4.2. İdrar, süt ve kan örnekleri için yapılan klasik bakteri sayım sonuçları.

Örnekler	Eklenen <i>E. coli</i> miktarı (log kob/mL)	Bulunan <i>E. coli</i> miktarı (log kob/mL)
Sentetik idrar	4.00	3.64±0.21
	5.00	4.97±0.12
	6.00	6.40±0.80
Süt	4.00	3.72±0.18
	5.00	5.03±0.20
	6.00	5.94±0.49
Referans Kan	4.00	4.07±0.43
	5.00	5.06±0.22
	6.00	6.77±1.08

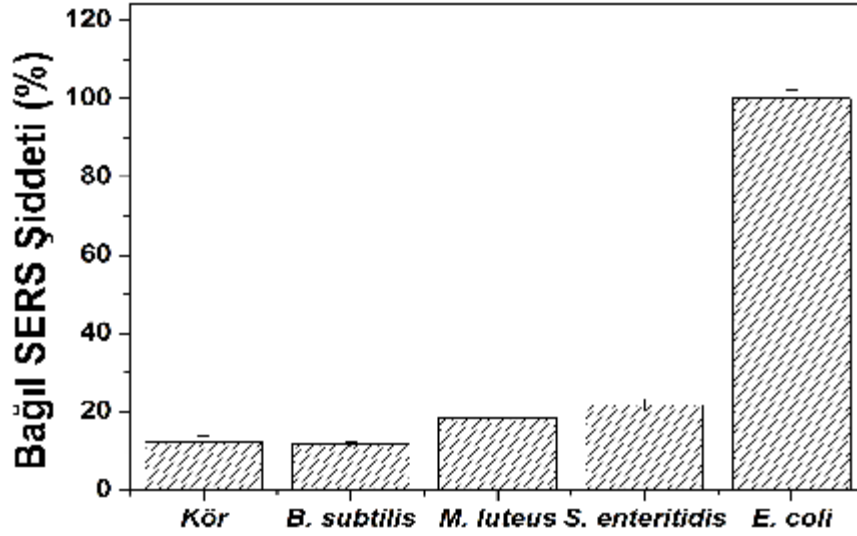
4.1.13. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için seçicilik çalışmaları

Yöntemde analit seçici ajan olarak *E. coli* bakterisine seçici antikor kullanılsa da spesifik olmayan etkileşimlerin yönteme etkisini görmek için seçicilik çalışması yapılmıştır. Sistemin özgüllüğü, aynı manyetik zenginleştirme prosedürünün farklı bakteri türlerine uygulanmasıyla; *B. subtilis*, *M. luteus*, *S. enteritidis* test edildi. Manyetik ekstraksiyon kağıt tabanlı immünoassay platformunda *E. coli* tayini için uygulanan tüm adımlar tüm detayları ile birlikte farklı bakteri türlerine de uygulanmış ve SERS spektrumları belirlenmiştir. Seçicilik için belirlenen bakterilerin yatay akış immünoassay nitroselüloz membran yüzeyde oluşan test çizgileri ve kontrol çizgileri gösterilmiştir (şekil 4.30).



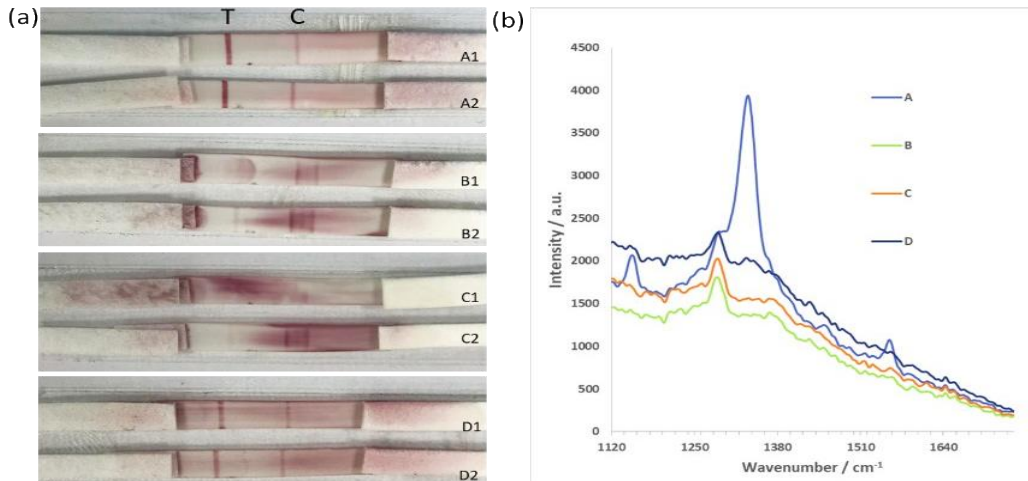
Şekil 4.30. Yatay akış immünoassay şeritlerine farklı bakteri örnekleri uygulandıktan sonra elde edilen görüntüler.

Validasyon denemeleri için belirlenen bakterilerden elde edilen bağıl SERS şiddetleri eş zamanlı olarak yapılan *E. coli* sonuçlarının farklılıkları Şekil 4.31’de gösterilmiştir. Test çizgilerinden alınan SERS spektrumları diğer bakterilerin sinyallerinin *E. coli*’den elde edilenlere göre oldukça düşüktü ve sonuçlar bakteri olmayan kör denemenin sonuçlarına çok yakın olduğu görülmüştür. Bu sonuçlar *E. coli* için geliştirilen immünoassay sisteminin yüksek özgüllüğünü göstermektedir.



Şekil 4.31. Farklı bakteri türlerinden elde edilen bağıl SERS şiddetleri [183].

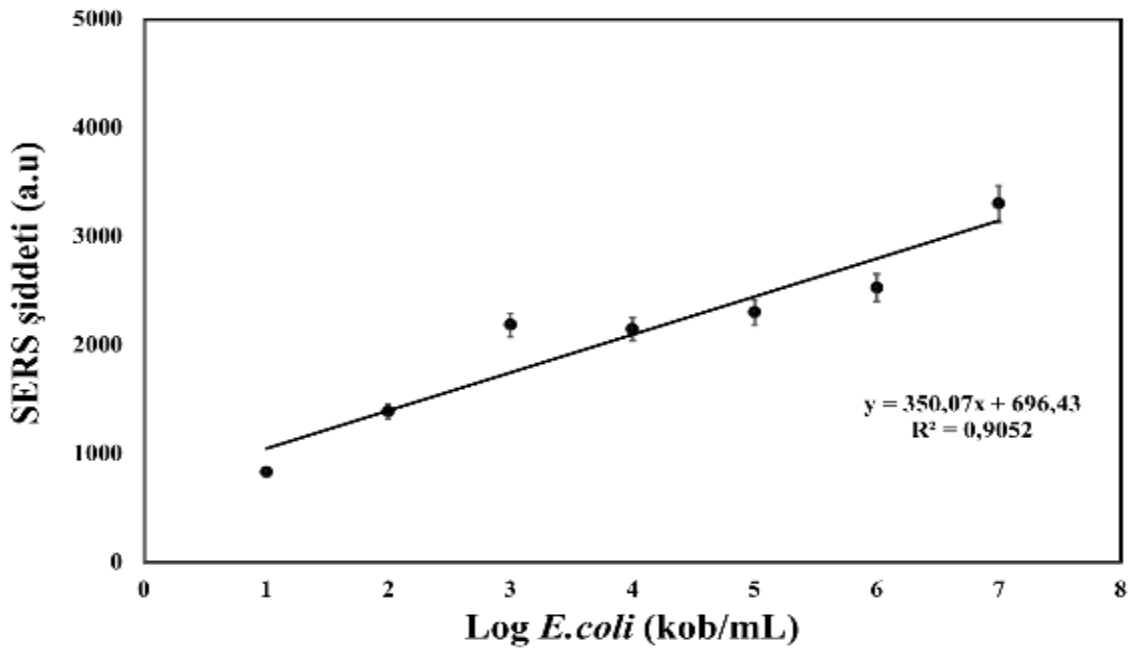
Yapılan çalışmada spesifik bakterinin yürüyüp yürümediğinin daha iyi anlaşılabilmesi için uygulanan yöntem farklı boyutlardaki hedef bakteri uygulanmıştır. Elde edilen veriler direkt olarak verilen bakterinin daha iyi sistemde hareket ettiğini parçalanmış ve küçük boyutlardaki bakterinin çok iyi raman intensitesi göstermediği görülmüştür. Yatay akış sistem üzerinde kolorimetrik deney sonuçlarında direkt olarak verilen bakterinin daha kalın test çizgisine sahip olduğu görülmüştür (şekil 4.32).



Şekil 4.32. (a) Yatay akışkan sistemin görüntüsü. *E. coli* direkt olarak sisteme verilmesi (A), 1:3 konsantrasyonunda lizozim enzim ile *E. coli* etkileşimi (B), 1:1 oranında lizozim ile *E. coli* etkileşimi (C), Ultrasonik sistemde bakterinin parçalanması (D). (b) Farklı yöntemler uygulanarak sisteme verilen *E. coli* SERS grafiği [182].

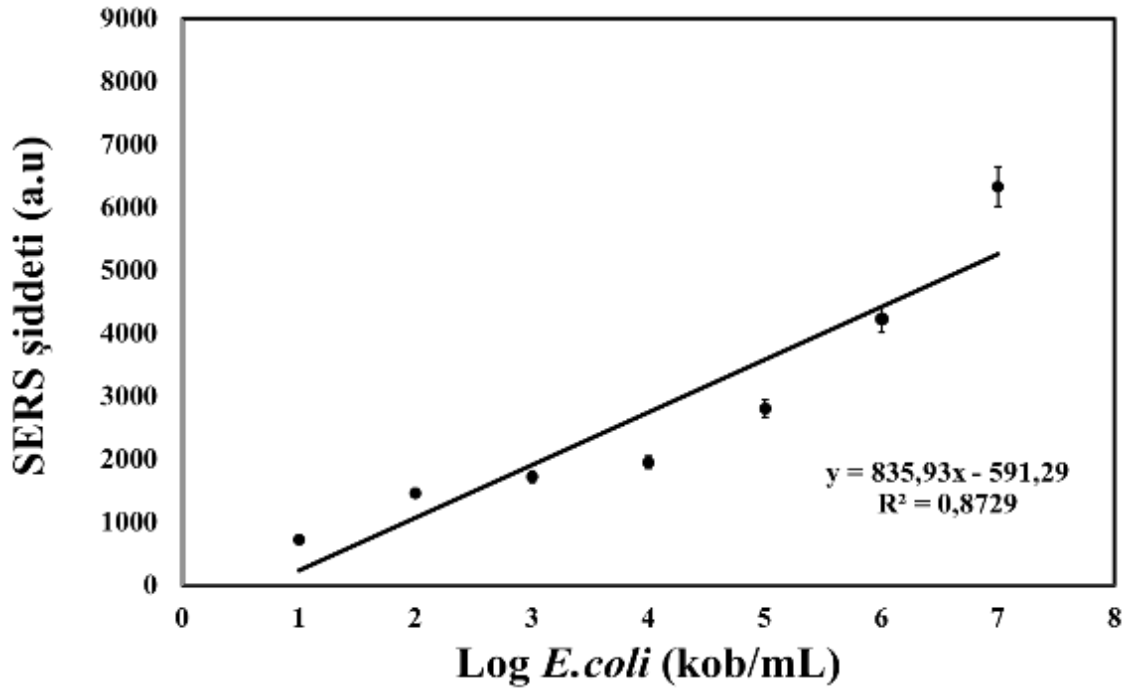
4.1.14. Manyetik ekstraksiyona dayalı yöntem için farklı türdeki manyetik partiküllerin kullanılması

Manyetik zenginleştirme için oluşturmuş olduğumuz enzime dayalı ekstraksiyon yöntemini farklı boyutlardaki ve fonksiyonel gruplara sahip olan manyetik nanopartikülleri kullanarak test ettik. Bu amaç için ticari olarak satın aldığımız boyutu 10 um olan karboksil gruplarla yüzeyi modifiye edilmiş olan manyetik nanopartiküller ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$) ve yine sentezlemiş olduğumuz $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ nanopartiküllerini kullandık. Kullanılan manyetik nanopartiküller oluşturmuş olduğumuz yöntemin tüm basamaklarını birebir uygulayarak yöntemin hem farklı manyetik partiküllerdeki etkisini hemde tekrarlanabilirliğini gözlemlemiş olduk. Şekil 4.33'de ticari olarak kullandığımız $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ nanopartiküllerinin farklı *E. coli* konsantrasyonlarının eklenmesinden sonra immünoassay sistemin SERS şiddetini gösteren kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.34'de $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{@Au}$ nanopartiküllerini kullanarak farklı bakteri konsantrasyonlarına bağlı olarak elde edilen kalibrasyon eğrisi gösterilmiştir. Her iki kalibrasyon grafiğinden yola çıkarak DTNB etiketi ile modifiye edilmiş olan AuNPs farklı derişimlerdeki bakteriler ile etkileşmesine bağlı olarak SERS şiddetlerinde lineer bir artış olduğu her iki grafikte de açıkça görülmektedir. Raman etiketinin pik şiddetine göre elde edilen kalibrasyon grafiklerinde farklı bakteri derişimler ($10^1\text{-}10^7$ kob/mL) arasında doğrusallık sırasıyla 0,905 ve 0,873 R^2 değerleri grafikten elde edilmiştir.



Şekil 4.33. Ticari $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-COOH}$ partiküllerinin bakteri kalibrasyon grafiği

Bu sonuçların ışığında iyi tekrarlanabilirlik ve gerçek numunelerde bakteri tespitinin daha geniş uygulanması için yeni çok fonksiyonlu kağıt tabanlı SERS platformları oluşturabilmesine imkan sağlamaktadır.



Şekil 4.34. Fe₃O₄@Au nanopartiküllerinin farklı derişimlerdeki bakteriler ile SERS kalibrasyon grafiği.

4.2. Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem

S. enteritidis tespiti için bakteriyofaj tabanlı kağıt sistem geliştirmiştir. *Salmonella* faj LFIA platformun antikor ile yapılan kağıt tabanlı sistemlerin karşılaştırılması yapılarak bakteriyofajın antikor yerine kullanılabileceği gösterilmiştir. Yapılan çalışmanın tüm detayları aşağıda başlıklar halinde verilmiştir.

4.2.1. Bakteriyofaj bazlı kağıt tabanlı yatay akış immünoassay çalışmaları

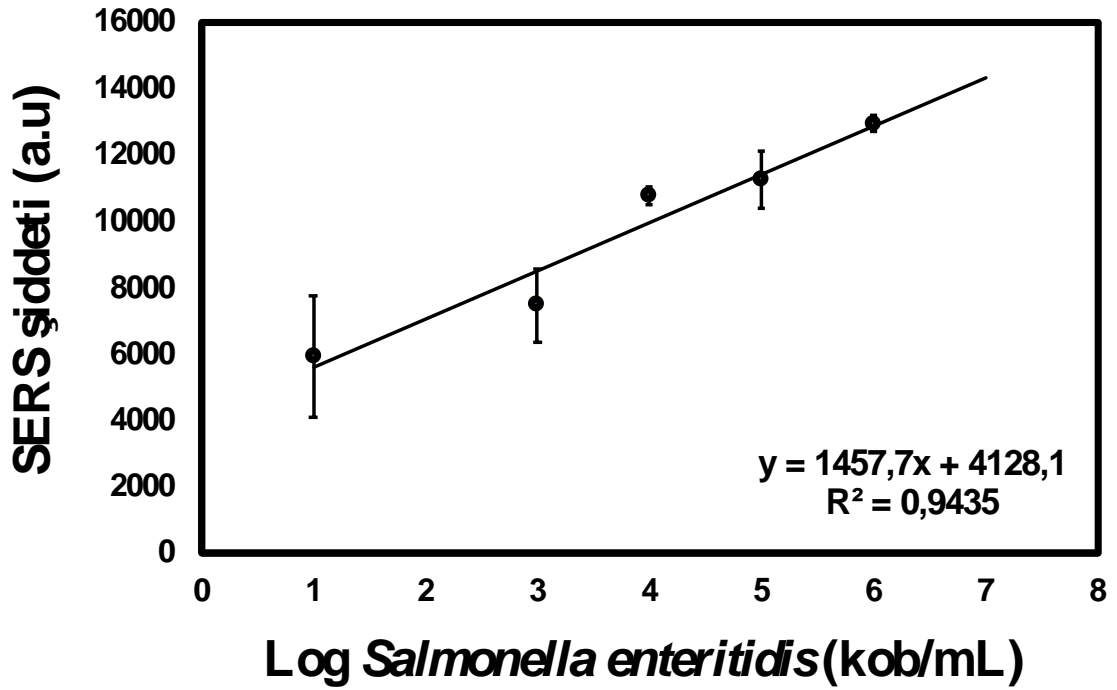
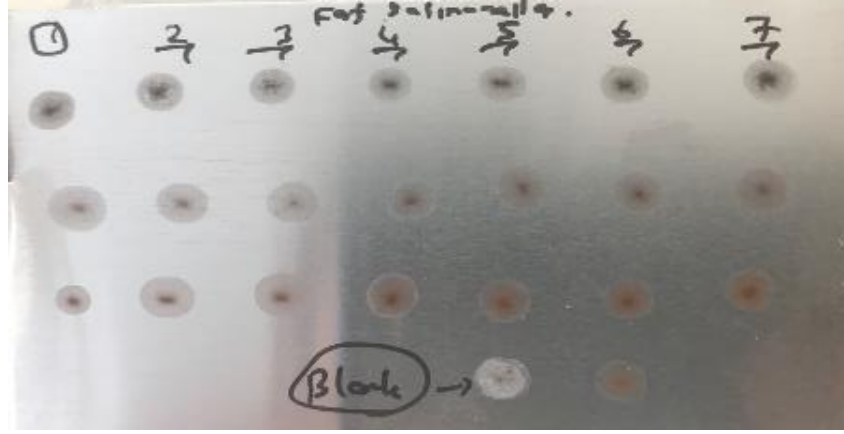
Tez araştırma kapsamında alternatif bir strateji olarak hızlı ve hassas bakteri tayin yöntemi için bakteriyofaj çalışmaları yapılmıştır. alışmalar kağıt tabanlı yatay akış immünoassay üzerinde belirlemiş olduğumuz optimum değerler (AuNP miktarı, antikor konsantrasyonu vb.) bu yöntem üzerinde uygulandı. Bakteriyofaj çalışmalarında hedef bakteri tayini için *Salmonella enteritidis* kullanılmıştır. Hedef bakterinin belirlenmesi için *Salmonella* faj, antikor yerine kullanılarak kağıt tabanlı yatay akış immünoassay sistem üzerinde uygulanmıştır. Bu uygulanan yeni yöntemde nano manyetik ekstraksiyon n zenginleştirme işlemi yapılmadan analitin direkt olarak sisteme verilmesi ile

gerçekleştirilmiştir. SERS etiket olarak DTNB AuNP'lere bağlanarak değişen bakteri konsantrasyonuna bağlı olarak elde edilen sinyaller takip edilmiştir.

Bu yöntemle yapılan deneysel çalışmalar farklı SERS substratlar kullanılarak analitin belirlenmesindeki etkinliği, seçicilik, kalibrasyon ve gerçek örnek denemeleri yapılmıştır. Geliştirilen yöntemin ilk olarak modifiye edilmiş manyetik partiküller kullanılarak bakteri yakalanmış, raman etiket ihtiva eden AuNPs ile sandviç molekül yapı oluşturulduktan sonra faj tabanlı bakteri tayin yöntemlerine başlanmıştır. Aşağıda verilen verilerin sonucunda en iyi yöntemin kâğıt tabanlı yatay akış immünoassay olduğu belirlenmiştir.

4.2.2. İmmünomanyetik ayırım ile *S. enteritidis* tespiti

1 mL karboksil grup içeren manyetik partiküller (0.04 mg/mL) *Salmonella* faj kapsid kısmından kovalent olarak bağlanma yöntemi yukarıdaki metodlarda anlatıldığı üzere EDC/NHS ile fonksiyonel gruplar aktif hale getirildikten sonra bağlanmıştır. Ortamda bulunan serbest fajların uzaklaştırılması için mıknatıs yardımıyla manyetik alan uygulanarak partiküller bir yerde biriktirilerek 0.1 M PBS (pH 7.4) tamponu ile yıkama işlemleri en az üç kez yapılır. Son aşamada ilk kez uygulayacağımız faj bakteri tayinin çalışıp çalışmadığını kontrol edebilmek için SERS ile farklı derişimlerdeki *S. enteritidis* bakteri tayini yapabilmek için DTNB etiket içeren AuNPs antikör ile bağlanıp sandviç kompleks sistemi oluşturulmuştur. Ortamda etkileşime girmeyen bakterilerin ve diğer aşamada serbest antikör ile modifiye edilmiş AuNPs'in uzaklaştırılması için mıknatıs yardımıyla manyetik alan uygulanarak yıkama işlemlerin tamamlanmasından sonra hazır hale gelmiş olan sandviç kompleks yapı ince tabaka kromatografisi (TLC) yüzey üzerine damlatılarak SERS okumaları yapılmıştır. Şekil 4.35'de farklı konsantrasyonlardaki bakterinin SERS okumalarından sonra DTNB etiketine ait olan 1336 cm^{-1} deki nitro gerilme bandına bağlı olarak elde edilen spektrumların kalibrasyon grafiği gösterilmiştir. Kalibrasyon grafik sonuçları faj ile yapılan bu çalışmanın bakteri derişimine bağlı olarak SERS sinyallerinde artış göstermesi sistemin başarılı olduğunu ve antikora alternatif bir yöntem olduğunu göstermiştir.

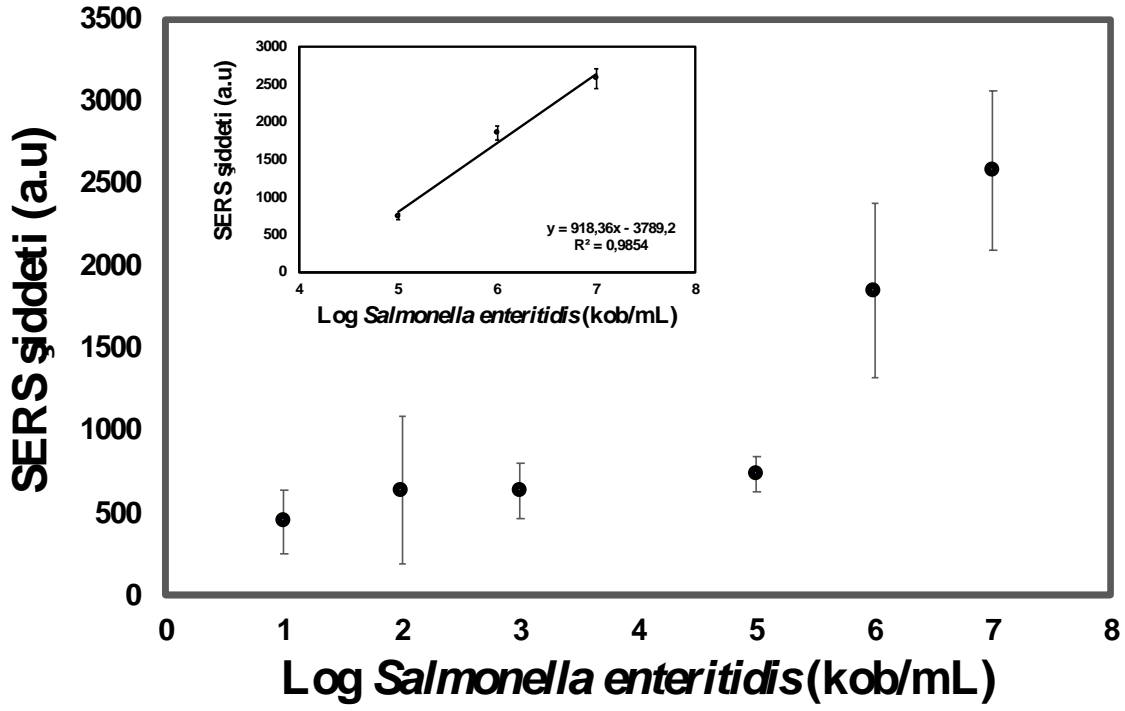


Şekil 4.35. *Salmonella enteritidis* SERS kalibrasyon resim ve grafiği.

4.2.3. Farklı yüzey modifikasyonları ile *S. enteritidis* tespiti

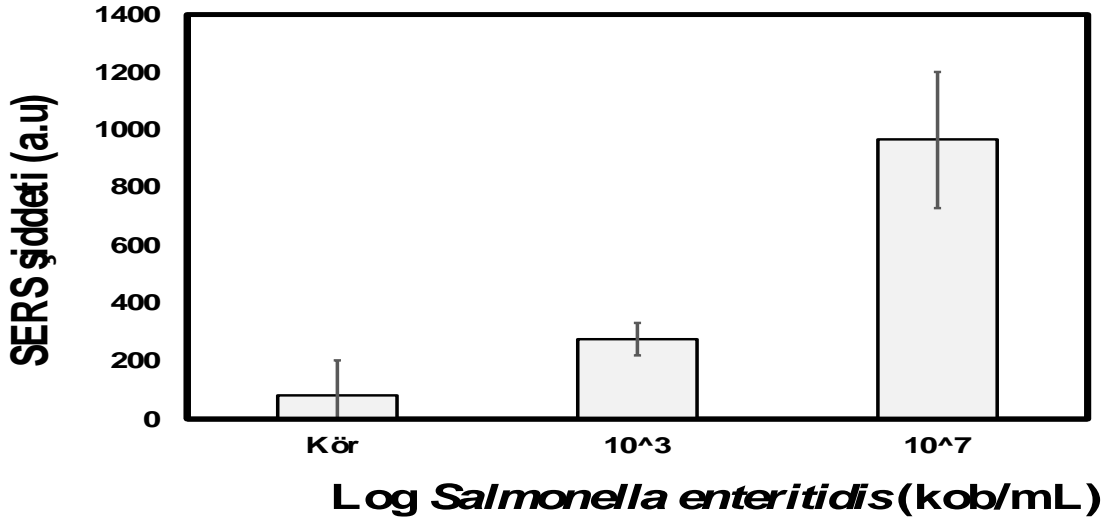
Bakteriyofaj çalışmalarında daha iyi yöntem belirlemek ve fajın alternatif bir antikor olarak kullanılabilmesi için farklı yüzeyler *Salmonella* faj ve antikorla beraber modifiye edilmiştir. Au yüzey çalışmalarında ilk olarak yüzeyde karboksil grupları oluşturmak için MUA (MerkaptoUndekonoik asit) saf etanol çözeltisi içerisinde dispers edildikten sonra gece boyunca karıştırıcıda Au yüzey ile bekletilerek gerçekleştirildi. Ardından yüzeyler PBS tampon ile yıkanarak faj ile kovalent bağlanma aşamasına hazır hale getirildi. Yüzeyler yukarıdaki aynı prosedürler kullanılarak EDC/NHS aktivasyon ile kovalent olarak yüzeye bağlanmıştır. Altın nanopartiküller SERS aktif molekülü olan DTNB ile etkileştirilip bakteri antikoruna ile modifiye edilmiştir. İlk olarak faj bağlı Au yüzeyler 30

dk boyunca hedef bakteri ile etkileştirilip daha sonra yıkamaları yapılmıştır. Aynı işlemler AuNPs içinde uygulanmış ve yüzey üzerinden SERS okumaları yapılmıştır.



Şekil 4.36. Faj temelli altın yüzey ile *Salmonella enteritidis* SERS kalibrasyon grafiği.

Şekil 4.36'da elde edilen sonuçlara baktığımızda düşük bakteri konsantrasyonlarda faj temelli altın yüzey çalışmalarında lineer bir artış gözlemlenmedi. SERS spektrum verilerine göre çizilen grafikteki kalibrasyon eğrisi 10^5 kob/mL bakteri derişiminden sonra doğrusal bir artış göstermekte ve korelasyon kat sayısı (R^2) 0,985 elde edilmiştir. Elde edilen kalibrasyon grafiklerdeki eğimler değerlendirildiğinde oluşturmuş olduğumuz yöntem 10^5 kob/mL derişimdeki bakteri konsantrasyonlarından sonra hassas ve güçlü SERS sinyallerini elde edilmesini sağlamıştır.



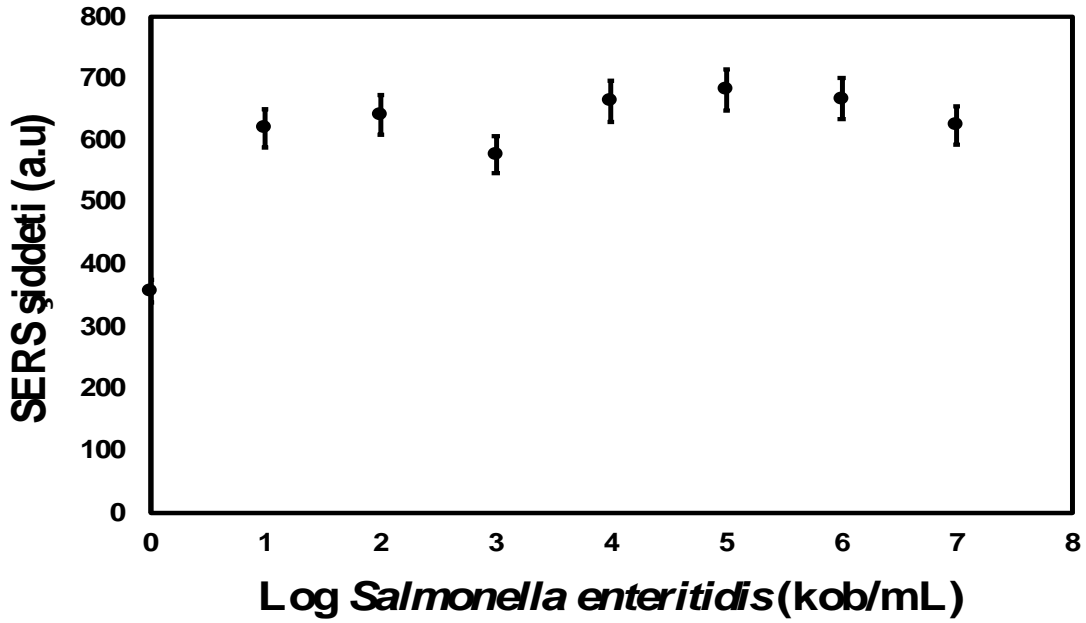
Şekil 4.37. Bakteriyofaj temelli altın elektrot yüzey ile bakteri SERS sinyalleri.

Şekil 4.37’de elektrokimyasal çalışmalarda biyosensör olarak kullanılan ticari altın elektrotlar kullanılmıştır. Ticari üretilen bu sistemin yüzeyinde dikdörtgen şeklinde küçük boyutlarda üç altın yüzey bulunmaktadır. Özellikle bilimsel çalışmalarda biyolojik örneklerin algılanmasında kullanılması ve altın yüzeyin az alan kaplamasından dolayı daha az sarfiyat ve hassas sonuçlar elde edebilmek için bu altın elektrotun yüzeyi tercih edilmiştir. Altın elektrotun yüzeyi yukardaki prosedürle aynı şekilde modifiye edilerek SERS sonuçları raman etiketi ile takip edildi. Yüzeyde üç altın yüzey bulunduğu için yüksek konsantrasyon 10⁷ kob/mL ve düşük konsantrasyon 10³ kob/mL olarak seçildi, diğer yüzey bakteri içermeyen kör çalışma yapılması için tercih edildi. Üç noktadan elde edilen SERS piklerine baktığımızda bakteri konsantrasyonuna bağlı olarak artış görülmektedir. Ama şekil 4.36’daki kalibrasyon grafiğindeki bakteri konsantrasyonu (10⁷ kob/mL) altın elektrot yüzeydeki konsantrasyondan (10⁷ kob/mL) daha yüksek SERS sinyal şiddetine sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle faj temelli Au yüzeylerden doğru ve hassas bakteri tayini yapmanın ideal olmadığını özellikle düşük derişimlerde bakteri tayininin yapılmasının oldukça zor olduğu anlaşılmıştır.

4.2.4. Faj bazlı ELISA plaka ile bakteri tayini

ELISA 96 kuyucuklu plaka üzerine *Salmonella* faj kuyucuklardan 8 tanesine eklenerek plaka yüzeyinde bulunan polisitren polimeri ile fiziksel adsorbsiyon ile bağlanarak modifiye edilmiştir. Yüzeye tutunan bakteriyofajların ortamda adsorbe olamayan fajlardan ayırmak için üç kez PBS tampon ile yıkama işlemi yapılmıştır. Hedef bakteri

ile 30 dk boyunca etkileştirilip tekrar yıkama işlemi yapılmıştır. Son aşamada raman etiketli antikor ile bağlı olan AuNPs eklenerek sandviç kompleks yapısı oluşturulmuştur.

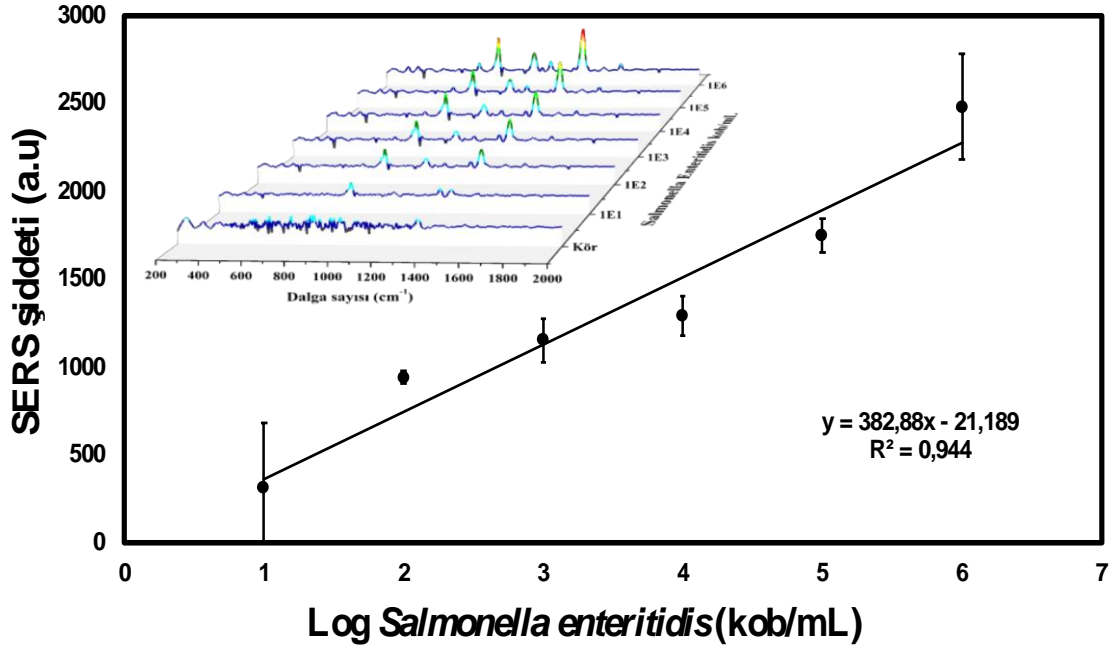


Şekil 4.38. Faj bazlı ELISA plaka yüzey ile bakteri SERS kalibrasyon grafiği.

Sistemin kolaylığı ve kolorimetrik çalışmalarda daha kullanışlı olmasından dolayı tercih edildi. Ama yapılan kalibrasyon çalışmalarında artan bakteri derişimine bağlı olarak SERS sinyallerinde doğrusal bir artış görülmedi (şekil 4.38). Hatta tüm bakteri konsantrasyonlarından elde edilen SERS pikleri birbirine çok yakın değerler olarak görüldü.

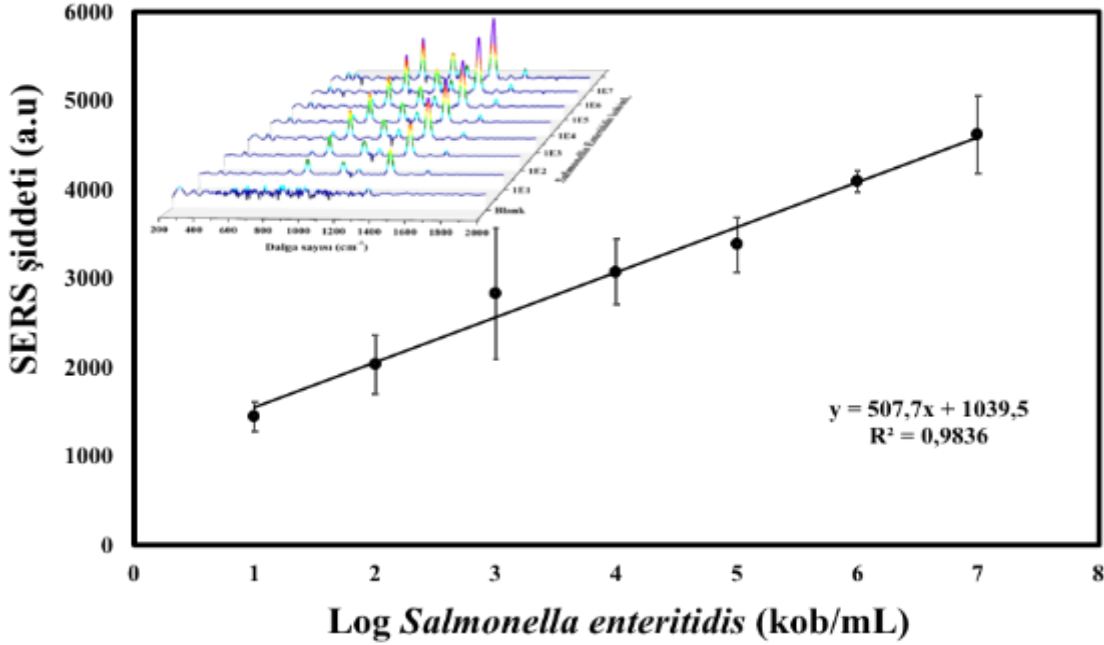
4.2.5. Bakteriyofaj bazlı kağıt tabanlı LFIA sistem

Salmonella faj temelli kağıt tabanlı LFIA yönteminin daha hassas ve yüksek performansla *S. enteritidis* tayininde kullanılabilmesi için öncelikle yöntemin temel taşlarından biri olan konjugasyon ve test çizgisi ilk olarak antikor ile modifiye edildikten sonra kademeli olarak faj kullanılarak numuneden *S. enteritidis*'in seçimli bir şekilde yakalanmasını sağlayan hızlı ve hassas bir yöntem geliştirilmiştir. Bu amaçla AuNPs *S. enteritidis* antikor EDC/NHS aktivasyon yöntemiyle kovalent bağlanır ve test çizgisi avidin-biotinli *S. enteritidis* antibadi ile nitroselüloz yüzey üzerine çizilerek kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı derişimlerdeki (10^1 kob/mL- 10^7 kob/mL) hedef bakteri kağıt tabanlı yüzey üzerinden yürütülerek kalibrasyon grafiği elde edilmiştir (şekil 4.39).



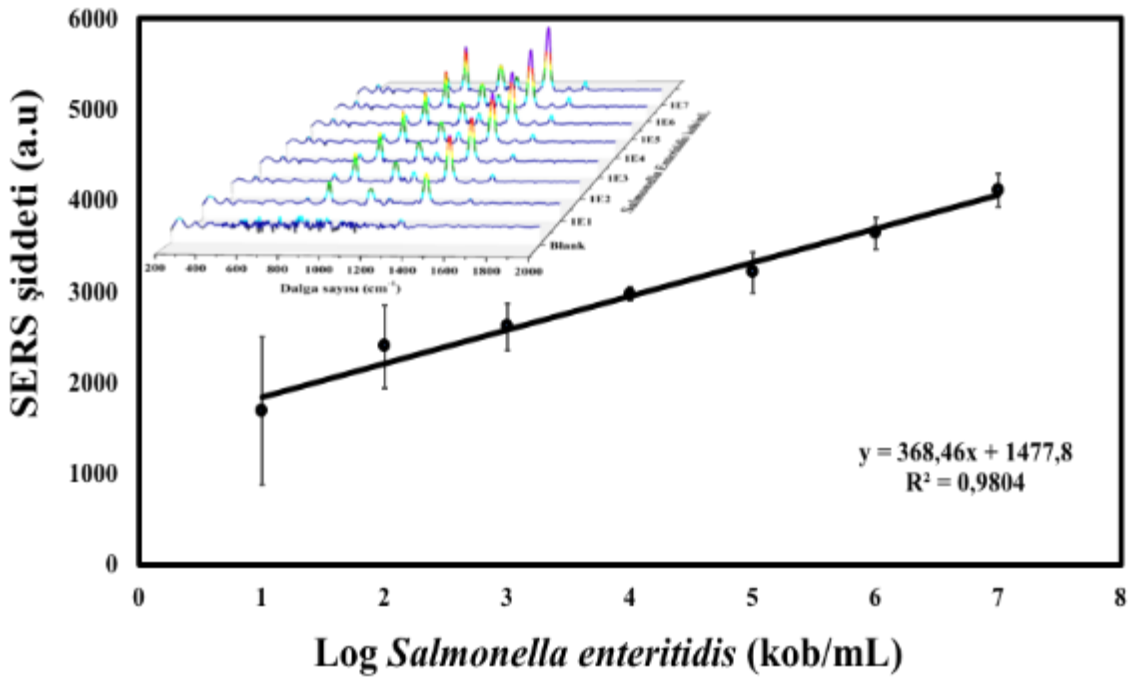
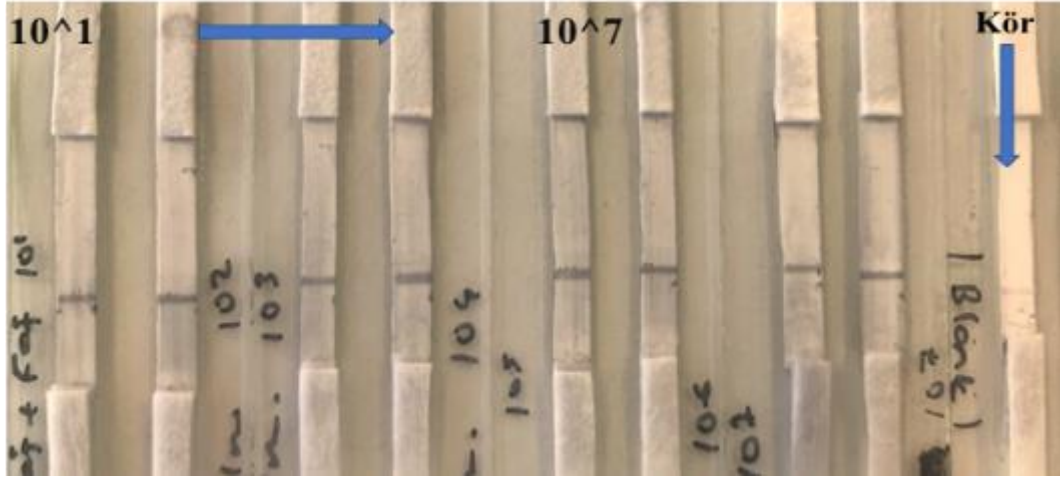
Şekil 4.39. *S. enteritidis* tayini için SERS kalibrasyon grafiği (test çizgisi:antikor, konjugasyon:antikor ile modifiye edilen AuNPs).

Bakteriyofaj tabanlı LFIA sistemi inşa etmek için kalibrasyon çalışmalarında ikinci optimizasyon aşaması olarak, test çizgisi şekil 4.32 deki gibi avidin-biotinli *S. enteritidis* antibadi ile yüzeye çizilirken konjugasyon ped bölümünde AuNPs *Salmonella* faj ile kovalent olarak bağlandı, raman sinyallerinin takibi için DTNB SERS etiketi kullanıldı. Farklı derişimlerdeki hedef bakteri nitroselüloz membran yüzeyinde yürütüldükten sonra SERS sinyallerine göre kalibrasyon grafiği şekil 4.40'da gösterilmiştir.



Şekil 4.40. *S. enteritidis* tayini için SERS kalibrasyon grafiği (test çizgisi:antikor, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs)

Son aşamada artık tamamen *Salmonella* faj tabanlı kağıt LFIA sistem inşa etmek için modifikasyonlar yapılmıştır. Bu aşamada diğer kalibrasyon grafiklerinin sonuçlarına göre kıyas yapabilmek ve sistemin çalıştığını anlayabilmek için test çizgisi ve konjugasyon kısımları tamamen *Salmonella* faj ile kovalent olarak bağlandı. Elde edilen SERS piklerinin *S. enteritidis* bakterisinin derişimine bağlı olarak kalibrasyon grafiği şekil 4.41’de gösterilmiştir. Kalibrasyon grafiklerinin iç kısmına DTNB raman aktif maddenin SERS spektrumlarından oluşturulan grafikleri eklenmiştir. Elde edilen sonuçların varlığında farklı antikor ve faj modifikasyonlar ile oluşturulan SERS kalibrasyon grafikleri göz önünde bulundurulduğunda şekil 4.40 (test çizgisi: antikor, konjugasyon ped: faj) ve şekil 4.42’de (test çizgisi: faj, konjugasyon ped: faj) oluşturulan kalibrasyon grafikleri hedeflenen *S. enteritidis* bakterisini belirlenmesi için ideal bir yöntem olduğunu göstermektedir. Tüm optimizasyon basamaklarının bakteri antibadisi ile yapılan çalışmalarda kalibrasyon eğrisinden elde edilen korelasyon kat sayısı (R^2) diğer kalibrasyon grafiklerden daha düşük olduğu görülmüştür. R^2 değerleri yukardan aşağıya verilen kalibrasyon grafiklerde sırasıyla 0,944, 0,984 ve 0,980 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar bakteriyofaj bazlı kağıt LFIA sisteminin hedef bakteri tayini için etkili bir yöntem olduğunu göstermiştir.

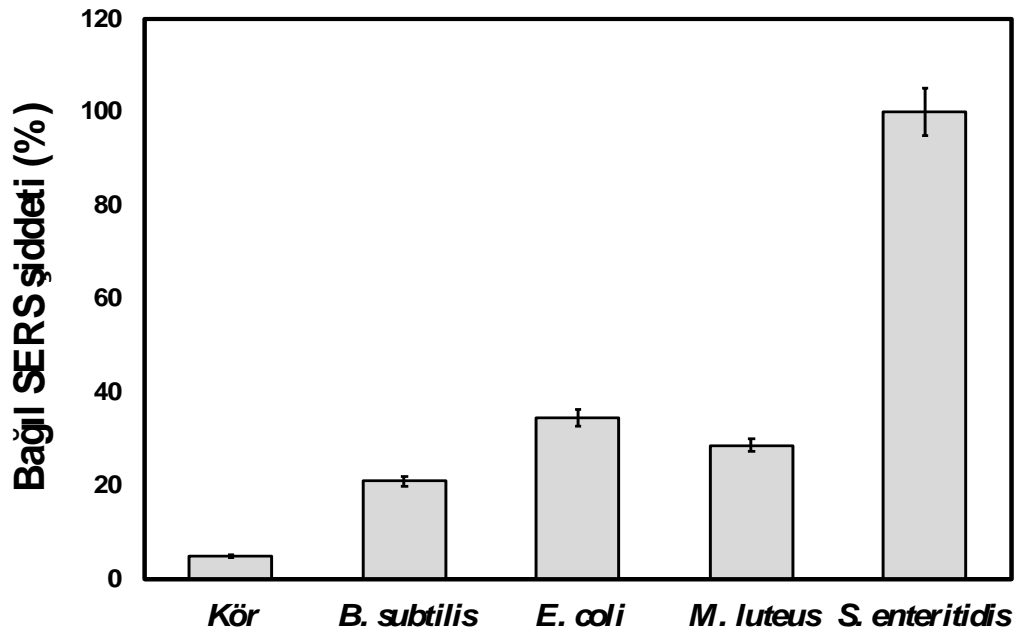


Şekil 4.41. *S. enteritidis* tayini için SERS kalibrasyon resim ve grafiği (test çizgisi:faj, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs).

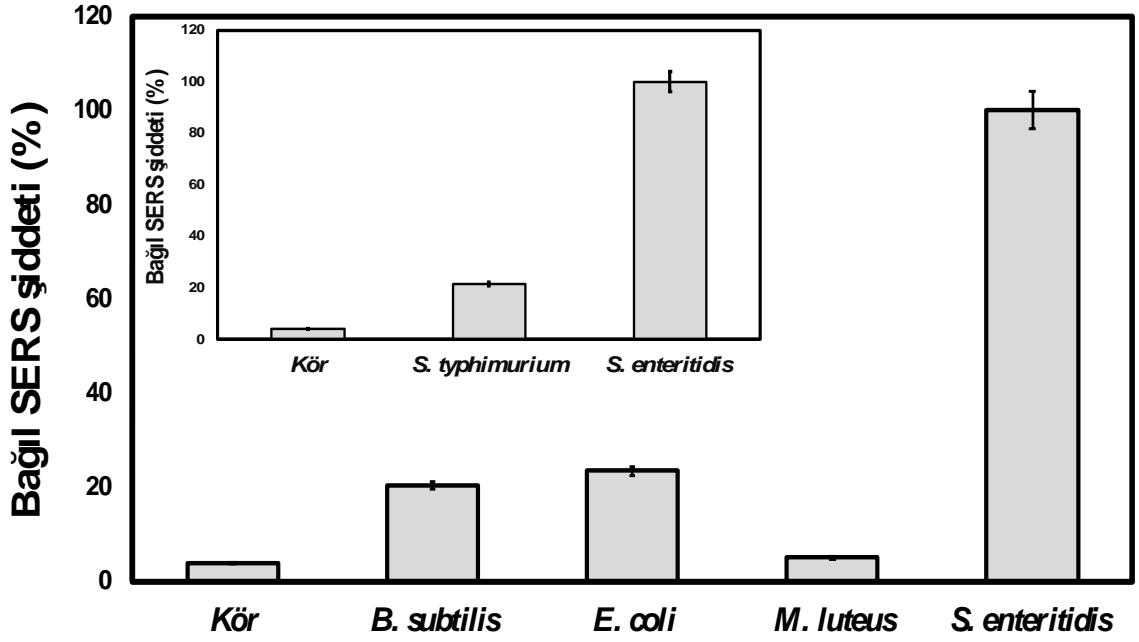
4.2.6. Bakteriyofaj tabanlı LFIA sistemin seçicilik çalışmaları

Salmonella faj tabanlı sistemde analit seçici ajan olarak *S. enteritidis* bakterisine seçici antikor ve faj kullanılarak başka bakteri türlerinin (*B. subtilis*, *M. luteus*, *E. coli*, *S. typhimurium*) ve spesifik olmayan etkileşimlerin oluşturmuş olduğumuz yeni yöntemle etkisini belirleyebilmek için validasyon denemeleri yapılmıştır. Sistemin başarılı kalibrasyon verilerinden yola çıkarak özellikle şekil 4.33 ve şekil 4.34'deki optimize edilen şartlar seçicilik deneylerinde de uygulanmıştır.

Faj tabanlı LFIA sistemde hedef bakterinin belirlenmesi için yapılan tüm adımlar aynı şekilde diğer bakteri türlerine de uygulanarak SERS değerleri elde edilmiştir (şekil 4.35-şekil 4.41). Şekil 4.42’de test çizgisi (antikor) ve konjugasyon ped kısmında bakteriyofaj ile immobilize edildikten sonra elde edilen SERS spektrum sonuçlarına göre oluşturulan sistem hedef bakteriye özgül olduğu grafikten anlaşılmaktadır. Tüm immobilizasyon aşamalarının faj ile inşa edilen LFIA sistemin (şekil 4.43) SERS sonuçlarında diğer sistemin sonuçları ile paralel olduğu görülmüştür. Ayrıca bakteriyofaj tabanlı LFIA sistemin özgüllüğünün daha iyi anlaşılması için *S. typhimurium* bakterisi kullanılarak sistemin doğruluğu SERS spektrum verileri ile doğrulanmıştır (şekil 4.43 iç kısımda).



Şekil 4.42. *S. enteritidis* seçicilik tayini için SERS sonuçları (test çizgisi:antikor, konjugasyon:faj ile modifiye edilen AuNPs).

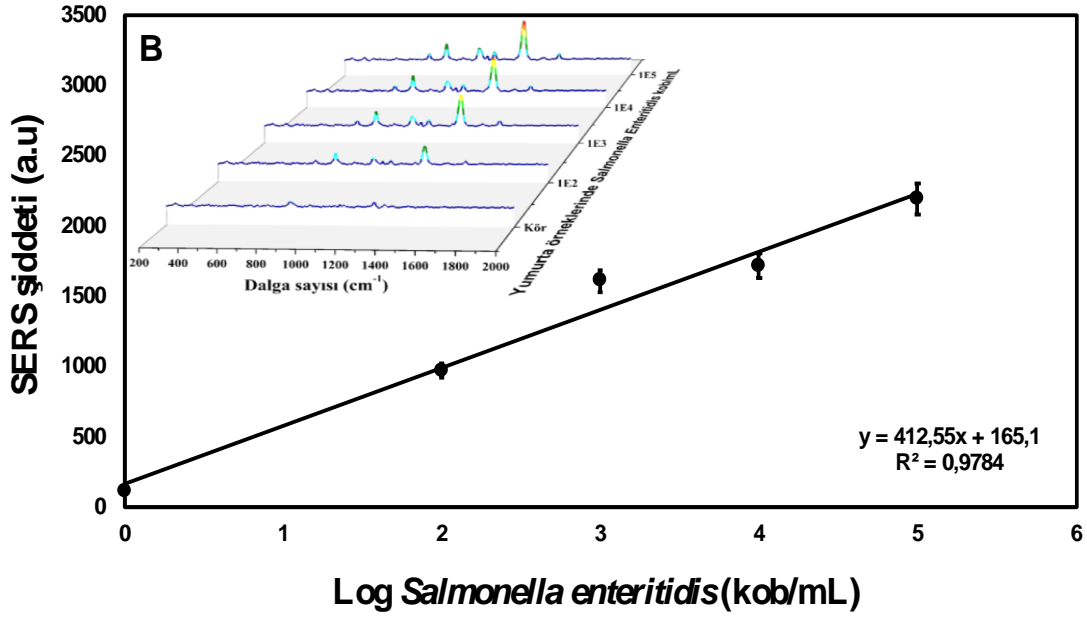
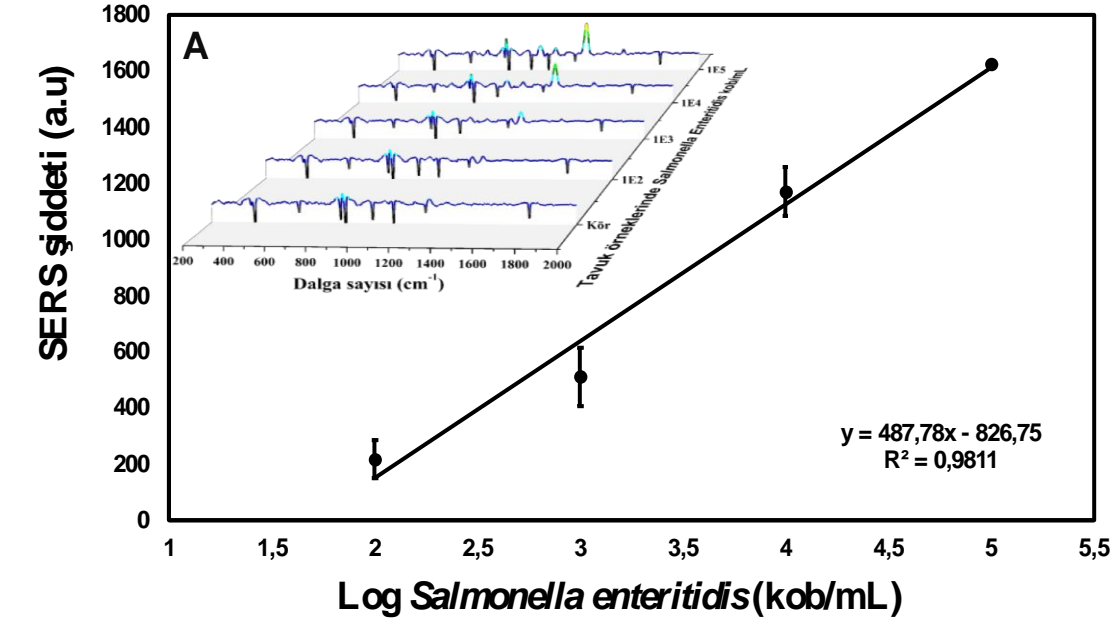


Şekil 4.43. Belirlenen bakteri seçicilik tayini için bağıl SERS sonuçları (test çizgisi:faj, konjugasyon:faj).

Seçicilik tespit denemeleri için kullanılan bakterilerin yukarıdaki grafiklerdeki sonuçlarına bakıldığında bağıl SERS şiddet değerleri *S. enteritidis*'den elde edilen değerlerin altında ve bakteri içermeyen kör çalışmasında çok düşük SERS pikleri içermesi geliştirilen faj tabanlı LFIA platformun yüksek özgülüğünü göstermektedir.

4.2.7. Bakteriyofaj tabanlı sistemin gerçek örnek denemeleri

Faj tabanlı sistemin kalibrasyon ve seçicilik çalışmalarından elde edilen verilerden sonra sistemin uygulanabilirliği ve doğruluğunu kontrol edebilmek için gerçek örnek denemeleri yumurta (şekil 4.44 (A)) ve tavuk eti (şekil 4.45 (B)) ticari olarak marketten alınarak geliştirmiş olduğumuz sistem üzerinde hedef bakteri tayini yapılmış ve oluşturulan kalibrasyon eğrilerinden SERS sinyal verileri kullanılarak gerçek örnekten hedef bakterinin derişimi ve yüzde geri kazanımı hesaplanmıştır. Yapılan tavuk eti ve yumurta çalışmalarında toplam 1 mL PBS tamponunda hedef bakteri ortama enfekte edilerek belirlenen konsantrasyonlar tampon çözeltisi ile seyreltme yapılarak ayarlandı. Kalibrasyon grafik R^2 değerleri tavuk için 0,981 ve yumurta için 0,978 olarak hesaplandı. Ayrıca gerçek örnek denemelerin yüzde geri kazanımları 10^2 kob/mL ile 10^5 kob/mL arasındaki konsantrasyonlar için sırasıyla tavuk çalışması için: %109, %93, %104, %102 (Çizelge 4.3);



Şekil 4.44. Faj tabanlı sistemde gerçek örnek denemelerinin SERS kalibrasyon grafikleri (A) tavuk eti (B) yumurta.

yumurta deneyleri için: %97, %116, %94, %98 olarak tespit edildi (Çizelge 4.4). Böylece gerçek örnek denemelerinde hedef bakterinin tespiti için faj tabanlı LFIA sistemin uygulanabilir ve hassas bir metot olduğunu göstermiştir.

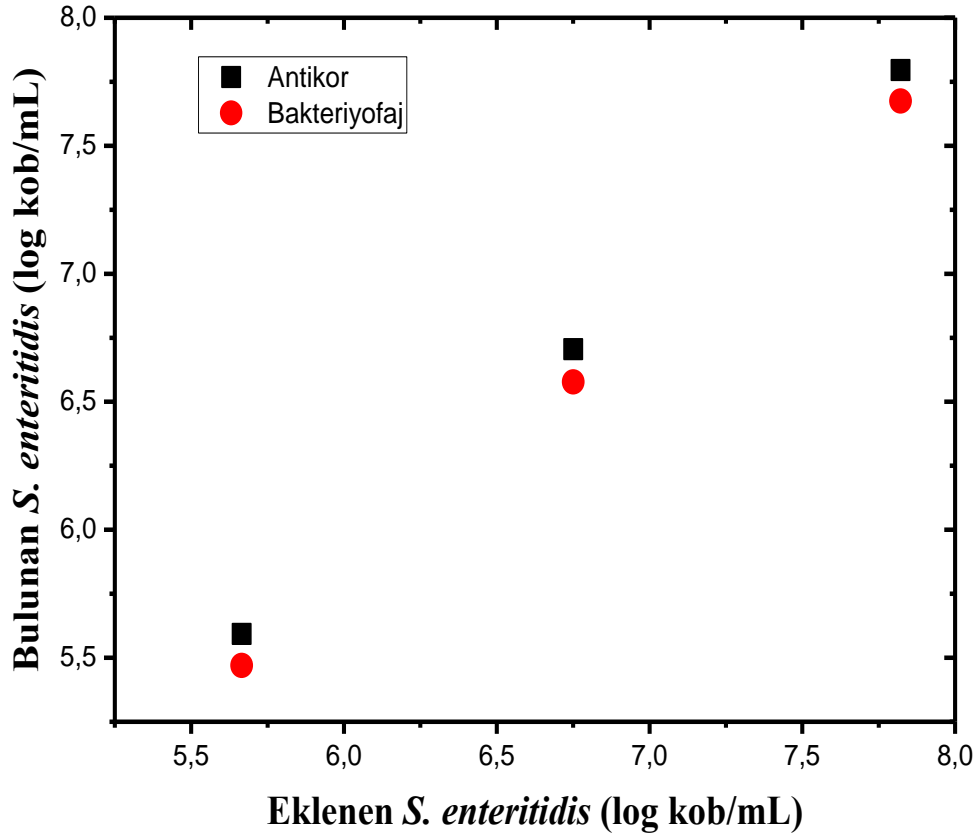
Çizelge 4.3. Tavuk örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları.

Eklenen <i>S. enteritidis</i> miktarı (kob/ml)	Bulunan <i>S. enteritidis</i> miktarı (kob/ml)	% Bağlanma
2	2,18	109,03
3	2,79	93,09
4	4,17	104,32
5	5,12	102,33

Çizelge 4.4. Yumurta örneklerinden elde edilen bakteri sayım sonuçları.

Eklenen <i>S. enteritidis</i> miktarı (kob/ml)	Bulunan <i>S. enteritidis</i> miktarı (kob/ml)	% Bağlanma
2	1,95	97,72
3	3,49	116,48
4	3,76	93,98
5	4,91	98,28

Canlı *S. enteritidis* bakteri sayımı deneyleri için antikor ve faj ile kovalent olarak bağlı AuNPs kullanılarak uygun besi ortamına ekilerek oluşan kolonilerden dilüsyon hesabı yapılarak klasik sayım işlemleri yapılmıştır. Şekil 4.45’de verilen *S. enteritidis* konsantrasyonuna karşılık etkileşimlerden sonra elde edilen yani bulunan bakteri sayısı hesaplanmıştır. Grafikteki verilere göre sisteme verilen bakteri sayısı ile bulunan bakteri konsantrasyonuna birbirine çok yakın değerler olduğu görülmüştür. Ayrıca *S. enteritidis* antikor ve faj ile yapılan çalışmalarda antikor ile gerçekleştirilen işlemlerin faj ile yapılanlara kıyaslandığında birbirlerine çok yakın ve paralel sonuçlar olduğu görülmektedir. Çizelge 4.5’de 10^4 - 10^6 kob/mL *S. enteritidis* miktarları kullanılarak yapılan klasik sayım sonuçlarına bakıldığında antikor ve bakteriyofaj ile modifiye edilmiş olan partiküllerin bakteriyi yaklama yüzdeleri 10^4 kob/mL derişimi için sırasıyla %84, %66; 10^5 kob/mL için %90, %69; 10^6 kob/mL için %94, %75 değerleri elde edilmiştir.



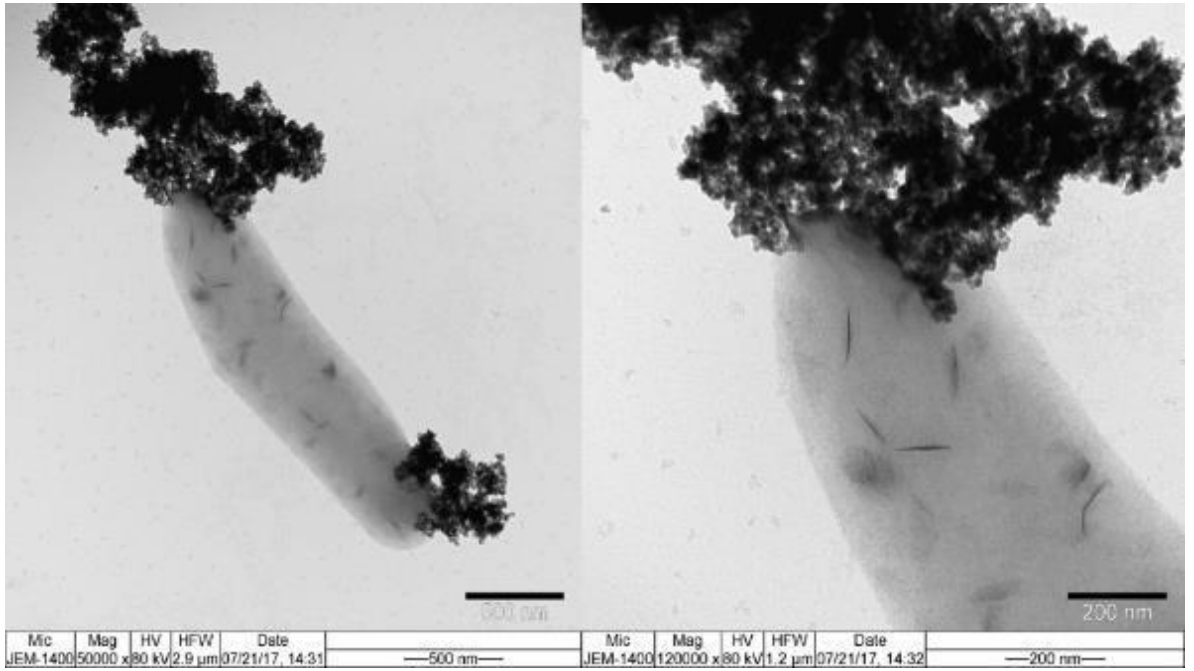
Şekil 4.45. Klasik bakteri sayım metodu ile antikor ve faj modifiye *S. enteritidis* bakteri miktarlarının karşılaştırılması.

Çizelge 4.5. Antikor ve bakteriyofaj ile modifiye edilmiş olan AuNPs'in klasik bakteri sayım sonuçları.

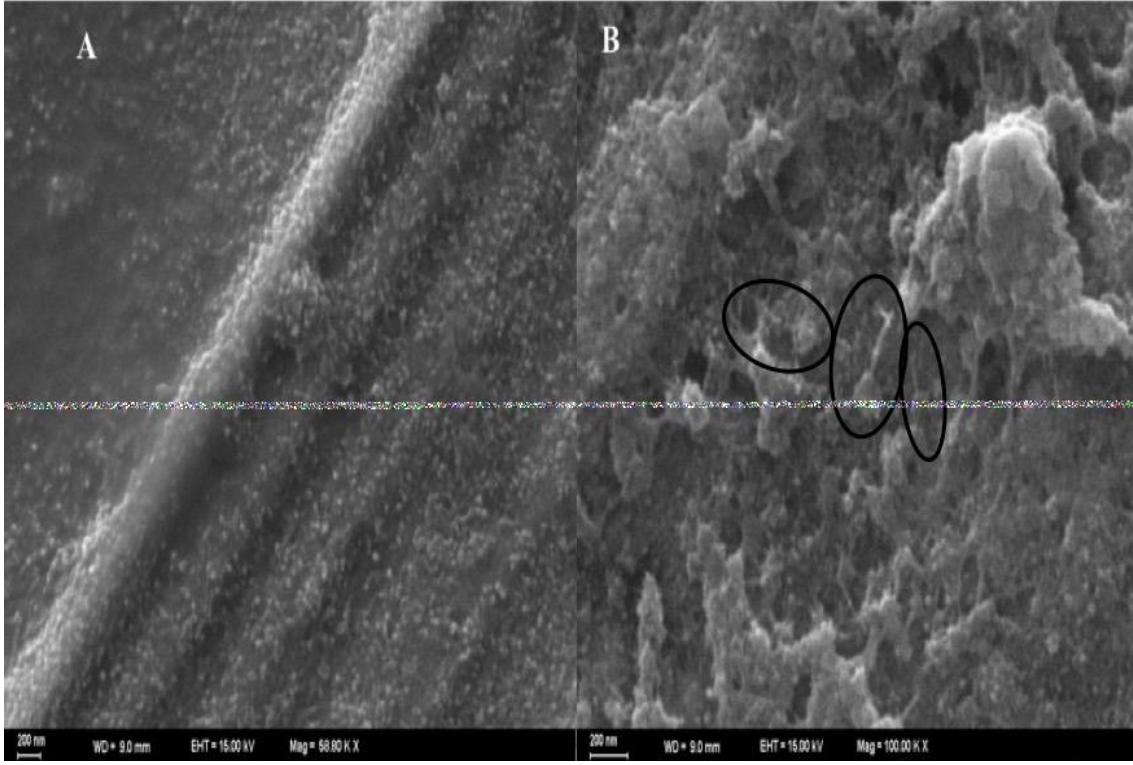
Eklenen Orijinal Bakteri (log ₁₀ kob/mL)	Bulunan (Antikor+AuNP) Bakteri (log ₁₀ kob/mL)	Bulunan Bakteriyofaj+AuNP Bakteri (log ₁₀ kob/mL)	Blank 1 AuNP + Tampon	Blank 2 Bakteriyofaj kaplı AuNP+Tampon	% Bağlanma	
					Antikor	Faj
4,63±0,12	3,92±0,12	2,95±0,05	0	0	% 84	% 66
5,63±0,12	5,07±0,09	3,78±0,01	0	≤10	% 90	% 69
6,63±0,12	6,25±0,18	4,73±0,12	0	10	% 94	% 75

Bakteriyofaj kaplı manyetik partiküllerin ilgili bakteri ile etkileşiminin TEM görüntüleri şekil 4.46'da verilmiştir. Karboksil grup ile modifiye edilmiş olan demir partiküller EDC/NHS ile aktive edildikten sonra *S. enteritidis* fajına kovalent olarak bağlanması

gerçekleştirildi. *S. enteritidis* bakterisi faj modifiye manyetik partiküller ile 30 dk boyunca 650 rpm’de karıştırıcıda etkileştirildi. Daha sonra tampon çözelti ile üç kez yıkaması yapıldıktan sonra TEM görüntüleri alındı. TEM sonuçlarına bakıldığında faj ile fonksiyonel hale getirilmiş olan demir partiküller hedef bakteriyi yakalarken, bakteriyofajların boyutlarından ve biyolojik bir örnek olmasından dolayı görüntülenmesi sağlanamamıştır. Şekil 4.47 (A) *Salmonella* faj yüzeye tutturulduktan sonra elde edilen TEM görüntüsü ve (B) yüzeye daha yakın açıdan yapılan TEM çalışmasındaki *Salmonella* fajın görüntüleri gösterilmiştir.



Şekil 4.46. *Salmonella* faj ile yüzeyi kaplı olan manyetik partiküllerin TEM resmi.



Şekil 4.47. A) *Salmonella* faj B) *Salmonella* fajın yakınlaştırılmış açıdan görüntüsü.

5. YORUM

Bu çalışmada benzalkonyum klorür ve sitrat varlığında altın nanopartiküller sentezlenmiştir. Sentez parametreleri optimize edilmiş olan bu altın nanoparçacıkların bakteri etkileşiminden sonra Raman saçılımını güçlendirici etkileri incelenmiştir. Sentezlediğimiz altın nanopartiküller arasında, SERS sinyallerini yüksek analitik performansla (yüksek duyarlılık, doğruluk, tekrar üretilebilirlik) güçlendirebileceğini düşündüğümüz altın nanopartiküller kullanılmıştır. Kağıt tabanlı LFIA sistemlerin konjugasyon bölümünde kullanılmak üzere benzalkonyum klorür ile sitrat bazlı AuNPs sentezlenmiştir. Kağıt tabanlı sistemlerde ve SERS ölçümlerinde doğru sonuçlar elde etmek için altın nanopartiküller kullanılmaktadır. Benzalkonyum AuNPs'nin SERS etiketi DTNB üzerindeki sinyal güçlendirici etkilerini incelemek ve kantitatif analizde etkinliği izlemek için kağıt tabanlı sistemin konjugasyon pedinde immobilize edildikten sonra *E. coli* tayini için 10^1 - 10^7 kob/mL miktarlarına uygulanarak kalibrasyon grafiği elde edilmiştir. Şekil 4.3'de verilen kalibrasyon grafiği incelendiğinde benzalkonyum AuNPs'in düşük *E. coli* derişimlerdeki SERS şiddetleri konsantrasyona bağlı olarak değişmezken, 10^5 kob/mL ve üzeri bakteri miktarlarından sonra SERS şiddeti artış göstermiştir. Bu sonuç ışığında kullanılan partikülün tespit limiti 10^5 kob/mL olarak belirlenmiştir. Elde edilen SERS spektrum sonuçlarına göre en duyarlı sonuç veren partiküllerin %0.01 HAuCl₄ kullanılarak sitrat varlığında sentezlenen yaklaşık 20 nm boyutundaki parçacık olduğu görülmüştür. Aynı zamanda bu parçacığın kolay agregasyon olmadığı, konjugasyon pedine emdirildikten sonra da rengini koruduğu ve yatay akış şeritlerinde akışının kolay sağlandığı gözlemlenmiştir. Sentezlenen AuNPs iki farklı Raman etiketiyle modifiye edilmiştir ve en iyi sonuç veren etiket kullanılmıştır. Kullanılan Raman etiketleri AuNP çözeltisinde agregasyona neden olmamaları ve en iyi sinyali vermeleri açısından kıyaslanılmışlardır. Çalışmada AuNPs suda çözünen glutatyon ve etanolde çözünen DTNB karşılaştırılmıştır. Hazırlanan konjugasyon çözeltileri konjugasyon pedlerine emdirilmiş ve oda sıcaklığında kurumaya bırakılmıştır. Yatay akış immunoassay platformları hazırlanıp *E. coli* örnekleri sisteme verilmiş ve Raman spektroskopisi (SERS) ile test çizgileri ölçülmüştür. Elde edilen veriler doğrultusunda 20 ve 50 mM DTNB içeren çözeltilerde agregasyon gözlemlenmiş, 1 ve 10 mM DTNB içeren çözeltilerde ise agregasyon gözlemlenmemiştir. Glutatyon kullanılan çözeltilerin ise hiçbirinde agregasyon gözlemlenmemiştir. Ancak glutatyon ile hazırlanan konjugasyonların kullanıldığı örneklerde tüm konsantrasyonlardaki SERS sinyalleri çok

düşük çıkmıştır. Bu nedenle etiket olarak DTNB kullanımına karar verilmiştir. 1 mM DTNB içeren konjugasyon çözeltisi kullanılan örneklerde sinyallerin yeterince yüksek olması ve daha az madde sarfiyatı için 1 mM DTNB konsantrasyonu tercih edilmiştir.

Kağıt tabanlı LFIA platformunun *E. coli* örneklerine uygulanması sırasında platformun hazırlanması büyük önem taşımaktadır. Öncelikle kullanılacak olan nitroselüloz membranlar Şekil 3.5’de belirtilen ölçülerde hazırlanmıştır. Daha sonra konjugasyon pedi olarak kullanılacak olan glass fiber membrana hazırlanmış olan Raman etiketli AuNP konjugasyon çözeltisinden 25 µL emdirilmiş ve kurumaya bırakılmıştır. Örnek pedi için yine aynı membran kullanılmış ve %5 BSA, % 0.05 Tween 20 içeren PBS (pH: 7.4) tamponuna daldırılıp kurumaya bırakılmıştır. Test membranı olarak nitro selüloz membran kullanılmıştır ve test çizgisi için 100 µg/mL biyotinli antikor çözeltisi ile 1000 µg/mL avidin çözeltisi eşit oranda karıştırıldıktan sonra membran üzerine çizilmiş, kontrol çizgisi için ise 100 µg/mL anti fare IgG aynı membran üzerine çizilmiştir. Emiş pedi herhangi bir ön işlemden geçirilmemiştir. Tüm membranlar kuruduktan sonra platform oluşturulmuş ve 100 µL PBS (pH: 7.4) tamponunda 10^1 ’den 10^8 ’e değişen konsantrasyonlarda hazırlanan *E. coli* örneklerine verilmek için hazır hale getirilmiştir.

Yaptığımız tez kapsamında iki farklı metod uygulanarak patojen bakteri tayini için kağıt tabanlı sistemler geliştirilmiştir. Bu metodlar: 1) manyetik ekstraksiyona dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem 2) Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem. Geliştirmiş olduğumuz sistemlerin tüm modifikasyon, validasyon basamakları ve elde edilen sonuçların yapılan literatür çalışmaları ile karşılaştırılmaları aşağıda detaylı olarak tartışılmıştır.

1) Manyetik ekstraksiyona dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem:

E. coli için DTNB etiketli yatay akış immunoassay çalışmaları optimizasyon, validasyon ve uygulama çalışmalarıyla tamamlandıktan sonra manyetik nanoparçacıklar kullanılarak *E. coli*’nin numune ortamından ekstrakte edilmesine dayalı bir yöntem daha geliştirilmiştir. Manyetik nanoekstraksiyonun kolaylığı ve yüksek performansı sayesinde yatay akış immunoassay ile *E. coli* analizinin analitik performansının artırılması hedeflenmiştir. Bu yöntemde Yatay akış immunoassay yönteminin daha yüksek performansla *E. coli* analizinde kullanılabilmesi için öncelikle numuneden *E. coli* antikoruna ile modifiye edilmiş manyetik nanoparçacıklar kullanılarak ekstrakte edilmesi

ardından ekstraksiyon sonrası bakteri ile manyetik parçacıkların bağlantısının kesilerek çıkarılması, son olarak da yatay akış immunoassay şeritlerinde analiz edilmesi hedeflenmiştir. Bunun için öncelikle karboksil gruplu manyetik nanopartiküllerin üzerine kazeinin kovalent immobilizasyonu için karboksilik asit grupları EDC/NHS ile aktifleştirilmiştir. Bu amaçla 5 mg/mL manyetik nanopartikül çözeltisine 0.1 g EDC ve 0.3 g NHS ilave edilmiş ve karışım oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Bu süre sonunda manyetik partiküller mıknatıs yardımıyla toplandıktan sonra üç kez borat tamponu (pH 7.4) ile yıkanmıştır ve tekrar borat tamponu içerisinde dağıtılmıştır. Daha sonra bu çözeltiye 10 mg/mL kazein çözeltisi eklenmiş ve karışım 24 saat +4 °C'e karanlıkta karıştırılmıştır. Bu süre sonunda partiküller mıknatısla toplandıktan sonra fazla kazeini uzaklaştırmak için borat tamponu ile yıkanmıştır. Daha sonra bakteri ile etkileşimi sağlamak için *E. coli* antibadisi yine EDC/NHS aktivasyonu ile kovalent olarak kazein proteinine bağlanmıştır. Yıkamalar borat tampon ile yapıldıktan sonra manyetik partikül bakteri ile etkileşime hazır hale getirilmiştir. Modifiye manyetik partiküller farklı konsantrasyonlardaki bakteri numuneleri ile etkileştirilmiştir. Bir mıknatıs yardımıyla modifiye olmuş manyetik partiküller ve etkileşen bakteriler toplanmış ve ardından manyetik partiküller yıkanarak numune ortamındaki diğer bileşenler uzaklaştırılmıştır. Ardından borat tampon ortamında tekrar dağıtılan manyetik partikülleri bakteriden ayırmak için kazein proteini mikrobiyal rennet yardımıyla kesilmiştir. Mıknatıs kullanılarak manyetik partiküller uzaklaştırıldıktan sonra bakteri örnekleri yatay akış immunoassay şeritlerine uygulanmıştır. Yöntemin seçiciliği için *E. coli* ile birlikte *S. Enteritidis*, *B. Subtilis*, *M. Luteus* bakterileri manyetik nanoekstraksiyon uygulandıktan sonra test şeritlerinde analiz edilerek test edilmiş ve SERS spektrumları ölçülmüştür. Manyetik partikül sayısı, kazein miktarı ve rennet enzim miktarı optimizasyonu 10^5 kob/mL *E. coli* konsantrasyonunda uygulanarak en iyi şartlar belirlenmiştir. Ardından AuNP derişiminin etkisini bu yöntem için incelemek üzere, 5-30 µL aralığında AuNP konjugasyon pedine emdirilerek yatay akış test şeritleri hazırlanmıştır. Ardından 10^5 kob/mL *E. coli* içeren bir örnek yukarıda anlatıldığı şekilde manyetik nanoekstraksiyonla ekstrakte edilmiş ve test şeritlerine uygulanmıştır. Optimum değerler belirlendikten sonra farklı konsantrasyonlardaki (10^1 - 10^7 kob/mL) bakteri örneklerine yöntem uygulanmış SERS spektrumları ölçülmüştür. Kalibrasyon için kullanılacak bu deney üç farklı günde farklı örnekler kullanılarak tekrarlanmıştır. Son olarak idrar, kan ve süt içerisine 10^4 , 10^5 ve 10^6 kob/mL *E. coli* eklenerek yöntemin uygulanması gerçekleştirilmiştir.

Mekanik özellikleri, üç boyutlu lifli yapısı, uygun fiyatı, biyouyumluluğu ve biyobozunurluğu, üretim kolaylığı ve modifikasyonu nedeniyle sayısız avantajı olan kağıt tabanlı sensörler ve test platformları çok değerli bir alt yapı olmuştur. Günümüzde optik (kolorimetrik, floresan, SERS, transmitans) [38-41] ve elektrokimyasal (voltammetrik, potansiyometrik ve iletkenlik tabanlı) [42,43] yöntemleri daha sık kullanılmaktadır. Literatürlerde yapılan çalışmalarda, kâğıt bazlı SERS sensör ve test platformları sudaki fungusit [40], kan örneklerinde glikoz [44], Rhodamine 6G, organofosfat malatyon, eroin ve kokain gibi eser kimyasalların [45], tirozin ve sistein gibi amino asitlerin [46,47] belirlenmesi için kullanılmıştır. Bu arada, bir immün reaksiyonunun ölçülmesinde elektrokimyasal transdüser olarak polianilin temel alınarak *E. coli* O157: H7 tespiti için yatay akış immün sensörü tekniği geliştirilmiştir. Tespit limitinin (LOD) 10 dakikada $7,8 \times 10^1$ kob/mL olarak bulundu [48]. *E. coli* için bir başka immün sensör çalışmasında, sistem boyunca bir mikro akış içinde etiketsiz SERS kullanılarak tespiti yapıldı. Polietilen glikol (PEG) ve manyetik nanopartiküller kullanılarak LOD değerinin 4.485 hücre/mL olduğu bildirildi [49]. Literatürde, *E. coli* tespiti için kâğıt tabanlı yatay akış testi (LFA) ve kâğıt tabanlı analitik cihaz (PAD) kullanılmıştır. Pohlmann ve arkadaşları 25 dakikadan daha az bir sürede 5×10^4 kob/mL ile *E. coli* tespiti için LFA sistemi geliştirdiler. Bu sistemde DNA reseptör olarak kullanılmıştır [50]. Başka bir çalışmada primer antikor reseptör olarak kullanılmış ve *E. coli* 5×10^2 - 5×10^3 kob/mL tespit aralığında tespit edilmiştir [51]. *E. coli* tespiti için diğer LFA çalışması aptamer reseptörü ile yapıldı. Tespit sınırının 3×10^2 kob/assay olduğu bulundu [52]. PAD sistemlerinde, sırasıyla 10 kob/cm² ve 5 kob/mL tespit sınırlarında *E. coli*'yi saptamak için bakteri spesifik enzim ve primer antikor reseptörleri kullanılmıştır [7,53]. Çeşitli yöntemlerin tespit limitleri geliştirmiş olduğumuz yöntemle karşılaştırıldığında, geliştirilen kağıt bazlı LFIA yönteminin daha duyarlı olduğu görülmüştür. Geliştirilen yöntem ayrıca tespit edilen *E. coli* için seçici ve spesifiktir.

Geliştirdiğimiz kağıt tabanlı LFIA sistemi SERS ve *E. coli*'nin hızlı, güvenilir, hassas ve seçici bir şekilde tespiti için kullanılabilir. Kağıt bazlı LFIA'nın optimizasyon parametreleri (AuNP, Fe₃O₄/Au-PEI nanopartikülleri, kazein ve rennet enzim miktarı) gerçekleştirilmiştir. Yapılan optimizasyon çalışmalarında sitrat bazlı AuNPs'in 10^5 kob/mL *E. coli* ile etkileşdikten sonra elde edilen SERS sinyallerine bakıldığında konjugasyon pedine emdirilen AuNP arttıkça SERS sinyalleri de artmıştır. 25 µL AuNP miktarının üzerindeki SERS sinyalleri aynı oranda olduğu için optimum altın miktarı 25

μL olarak belirlenmiştir. Manyetik ekstraksiyon için kullanılan $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ nanopartikülleri yapılan sentez çalışmalarında, 2 mg/mL konsantrasyonda reaksiyon gözlenmezken, 5 mg/ml üzerindeki konsantrasyonlarda partiküllerdeki agregasyon problemlerinden dolayı en uygun miktar 5 mg/mL olarak belirlenmiştir. SERS sonuçlarından optimum $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ nanopartikül sayısı olarak en iyi sonucun elde edildiği 1.28×10^{14} partikül/mL (Şekil 4.22'de $250 \mu\text{L}$ 'ye karşılık gelmektedir) olarak belirlenmiştir. Kazeinle modifiye edilmiş $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ nanoparçacıkları, kağıt bazlı LFIA sistemi geliştirmek için önceden konsantre edilmiş bakterilerden rennet enzimi ile kesilerek ayrıldı. Enzim substrat olarak kazeinin optimizasyon çalışmalarında bakteri ile etkileştirilip kağıt tabanlı sisteme verildikten sonra elde edilen SERS garfıği şekil 4.24'de gösterildiği üzere 7 mg/mL olarak belirlenmiştir. Ayrıca şekil 4.25'de rennet enzim miktarı için yapılan çalışmada istenilen bakterinin $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ nanopartiküllerinden ayırmak için kullanılan optimum miktar $5 \mu\text{L}$ olarak tespit edilmiştir. Yapılan kalibrasyon çalışmalarında manyetik ekstraksiyon yöntemi ile istenilen bakterinin $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{Au-PEI}$ nanopartikülleri yardımıyla yakalandıktan sonra enzim varlığında partiküllerden bakterinin ayrılması için yapılan kağıt tabanlı sistemin SERS sonuçları göstermiştir ki 60 dakika içinde $0,52 \text{ kob/mL}$ LOD değeri ile farklı *E. coli* derişimleri (10^1 - 10^7 kob/mL) arasında doğrusal bir ilişki elde edilmiştir. *E. coli* tespiti için yukarıda belirtilen modifikasyon aşamaları klasik sayma yöntemleriyle karşılaştırılarak elde edilen sonuçların birbirleri ile uyum içinde olduğu belirlenmiştir. Yaptığımız çalışmada idrarda, kanda ve sütteki *E. coli*'yi saptamak için kağıt tabanlı LFIA sistem geliştirdik. Elde edilen sonuçlar SERS kullanılarak ölçüldü. Yakalama etkinliği, idrar, kan ve sütte sırasıyla % 86.4, %93 ve % 89.6 olarak bulunmuştur.

Yöntemin seçiciliği *S. Enteritidis*, *B. Subtilis*, *M. Luteus* bakterileri ile test edilmiş ve bu bakterilerin SERS ölçümleri ile gerçekleştirilen *E. coli* tayininde girişim etkisi gözlenmemiştir. *E. coli* bakterisi için kalibrasyon grafiğinde doğrusal aralık 10^1 - 10^7 kob/mL dir. *E. coli* tayini için toplam analiz süresi bir saatten az ve teşhis sınırı ise $0,52 \text{ kob/mL}$ olarak tespit edilmiştir. Bakteri tayini için kullanılacak nanopartiküllerin tasarımı, sentezi ve yüzey modifikasyonu, karmaşık bir numuneden *E. coli* bakterisinin etkili bir şekilde ayrılmasına olanak sağlamış ve ayrıca biotinli antikorların kontrollü bir şekilde avidin-bağılı nanopartikül yüzeyine immobilizasyonu ile de kağıt tabanlı LFIA platformları üzerinden SERS sinyali alınarak veri analizi yapılmıştır. Şekil 4.28'de

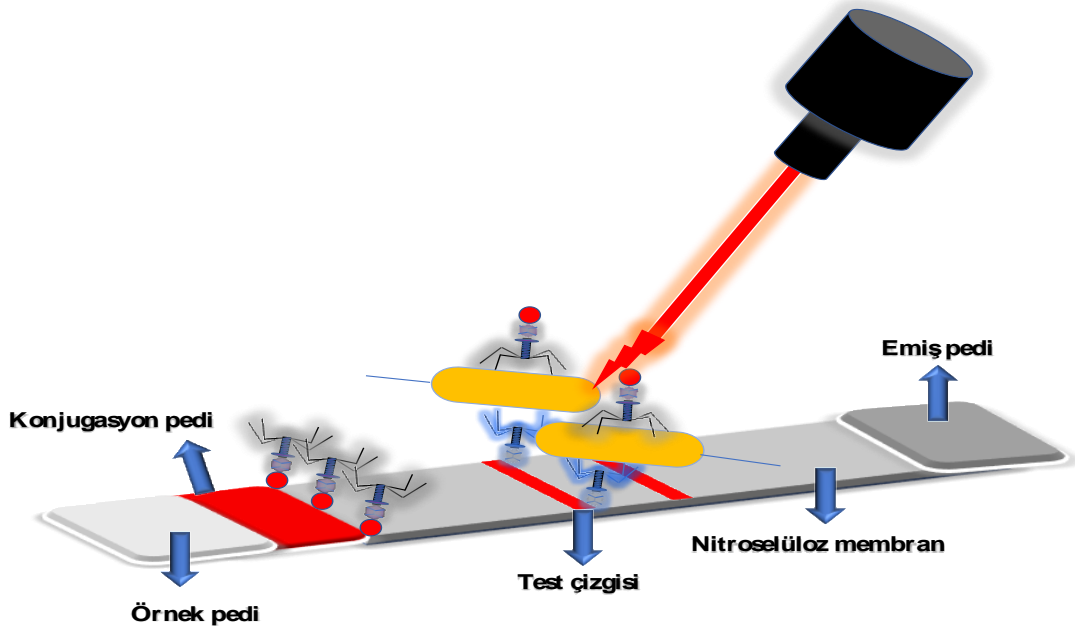
gösterilen SEM görüntüleri ile test çizgisinde yakalanan *E. coli* bakterileri görülmektedir. Geliştirilen yatay akış immunoassay stripinin *E. coli* bakterisi için çalıştığı kanıtlanmıştır.

Bu sonuçlara dayanarak, geliştirmiş olduğumuz kağıt tabanlı yatay akış immünoaaasy sistemin manyetik ekstraksiyon yöntemi ile enzim varlığında kesilip daha sonra miknatis yardımıyla PBS tamponuna alınan, idrar, kan ve süt numunelerinde *E. coli*'nin hızlı ve hassas tespiti için kullanılabileceği gösterilmiştir. Önerilen yöntem diğer bakterilerde uygulanabilir. Geliştirilen analitik yöntem, seçiciliği ve özgüllüğü yanı sıra duyarlılığı açısından da kendini kanıtlamıştır.

2) Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı LFIA sistem:

Geliştirmiş olduğumuz bakteriyofaja dayalı LFIA platformların yukarıda belirtmiş olduğumuz manyetik ekstraksiyon temelli LFIA sisteminden farklı olarak hedef bakteri *S. enteritidis* seçilmiş ve herhangi bir ayırma işlemi yapılmadan direkt olarak sisteme verilmiştir. Tipik kağıt tabanlı LFIA sistemi meydana getiren yapı incelendiğinde birbirinden farklı malzemelerden oluşan ve farklı amaçları olan bölgeler görülecektir. Numune strip olarak adlandırılan kısım numunenin damlatıldığı fiber glass yapıdaki örnek pedi olmak üzere, istenilen bakteriyi tespit etmek için modifiye altın nanopartiküllerin emdirildiği fiber glass yapısındaki konjugasyon pedi, kapiler akışın gerçekleştiği ve test çizgisi ilgili antikor ve *Salmonella* faj ile oluşturularak sonucun gözlemlendiği nitroselüloz membran kullanılmıştır. Son bölüm ise stripin son kısmı kapiler akış sonunda etkileşmeyen örneğin ve çözeltilerin emildiği absorpsiyon pedidir. İnşa edilen sistemde uygulanan numune örnek pedi aracılığıyla partikül konjuge edilmiş konjugasyon pedine gelmektedir. Konjugasyon pedinde yaklaşık 20 nm boyutunda sentezlemiş olduğumuz DTNB ile kovalent bağlı olan altın nanoküre partiküller bulunmaktadır. Numune (bakteri çözeltilisi) kurutulmuş konjugatı harekete geçirir ve bakteri ile etkileşime geçen bu partiküller stripin bir sonraki test bölgesine gelirler. Test bölgesi üzerinde antikor veya bakteriyofaj ile immobilize edilmiş test şeridi ve kontrol şeridi bulunmaktadır. Bu şeritlerin test kısmında ilgili analiti yakalamak için antikorlar ve fajlar, kontrol kısmında ise sistemin çalıştığını doğrulamak için anti-antikorlar immobilize edilmiştir. Sonuçlar partiküllerden gelen renk değişimi ile hem kolorimetrik hem de raman etiket içeren modifiye altın küreler ile SERS sinyali takibi ile yorumlanmıştır. Böylece faj tabanlı LFIA sistem oluşturmak için yukarıda anlatılan

kısımlar, ilk olarak antikor sonra kademeli olarak bakteriyofaj ile immobilize edilerek sistemin *S. enteritidis* ile uygulaması gerçekleştirilmiştir (şekil 5.1).



Şekil 5.1. Bakteriyofaja dayalı kağıt tabanlı sistemin bakteri SERS etkileşimi.

Bakteriyofajlar, keşfedildikleri günden beri yoğun olarak moleküler biyoloji araçları olarak kullanılmıştır [184]. Son on yılda, flüoresans ve lüminesans gibi çeşitli analitik sinyalleri kullanılarak doğrudan (faj protein füzyonları veya faj DNA boyama) [29, 30] veya dolaylı (antikor veya kuantum noktalarıyla etiketli fajlar) [28] tespitine dayanan çeşitli faj bazlı biyo-deneyler geliştirilmiştir. Çoğu teknik, özel bir algılama cihazının yanı sıra yüksek düzeyde bir tekniklik gerektirir. Kağıt tabanlı bakteri tayin yöntemine alternatif bir sistem olarak antikor yerine bakteriyofaj kullanılarak yeni bir sistem geliştirilmiştir.

Literatür çalışmalarında özellikle *Salmonella* faj ile yapılan çalışmalar incelendiğinde aşağıda belirttiğimiz verilere ulaştık, floresansı çıkış sinyali olarak kullanarak akış sitometrisini algılama cihazı olarak kullanarak deniz sularında bakteri tespiti yapılması için özellikle yeşil flüoresan proteinini (GFP) kodlayan işlenmiş fajlar ile enfekte olmuş bakterilerin tespiti için yöntem geliştirdiler. Teşhis limitinin (LOD) 1 saat analiz süresi boyunca 10 kob/mL olarak belirlendi [185]. *Salmoenlla* için yaban turpu peroksit (HRP) ile konjuge antikorlarla etiketli faj-manyetik partiküllerle ayrılmış olan bakterilerin kolorimetrik olarak tespitine dayanmaktadır. Fajlar karboksil grupla aktive edilen

manyetik partiküllere (300 nm ve 3 mikron boyutlarında farklı iki partikül kullanılmıştır.) kovalent bağlanmasıyla gerçekleştirildi. Bakteriler faj ile modifiye edilmiş manyetik partiküller tarafından yakalandı ve ardından optik raportör olarak HRP ile konjüge edilmiş spesifik anti-*Salmonella* antikorları kullanılarak tespit edildi. Süt örneklerinde yapılan çalışmada 6 saat ön zenginleştirme yapıldıktan sonra 25 mL sütte 1,4 kob tespit sınırı elde edilmiştir [186]. Çeşitli *Salmonella* türlerinin hızlı ve hassas bir şekilde tespiti için modifiye edilen bir bakteri buz çekirdeklenme tespiti (BIND®) tahlili kullanıldı. BIND tahlili için *Salmonella* hücreleri, bir buz çekirdeklenme proteinini (INP) kodlayan DNA'yı içerecek şekilde genetiği değiştirilmiş bakteriyofaj ile enfekte edilir. Enfeksiyondan sonra, de novo protein sentezi meydana gelir ve INP'ler organizmanın dış zarına dahil edilir. Süper soğutmadan sonra (-9.3°C), sadece transfekte edilmiş *Salmonella* içeren tampon çözeltileri donarak faza duyarlı bir boyanın renk değiştirmesine neden olur. Böylece uygulanan protokol sayesinde tampon içerisinde (yaklaşık 3 saat) minimum tespit edilebilir seviye 2 *enteritidis* hücre/mL kantitatif algılama sağlamıştır [187]. Mansel ve arkadaşları, *Salmonella* türlerine özgü rekombinant bakteriyofajlar içeren bakteri lüsiferaz genleri inşa ettiler. Faj, *Salmonella* ile karıştırıldığında konakçı hücrelerin ışıldamasına neden oldu ve ışıldama bir foton sayma şarjlı birleştirilmiş cihaz (CCD) kamera, bir luminometre veya X-ışını filmi kullanılarak tespit edildi. Sistem, yumurtalara rekombinant bakteriyofajların doğrudan eklenmesi ve ardından yumurta içindeki ışıldayan *Salmonella* hücrelerinin görselleştirilmesi yoluyla bütün yumurtalarda *Salmonella* hücrelerinin saptanmasına izin verdi. 6 saatlik ön inkübasyonla, orijinal numunede mL başına 10 kob *Salmonella* hücresi tespit edildi [188]. Pivido ve gurubu, patojenik bakterilerin biyolojik olarak tanınması için manyetik partiküller üzerinde immobilize edilmiş olan bakteriyofajların kullanımı ve ardından bakterilerin elektrokimyasal tespiti bildirilmiştir. Model olarak *Salmonella*'ya özgü P22 bakteriyofajı (A, B ve D serotipleri) kullanılmıştır. Bakteriler yakalanır ve yüksek özgüllük ve verime sahip konakçı etkileşimi yoluyla bakteriyofaj ile modifiye edilmiş manyetik partiküller tarafından önceden konsantre edilir. Yakalanan bakterilerin DNA amplifikasyonu daha sonra çift etiketleme polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile gerçekleştirilir. Çift etiketli ampikonun daha fazla tespiti, elektrokimyasal olarak elde edilir. Strateji, 4 saat içinde Luria-Bertani (LB) ortamındaki LOD 3 kob/mL *Salmonella* olarak tespit edilmiştir [189].

Faj tabanlı LFIA platform antikor ve bakteriyofaj kademeli olarak sistem üzerinde uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlarda faj ile inşa edilen kağıt tabanlı sistemin çalıştığını ve alternatif bir yöntem olduğunu göstermiştir.

İlk olarak sistemin çalıştığını göstermek için manyetik ayırım metodu uygulanmıştır. Manyetik partiküller kovalent olarak bakteriyofaj ile bağlanırken, AuNPs biyotinli *S. enteritidis* antikor ile yüzeyi kaplanmıştır. Raman etiket kullanılarak kantitatif olarak kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Bakteriyofaj bağlı manyetik nanopartiküller istenilen bakteri ile etkileştirildikten sonra mıknatıs yardımıyla yıkamaları fosfat tamponu ile yapılmıştır. Sonraki aşamada antikor ile modifiye edilmiş olan AuNPs manyetik partiküller tarafından yakalanmış olan bakterilere tampon ortamında eklenerek sandviç kompleks oluşturulmuştur. Mıknatıs yardımıyla yıkama işlemleri yapıldıktan sonra TLC yüzeyine sandviç yapı oluşturmuş olan 10^1 - 10^7 kob/mL bakteri konsantrasyonları eklenerek SERS pikleri elde edilmiştir. Kalibrasyon grafiğinden elde edilen sonuçlarda artan bakteri konsantrasyonuna karşılık SERS sinyallerinde artış olduğu gösterilmiştir. Böylece antikor yerine düşünülen bakteriyofajın partiküller ile etkileşiminin manyetik ayırım ile başarılı bir şekilde yapıldığı gösterilmiştir.

Bakteriyofaja dayalı sistem oluşturmak için altın yüzey, ELISA plaka, Au elektrot yüzeyler uygulanmıştır. Altın yüzey MUA ile tiyol grupların altın yüzeye bağlanması sayesinde karboksil grupların yüzeyde fonksiyonel hale getirilmesi sağlanmıştır. Bakteriyofaj EDC/NHS aktivasyon ile karboksil gruplara kovalent olarak bağlanmıştır. Bakteriyofaj ile modifiye edilmiş olan altın yüzeyler ilgili bakteri ile etkileştirilerek fosfat tampon ile yıkamaları yapılmıştır. Yüzeye tutunmuş olan hedef bakteriler antikor ile kaplı olan AuNPs ile üstten eklenerek sandviç kompleks oluşturulmuştur. Şekil 4.37’de verilen SERS kalibrasyon grafikte düşük bakteri konsantrasyonlarda SERS sinyallerinde çok fazla değişim gözlenmezken, bakterilerin 10^5 kob/mL ve üzerinde elde edilen SERS sinyalleri derişime bağlı olarak artış göstermiştir. R^2 değeri kalibrasyon grafiğinin eğiminden 0,98 olarak bulunmuştur. Altın elektrot yüzey üzerinde yapılan çalışmalarda 10^7 kob/mL derişiminde elde edilen SERS pik şiddetinin düşük olmasından dolayı kalibrasyon grafik çalışmaları yapılmamıştır. ELISA plaka çalışmasında yüzeyde bulunan polisitren bakteriyofajlarla fizksel etkileşim yaparak yüzeyde adsorbe olması sağlanmıştır. Üstten raman etiketli AuNPs eklenerek sandviç yapı oluşturulmuştur. Şekil 4.39’da gösterilen kalibrasyon çalışmalarda bakteri konsantrasyonuna karşı SERS sinyallerinde bir değişme olmamıştır. Bu yüzden kağıt tabanlı LFIA sistemlerde elde

edilen sonuçların daha iyi olmasından dolayı tüm optimizasyon çalışmaları kağıt platform üzerinde yapılmıştır.

10^1 - 10^7 kob/mL arasındaki bakteri derişimlerinde elde edilen kalibrasyon grafiklerinde test çizgisi antikor ve konjugasyon ped içindeki AuNPs antikor ve *Salmonella* faj ile modifiye edilmesinden elde edilen R^2 değerleri sırasıyla 0.944, 0,984 olarak tespit edilmiştir. Kağıt tabanlı sistem tamamen bakteriyofaja dayalı olarak optimize edilerek hedef analite karşı uygulandığında 10^1 - 10^7 kob/mL bakteri miktarlarında R^2 değeri 0,980 ve LOD tespit sınır değeri 7 kob/mL olarak hesaplanmıştır. Bu sonuçlar faj tabanlı LFIA sistemin bakteri tespitinde antikor yerine bakteriyofajın kullanılmasının ideal bir yöntem olduğunu göstermiştir. Ayrıca hedef bakterinin konjugasyon pedindeki faj ile kovalent bağlı olan AuNPs ile etkileşerek nitroselüloz membran üzerinde hareket ederek test çizgisi üzerinde belirgin çizgilerin oluşması göz önüne alındığında analiz süresinin 30 dk gibi kısa süre içinde tamamlanması sistemin en büyük artlarından biri olarak çizelge 5.1’de görülmektedir.

Validasyon denemelerinde farklı bakteri türleri ile yapılan çalışmalarda sistemin sadece ilgili bakteriye spesifik olduğu gösterilmiştir. Şekil 4.42’deki grafikte test çizgisi antikorla immobilize edilmiş ve konjugasyon kısmında bakteriyofaj modifikasyon ile AuNP’lere bağlı olan kağıt tabanlı platformun seçicilik sonuçlarına bakıldığında *S. enteritidis* %100 bağlı SERS şiddetine sahipken, diğer bakteriler %40 ve altında bağlı SERS şiddetleri göstermişlerdir. Şekil 4.43’de tamamen bakteriyofaj temelli oluşturulan sistemin seçicilik deney sonuçlarına bakıldığında farklı bakteri türleri %30 ve altında bağlı SERS şiddetleri göstermişlerdir. Ayrıca faj tabanlı sistem antikor ile yapılan sistemin seçicilik deneylerinden farklı olarak *S. typhimurium* kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlarda *S. typhimurium* bağlı SERS şiddeti ilgili bakteri ile karşılaştırıldığında %20’ye yakın bir değer elde edilmiştir. Tüm yapılan seçicilik denemelerinin sonuçlarına bakıldığında bakteriyofaj tabanlı LFIA sistem ile yapılan bakteri tespitinde tamamen *S. enteritidis*’e spesifik ve ilgili olduğu gösterilmiştir.

Gerçek örnek denemelerinde yumurta ve tavuk eti kullanılarak sistemin doğruluğu ve hassasiyeti test edilmiştir. Gerçek örnek denemelerinde tavuk etine ve yumurtaya *S. enteritidis* 10^1 - 10^5 kob/mL miktarları enfekte edilerek SERS kalibrasyon çalışmaları yapılmıştır. Yapılan çalışmada tavuk eti ve yumurta SERS kalibrasyon grafiklerinden sırasıyla R^2 değerleri 0,981 ve 0,978 olarak elde edilmiştir. Ayrıca SERS kalibrasyon grafiğinin eğiminden elde edilen bakteri miktarı hesaplanarak yüzde ne kadar bakteriyi

yakalayıp tuttuğumuzu 10^2 - 10^5 kob/mL miktarları arasındaki tavuk eti ve yumurta için sırasıyla %109, %93, %104, %102 ve %97, %116, %94, %98 olarak hesaplanmıştır.

Geliştirmiş olduğumuz faj bazlı kağıt tabanlı LFIA sistem antikor kullanımına alternatif olarak *Salmonella* faj inşasına dayalıdır. Antikorlar yerine tercih edilmesinde en büyük etkenler, fajlar çok fazla miktarlarda kolayca ve ucuz bir şekilde üretilebilir. Sadece bakteriyel bir çözeltiyi enfekte ederek kişi çok sayıda soy fajı elde edebilir.

Çizelge 5.1. *Salmonella* faj literatür çalışmaları

Bakteri	Faj	Tespit tekniği	Tespit limiti	Analiz süresi	Referans
<i>E. coli</i> <i>Salmonella</i>	Phage HK620 Phage P22	Akış sitometrisi	10 kob/mL	1h	[185]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Kolorimetrik	1 kob/24ml	6 h	[186]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Kolorimetrik	2 kob/mL	3 h	[187]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Biyoluminesans	10 kob/ml	6 h	[188]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Optik	10 kob/ml	2 h	[190]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Polimeraz zincir reaksiyonu (PCR).	3 kob/ml	4 h	[189]
<i>Salmonella</i>	Phage P22	Kağıt tabanlı LFIA sistem	7 kob/ml	30 dk	Bizim çalışma

6. KAYNAKLAR

- [1] A.H. Havelaar, M.D. Kirk, P.R. Torgerson, H.J. Gibb, T. Hald, R.J. Lake, N. Praet, D.C. Bellinger, N.R. De Silva, N. Gargouri, World Health Organization global estimates and regional comparisons of the burden of foodborne disease in 2010, *PLoS medicine*, 12 (2015) e1001923.
- [2] T. McLinden, J.M. Sargeant, M.K. Thomas, A. Papadopoulos, A. Fazil, Component costs of foodborne illness: a scoping review, *BMC Public Health*, 14 (2014) 509.
- [3] X. Wu, C. Han, J. Chen, Y.-W. Huang, Y. Zhao, Rapid detection of pathogenic bacteria from fresh produce by filtration and surface-enhanced Raman spectroscopy, *JOM*, 68 (2016) 1156-1162.
- [4] N.D. Israelsen, D. Wooley, C. Hanson, E. Vargis, Rational design of Raman-labeled nanoparticles for a dual-modality, light scattering immunoassay on a polystyrene substrate, *Journal of biological engineering*, 10 (2016) 2.
- [5] R.D. Hoelzle, B. Viridis, D.J. Batstone, Regulation mechanisms in mixed and pure culture microbial fermentation, *Biotechnology and bioengineering*, 111 (2014) 2139-2154.
- [6] R.M. Jarvis, R. Goodacre, Characterisation and identification of bacteria using SERS, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 931-936.
- [7] H.-W. Cheng, Y.-Y. Chen, X.-X. Lin, S.-Y. Huan, H.-L. Wu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Surface-enhanced Raman spectroscopic detection of *Bacillus subtilis* spores using gold nanoparticle based substrates, *Analytica chimica acta*, 707 (2011) 155-163.
- [8] R.A. Tripp, R.A. Dluhy, Y. Zhao, Novel nanostructures for SERS biosensing, *Nano Today*, 3 (2008) 31-37.
- [9] A. Huang, Z. Qiu, M. Jin, Z. Shen, Z. Chen, X. Wang, J.-W. Li, High-throughput detection of food-borne pathogenic bacteria using oligonucleotide microarray with quantum dots as fluorescent labels, *International journal of food microbiology*, 185 (2014) 27-32.
- [10] F. Gao, J. Lei, H. Ju, Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy for sensitive DNA detection by DNA-mediated silver nanoparticle growth, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 11788-11793.
- [11] X. Jiang, M. Yang, Y. Meng, W. Jiang, J. Zhan, Cysteamine-modified silver nanoparticle aggregates for quantitative SERS sensing of pentachlorophenol with a portable Raman spectrometer, *ACS applied materials & interfaces*, 5 (2013) 6902-6908.
- [12] M. Shi, J. Zheng, Y. Tan, G. Tan, J. Li, Y. Li, X. Li, Z. Zhou, R. Yang, Ultrasensitive detection of single nucleotide polymorphism in human mitochondrial DNA utilizing ion-mediated cascade surface-enhanced Raman spectroscopy amplification, *Analytical chemistry*, 87 (2015) 2734-2740.

- [13] F. Yan, T. Vo-Dinh, Surface-enhanced Raman scattering detection of chemical and biological agents using a portable Raman integrated tunable sensor, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 121 (2007) 61-66.
- [14] D. Kurouski, R.P. Van Duyne, In situ detection and identification of hair dyes using surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), *Analytical chemistry*, 87 (2015) 2901-2906.
- [15] Y. Wang, G. Wen, L. Ye, A. Liang, Z. Jiang, Label-free SERS study of galvanic replacement reaction on silver nanorod surface and its application to detect trace mercury ion, *Scientific reports*, 6 (2016) 19650.
- [16] D. Yang, H. Zhou, Y. Ying, R. Niessner, C. Haisch, Surface-enhanced Raman scattering for quantitative detection of ethyl carbamate in alcoholic beverages, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405 (2013) 9419-9425.
- [17] J.D. Driskell, K.M. Kwarta, R.J. Lipert, M.D. Porter, J.D. Neill, J.F. Ridpath, Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay, *Analytical chemistry*, 77 (2005) 6147-6154.
- [18] F. Gao, L. Du, D. Tang, Y. Lu, Y. Zhang, L. Zhang, A cascade signal amplification strategy for surface enhanced Raman spectroscopy detection of thrombin based on DNAzyme assistant DNA recycling and rolling circle amplification, *Biosensors and Bioelectronics*, 66 (2015) 423-430.
- [19] T. Gong, N. Zhang, K.V. Kong, D. Goh, C. Ying, J.L. Auguste, P.P. Shum, L. Wei, G. Humbert, K.T. Yong, Rapid SERS monitoring of lipid-peroxidation-derived protein modifications in cells using photonic crystal fiber sensor, *Journal of biophotonics*, 9 (2016) 32-37.
- [20] Z. Liu, B. Ye, M. Jin, H. Chen, H. Zhong, X. Wang, Z. Guo, Dye-free near-infrared surface-enhanced Raman scattering nanoprobe for bioimaging and high-performance photothermal cancer therapy, *Nanoscale*, 7 (2015) 6754-6761.
- [21] K.R. Wigginton, P.J. Vikesland, Gold-coated polycarbonate membrane filter for pathogen concentration and SERS-based detection, *Analyst*, 135 (2010) 1320-1326.
- [22] L.-J. Xu, Z.-C. Lei, J. Li, C. Zong, C.J. Yang, B. Ren, Label-free surface-enhanced Raman spectroscopy detection of DNA with single-base sensitivity, *Journal of the American Chemical Society*, 137 (2015) 5149-5154.
- [23] X. Liu, M. Knauer, N.P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch, Synthesis of core-shell surface-enhanced Raman tags for bioimaging, *Analytical chemistry*, 82 (2009) 441-446.
- [24] A. Singh, D. Arutyunov, C.M. Szymanski, S. Evoy, Bacteriophage based probes for pathogen detection, *Analyst*, 137 (2012) 3405-3421.
- [25] J.R. Brigati, V.A. Petrenko, Thermostability of landscape phage probes, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 382 (2005) 1346-1350.

- [26] L. Olofsson, J. Ankarloo, I.A. Nicholls, Phage viability in organic media: insights into phage stability, *Journal of Molecular Recognition: An Interdisciplinary Journal*, 11 (1998) 91-93.
- [27] L. Olofsson, J. Ankarloo, P.O. Andersson, I.A. Nicholls, Filamentous bacteriophage stability in non-aqueous media, *Chemistry & Biology*, 8 (2001) 661-671.
- [28] A. Shabani, C.A. Marquette, R. Mandeville, M.F. Lawrence, Carbon microarrays for the direct impedimetric detection of *Bacillus anthracis* using Gamma phages as probes, *Analyst*, 138 (2013) 1434-1440.
- [29] D.A. Schofield, I.J. Molineux, C. Westwater, Diagnostic bioluminescent phage for detection of *Yersinia pestis*, *Journal of clinical microbiology*, 47 (2009) 3887-3894.
- [30] T. Neufeld, A. Schwartz-Mittelmann, D. Biran, E. Ron, J. Rishpon, Combined phage typing and amperometric detection of released enzymatic activity for the specific identification and quantification of bacteria, *Analytical chemistry*, 75 (2003) 580-585.
- [31] J.R. Clark, J.B. March, Bacteriophages and biotechnology: vaccines, gene therapy and antibacterials, *Trends in biotechnology*, 24 (2006) 212-218.
- [32] M.K. Cowan, J. Bunn, *Microbiology Fundamentals: A Clinical Approach*, McGraw-Hill Education, 2015.
- [33] G. Wang, B. Mishra, R.F. Eppard, R.M. Eppard, High-quality 3D structures shine light on antibacterial, anti-biofilm and antiviral activities of human cathelicidin LL-37 and its fragments, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1838 (2014) 2160-2172.
- [34] J.W. Bartholomew, T. Mittwer, The gram stain, *Bacteriological reviews*, 16 (1952) 1.
- [35] K. Vijayaraghavan, a Yeoung-Sang YUN, Bacterial biosorbents and biosorption. *Biotechnology Advances*, (2008) 266-291.
- [36] T.J. Beveridge, Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles, *Journal of bacteriology*, 181 (1999) 4725-4733.
- [37] D. Hughes, The bacterial cytoplasmic membrane, *Microbiology*, 29 (1962) 39-46.
- [38] K. Talaro, A. Talaro, *Foundations in microbiology 2nd edition* Mc, Graw Hill Publishers USA, 1996.
- [39] D.P. Breakwell, R.B. Moyes, J. Reynolds, Differential staining of bacteria: capsule stain, *Current protocols in microbiology*, 15 (2009) A. 3I. 1-A. 3I. 4.
- [40] M.A. Schembri, D. Dalsgaard, P. Klemm, Capsule shields the function of short bacterial adhesins, *Journal of bacteriology*, 186 (2004) 1249-1257.
- [41] W.C. Summers, *Felix dHerelle and the Origins of Molecular Biology*, Yale University Press 1999.

- [42] S.T. Abedon, C. Thomas-Abedon, Phage therapy pharmacology, *Current pharmaceutical biotechnology*, 11 (2010) 28-47.
- [43] S.T. Abedon, 17 Phage-therapy Best Practices, *Bacteriophages in Health and Disease*, 24 (2012) 256.
- [44] G.W. Hanlon, Bacteriophages: an appraisal of their role in the treatment of bacterial infections, *International journal of antimicrobial agents*, 30 (2007) 118-128.
- [45] W.C. Summers, Bacteriophage therapy, *Annual Reviews in Microbiology*, 55 (2001) 437-451.
- [46] A.M. Kropinski, Phage therapy--everything old is new again, *Canadian Journal of Infectious Diseases and Medical Microbiology*, 17 (2006) 297-306.
- [47] M. Henry, L. Debarbieux, Tools from viruses: bacteriophage successes and beyond, *Virology*, 434 (2012) 151-161.
- [48] A. Campbell, The future of bacteriophage biology, *Nature Reviews Genetics*, 4 (2003) 471.
- [49] L.D. Goodridge, Designing phage therapeutics, *Current pharmaceutical biotechnology*, 11 (2010) 15-27.
- [50] R.J. Citorik, M. Mimee, T.K. Lu, Bacteriophage-based synthetic biology for the study of infectious diseases, *Current opinion in microbiology*, 19 (2014) 59-69.
- [51] M. Hankin, The bactericidal action of the waters of the Jamuna and Ganges rivers on Cholera microbes, *Ann Inst Pasteur*, 10 (1896) 511-523.
- [52] G. Samsygina, E. Boni, Bacteriophages and phage therapy in pediatric practice, *Pediatrriia*, (1984) 67.
- [53] T. Van Helvoort, Bacteriological and physiological research styles in the early controversy on the nature of the bacteriophage phenomenon, *Medical History*, 36 (1992) 243-270.
- [54] F.W. Twort, An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses, *The Lancet*, 186 (1915) 1241-1243.
- [55] F. Twort, Researches on dysentery, *British journal of experimental pathology*, 1 (1920) 237.
- [56] J. Bordet, M. Ciuca, Remarques sur l'historique des recherches concernant la lyse microbienne transmissible, *Compt. Rend. Soc. Biol*, 84 (1921) 745-747.
- [57] A. Cuervo, J.L. Carrascosa, *Bacteriophages: Structure, e LS*, (2001).
- [58] H.-W. Ackermann, 5500 Phages examined in the electron microscope, *Archives of virology*, 152 (2007) 227-243.
- [59] G.J. Baran, V.A. Bloomfield, Tail-fiber attachment in bacteriophage T4D studied by quasielastic light scattering--band electrophoresis, *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*, 17 (1978) 2015-2028.

- [60] D.R. Harper, B.H. Burrowes, E.M. Kutter, *Bacteriophage: therapeutic uses*, eLS, (2001).
- [61] E. Anderson, R. Williams, Bacteriophage typing of enteric pathogens and staphylococci and its use in epidemiology: a review, *Journal of Clinical Pathology*, 9 (1956) 94.
- [62] S. Kuhl, P. Hyman, S. Abedon, *Diseases caused by phages*, CABI Press, UK2012.
- [63] J.E. Samson, A.H. Magadán, M. Sabri, S. Moineau, Revenge of the phages: defeating bacterial defences, *Nature Reviews Microbiology*, 11 (2013) 675.
- [64] S.J. Labrie, J.E. Samson, S. Moineau, Bacteriophage resistance mechanisms, *Nature Reviews Microbiology*, 8 (2010) 317.
- [65] F. Jiang, J.A. Doudna, The structural biology of CRISPR-Cas systems, *Current opinion in structural biology*, 30 (2015) 100-111.
- [66] N. Olszowska-Zaremba, J. Borysowski, K. Dabrowska, A. Górski, 12 Phage Translocation, Safety and Immunomodulation, *Bacteriophages in health and disease*, 24 (2012) 168.
- [67] R. Young, Phage lysis: three steps, three choices, one outcome, *Journal of microbiology*, 52 (2014) 243-258.
- [68] A.V. Mardanov, N.V. Ravin, The antirepressor needed for induction of linear plasmid-prophage N15 belongs to the SOS regulon, *Journal of bacteriology*, 189 (2007) 6333-6338.
- [69] J.W. Roberts, R. Devoret, Lysogenic induction, *Cold Spring Harbor Monograph Archive*, 13 (1983) 123-144.
- [70] J. Chen, S.D. Alcaine, Z. Jiang, V.M. Rotello, S.R. Nugen, Detection of *Escherichia coli* in drinking water using T7 bacteriophage-conjugated magnetic probe, *Analytical chemistry*, 87 (2015) 8977-8984.
- [71] J. Chen, A.A. Jackson, V.M. Rotello, S.R. Nugen, Colorimetric Detection of *Escherichia coli* Based on the Enzyme-Induced Metallization of Gold Nanorods, *Small*, 12 (2016) 2469-2475.
- [72] D. Wang, J. Chen, S.R. Nugen, Electrochemical detection of *Escherichia Coli* from aqueous samples using engineered phages, *Analytical chemistry*, 89 (2017) 1650-1657.
- [73] N. Franche, M. Vinay, M. Ansaldi, Substrate-independent luminescent phage-based biosensor to specifically detect enteric bacteria such as *E. coli*, *Environmental Science and Pollution Research*, 24 (2017) 42-51.
- [74] Y. Born, L. Fieseler, V. Thöny, N. Leimer, B. Duffy, M.J. Loessner, Engineering of bacteriophages Y2:: *dpoL1-C* and Y2:: *luxAB* for efficient control and rapid detection of the fire blight pathogen, *Erwinia amylovora*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 83 (2017) e00341-00317.

- [75] S. Alcaine, L. Tilton, M. Serrano, M. Wang, R. Vachet, S. Nugen, Phage-protease-peptide: a novel tripecta enabling multiplex detection of viable bacterial pathogens, *Applied microbiology and biotechnology*, 99 (2015) 8177-8185.
- [76] S. Alcaine, D. Pacitto, D. Sela, S. Nugen, Phage & phosphatase: a novel phage-based probe for rapid, multi-platform detection of bacteria, *Analyst*, 140 (2015) 7629-7636.
- [77] A. Mortari, A. Adami, L. Lorenzelli, An unconventional approach to impedance microbiology: detection of culture media conductivity variations due to bacteriophage generated lyses of host bacteria, *Biosensors and Bioelectronics*, 67 (2015) 615-620.
- [78] H. Anany, L. Brovko, N.K. El Dougdoug, J. Sohar, H. Fenn, N. Alasiri, T. Jabrane, P. Mangin, M.M. Ali, B. Kannan, Print to detect: a rapid and ultrasensitive phage-based dipstick assay for foodborne pathogens, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 410 (2018) 1217-1230.
- [79] K. Sergueev, A. Filippov, M. Nikolich, Highly sensitive bacteriophage-based detection of *Brucella abortus* in mixed culture and spiked blood, *Viruses*, 9 (2017) 144.
- [80] J.C. Rees, C.L. Pierce, D.M. Schieltz, J.R. Barr, Simultaneous identification and susceptibility determination to multiple antibiotics of *Staphylococcus aureus* by bacteriophage amplification detection combined with mass spectrometry, *Analytical chemistry*, 87 (2015) 6769-6777.
- [81] J.C. Rees, J.R. Barr, Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using phage amplification combined with matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409 (2017) 1379-1386.
- [82] A. Martelet, G. L'Hostis, M.-C. Nevers, H. Volland, C. Junot, F.o. Becher, B.H. Muller, Phage amplification and immunomagnetic separation combined with targeted mass spectrometry for sensitive detection of viable bacteria in complex food matrices, *Analytical chemistry*, 87 (2015) 5553-5560.
- [83] B.R. Jackson, P.M. Griffin, D. Cole, K.A. Walsh, S.J. Chai, Outbreak-associated *Salmonella enterica* serotypes and food commodities, United States, 1998–2008, *Emerging infectious diseases*, 19 (2013) 1239.
- [84] K. Petsong, K. Vongkamjan, Applications of *Salmonella* bacteriophages in the food production chain, *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*, 1 (2015) 275-283.
- [85] J. Colom, M. Cano-Sarabia, J. Otero, P. Cortés, D. MasPOCH, M. Llagostera, Liposome-encapsulated bacteriophages for enhanced oral phage therapy against *Salmonella* spp, *Appl. Environ. Microbiol.*, 81 (2015) 4841-4849.
- [86] J. Colom, M. Cano-Sarabia, J. Otero, J. Aríñez-Soriano, P. Cortés, D. MasPOCH, M. Llagostera, Microencapsulation with alginate/CaCO₃: A strategy for improved phage therapy, *Scientific reports*, 7 (2017) 41441.

- [87] M. Fleischmann, P.J. Hendra, A.J. McQuillan, Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode, *Chemical Physics Letters*, 26 (1974) 163-166.
- [88] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, Surface Raman spectroelectrochemistry: Part I. Heterocyclic, aromatic, and aliphatic amines adsorbed on the anodized silver electrode, *Journal of electroanalytical chemistry and interfacial electrochemistry*, 84 (1977) 1-20.
- [89] D. Yang, Y. Ying, Applications of Raman spectroscopy in agricultural products and food analysis: A review, *Applied Spectroscopy Reviews*, 46 (2011) 539-560.
- [90] P. Kambhampati, M.C. Foster, A. Campion, Two-dimensional localization of adsorbate/substrate charge-transfer excited states of molecules adsorbed on metal surfaces, *The Journal of chemical physics*, 110 (1999) 551-558.
- [91] G.C. Schatz, M.A. Young, R.P. Van Duyne, Electromagnetic mechanism of SERS, *Surface-enhanced Raman scattering*, Springer2006, pp. 19-45.
- [92] X.-M. Qian, S.M. Nie, Single-molecule and single-nanoparticle SERS: from fundamental mechanisms to biomedical applications, *Chemical Society Reviews*, 37 (2008) 912-920.
- [93] W.E. Doering, S. Nie, Single-molecule and single-nanoparticle SERS: examining the roles of surface active sites and chemical enhancement, *The Journal of Physical Chemistry B*, 106 (2002) 311-317.
- [94] K.C. Bantz, A.F. Meyer, N.J. Wittenberg, H. Im, Ö. Kurtuluş, S.H. Lee, N.C. Lindquist, S.-H. Oh, C.L. Haynes, Recent progress in SERS biosensing, *Physical Chemistry Chemical Physics*, 13 (2011) 11551-11567.
- [95] G. Kovacs, R. Loutfy, P. Vincett, C. Jennings, R. Aroca, Distance dependence of SERS enhancement factor from Langmuir-Blodgett monolayers on metal island films: evidence for the electromagnetic mechanism, *Langmuir*, 2 (1986) 689-694.
- [96] A.J. Haes, C.L. Haynes, A.D. McFarland, G.C. Schatz, R.P. Van Duyne, S. Zou, Plasmonic materials for surface-enhanced sensing and spectroscopy, *MRS bulletin*, 30 (2005) 368-375.
- [97] R. Peng, Y. Si, T. Deng, J. Zheng, J. Li, R. Yang, W. Tan, A novel SERS nanoprobe for the ratiometric imaging of hydrogen peroxide in living cells, *Chemical Communications*, 52 (2016) 8553-8556.
- [98] L. Fabris, SERS tags: the next promising tool for personalized cancer detection?, *ChemNanoMat*, 2 (2016) 249-258.
- [99] A. Samanta, K.K. Maiti, K.S. Soh, X. Liao, M. Vendrell, U. Dinish, S.W. Yun, R. Bhuvaneshwari, H. Kim, S. Rautela, Ultrasensitive near-infrared Raman reporters for SERS-based in vivo cancer detection, *Angewandte Chemie International Edition*, 50 (2011) 6089-6092.
- [100] Y. Wang, S. Schlücker, Rational design and synthesis of SERS labels, *Analyst*, 138 (2013) 2224-2238.

- [101] Y. Wang, B. Yan, L. Chen, SERS tags: novel optical nanoprobe for bioanalysis, *Chemical reviews*, 113 (2012) 1391-1428.
- [102] Y.C. Cao, R. Jin, C.A. Mirkin, Nanoparticles with Raman spectroscopic fingerprints for DNA and RNA detection, *Science*, 297 (2002) 1536-1540.
- [103] Q. Zhang, X. Lu, P. Tang, D. Zhang, J. Tian, L. Zhong, Gold nanoparticle (AuNP)-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) probe of leukemic lymphocytes, *Plasmonics*, 11 (2016) 1361-1368.
- [104] D. Zhu, Z. Wang, S. Zong, H. Chen, P. Chen, M. Li, L. Wu, Y. Cui, Gold nanoparticles decorated liposomes and their SERS performance in tumor cells, *Third International Symposium on Laser Interaction with Matter*, International Society for Optics and Photonics, 2015, pp. 954316.
- [105] M. Li, J. Zhang, S. Suri, L.J. Sooter, D. Ma, N. Wu, Detection of adenosine triphosphate with an aptamer biosensor based on surface-enhanced Raman scattering, *Analytical chemistry*, 84 (2012) 2837-2842.
- [106] K. Kneipp, H. Kneipp, I. Itzkan, R.R. Dasari, M.S. Feld, Ultrasensitive chemical analysis by Raman spectroscopy, *Chemical reviews*, 99 (1999) 2957-2976.
- [107] K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp, Surface-enhanced Raman scattering in local optical fields of silver and gold nanoaggregates from single-molecule Raman spectroscopy to ultrasensitive probing in live cells, *Accounts of chemical research*, 39 (2006) 443-450.
- [108] U. Dinish, G. Balasundaram, Y.-T. Chang, M. Olivo, Actively targeted in vivo multiplex detection of intrinsic cancer biomarkers using biocompatible SERS nanotags, *Scientific reports*, 4 (2014) 4075.
- [109] P.J. Huang, L.K. Chau, T.S. Yang, L.L. Tay, T.T. Lin, Nanoaggregate-Embedded Beads as Novel Raman Labels for Biodetection, *Advanced Functional Materials*, 19 (2009) 242-248.
- [110] D.S. Grubisha, R.J. Lipert, H.-Y. Park, J. Driskell, M.D. Porter, Femtomolar detection of prostate-specific antigen: an immunoassay based on surface-enhanced Raman scattering and immunogold labels, *Analytical chemistry*, 75 (2003) 5936-5943.
- [111] Y. Lin, A.T. Hamme II, Targeted highly sensitive detection/eradication of multi-drug resistant *Salmonella* DT104 through gold nanoparticle-SWCNT bioconjugated nanohybrids, *Analyst*, 139 (2014) 3702-3705.
- [112] S. Uluok, B. Guven, H. Eksi, Z. Ustundag, U. Tamer, I.H. Boyaci, Designing multilayered nanoplatfoms for SERS-based detection of genetically modified organisms, *Journal of Nanoparticle Research*, 17 (2015) 43.
- [113] N. Xiao, C. Wang, C. Yu, A self-referencing detection of microorganisms using surface enhanced Raman scattering nanoprobe in a test-in-a-tube platform, *Biosensors*, 3 (2013) 312-326.

- [114] S.A. Khan, A.K. Singh, D. Senapati, Z. Fan, P.C. Ray, Targeted highly sensitive detection of multi-drug resistant Salmonella DT104 using gold nanoparticles, *Chemical Communications*, 47 (2011) 9444-9446.
- [115] P. Drake, P.-S. Jiang, H.-W. Chang, S.-C. Su, J. Tanha, L.-L. Tay, P. Chen, Y.-J. Lin, Raman based detection of Staphylococcus aureus utilizing single domain antibody coated nanoparticle labels and magnetic trapping, *Analytical Methods*, 5 (2013) 4152-4158.
- [116] H.Y. Lin, C.H. Huang, W.H. Hsieh, L.H. Liu, Y.C. Lin, C.C. Chu, S.T. Wang, I.T. Kuo, L.K. Chau, C.Y. Yang, On-line SERS detection of single bacterium using novel SERS nanoprobe and a microfluidic dielectrophoresis device, *Small*, 10 (2014) 4700-4710.
- [117] L.-L. Tay, P.-J. Huang, J. Tanha, S. Ryan, X. Wu, J. Hulse, L.-K. Chau, Silica encapsulated SERS nanoprobe conjugated to the bacteriophage tailspike protein for targeted detection of Salmonella, *Chemical Communications*, 48 (2012) 1024-1026.
- [118] P.J. Huang, L.L. Tay, J. Tanha, S. Ryan, L.K. Chau, Single-domain antibody-conjugated nanoaggregate-embedded beads for targeted detection of pathogenic bacteria, *Chemistry—A European Journal*, 15 (2009) 9330-9334.
- [119] N. Duan, B. Chang, H. Zhang, Z. Wang, S. Wu, Salmonella typhimurium detection using a surface-enhanced Raman scattering-based aptasensor, *International journal of food microbiology*, 218 (2016) 38-43.
- [120] A. Ahmadi, H. Shirazi, N. Pourbagher, A. Akbarzadeh, K. Omidfar, An electrochemical immunosensor for digoxin using core-shell gold coated magnetic nanoparticles as labels, *Molecular biology reports*, 41 (2014) 1659-1668.
- [121] S.P. Ravindranath, Y. Wang, J. Irudayaraj, SERS driven cross-platform based multiplex pathogen detection, *Sensors and actuators B: Chemical*, 152 (2011) 183-190.
- [122] Y. Wang, H. Wei, B. Li, W. Ren, S. Guo, S. Dong, E. Wang, SERS opens a new way in aptasensor for protein recognition with high sensitivity and selectivity, *Chemical Communications*, (2007) 5220-5222.
- [123] J. Yang, M. Palla, F.G. Bosco, T. Rindzevicius, T.S. Alstrøm, M.S. Schmidt, A. Boisen, J. Ju, Q. Lin, Surface-enhanced Raman spectroscopy based quantitative bioassay on aptamer-functionalized nanopillars using large-area Raman mapping, *ACS nano*, 7 (2013) 5350-5359.
- [124] K. El-Boubbou, C. Gruden, X. Huang, Magnetic glyco-nanoparticles: a unique tool for rapid pathogen detection, decontamination, and strain differentiation, *Journal of the American Chemical Society*, 129 (2007) 13392-13393.
- [125] C. Song, L. Min, N. Zhou, Y. Yang, S. Su, W. Huang, L. Wang, Synthesis of novel gold mesoflowers as SERS tags for immunoassay with improved sensitivity, *ACS applied materials & interfaces*, 6 (2014) 21842-21850.

- [126] U. Tamer, I.H. Boyacı, E. Temur, A. Zengin, I. Dincer, Y. Elerman, Fabrication of magnetic gold nanorod particles for immunomagnetic separation and SERS application, *Journal of Nanoparticle Research*, 13 (2011) 3167-3176.
- [127] L. Zhang, J. Xu, L. Mi, H. Gong, S. Jiang, Q. Yu, Multifunctional magnetic–plasmonic nanoparticles for fast concentration and sensitive detection of bacteria using SERS, *Biosensors and Bioelectronics*, 31 (2012) 130-136.
- [128] J. Wang, X. Wu, C. Wang, Z. Rong, H. Ding, H. Li, S. Li, N. Shao, P. Dong, R. Xiao, Facile synthesis of Au-coated magnetic nanoparticles and their application in bacteria detection via a SERS method, *ACS applied materials & interfaces*, 8 (2016) 19958-19967.
- [129] J. Wang, X. Wu, C. Wang, N. Shao, P. Dong, R. Xiao, S. Wang, Magnetically assisted surface-enhanced Raman spectroscopy for the detection of *Staphylococcus aureus* based on aptamer recognition, *ACS applied materials & interfaces*, 7 (2015) 20919-20929.
- [130] Y. Wang, S. Ravindranath, J. Irudayaraj, Separation and detection of multiple pathogens in a food matrix by magnetic SERS nanoprobe, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399 (2011) 1271-1278.
- [131] R. Prucek, V. Ranc, L. Kvítek, A. Panáček, R. Zbořil, M. Kolář, Reproducible discrimination between Gram-positive and Gram-negative bacteria using surface enhanced Raman spectroscopy with infrared excitation, *Analyst*, 137 (2012) 2866-2870.
- [132] H.-W. Cheng, S.-Y. Huan, H.-L. Wu, G.-L. Shen, R.-Q. Yu, Surface-enhanced Raman spectroscopic detection of a bacteria biomarker using gold nanoparticle immobilized substrates, *Analytical chemistry*, 81 (2009) 9902-9912.
- [133] H.-W. Cheng, S.-Y. Huan, R.-Q. Yu, Nanoparticle-based substrates for surface-enhanced Raman scattering detection of bacterial spores, *Analyst*, 137 (2012) 3601-3608.
- [134] X. Zhang, N.C. Shah, R.P. Van Duyne, Sensitive and selective chem/bio sensing based on surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS), *Vibrational Spectroscopy*, 42 (2006) 2-8.
- [135] X. Zhang, M.A. Young, O. Lyandres, R.P. Van Duyne, Rapid detection of an anthrax biomarker by surface-enhanced Raman spectroscopy, *Journal of the American Chemical Society*, 127 (2005) 4484-4489.
- [136] D.P. Cowcher, Y. Xu, R. Goodacre, Portable, quantitative detection of *Bacillus* bacterial spores using surface-enhanced Raman scattering, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 3297-3302.
- [137] S. Farquharson, C. Shende, W. Smith, H. Huang, F. Inscore, A. Sengupta, J. Sperry, T. Sickler, A. Prugh, J. Guicheteau, Selective detection of 1000 *B. anthracis* spores within 15 minutes using a peptide functionalized SERS assay, *Analyst*, 139 (2014) 6366-6370.

- [138] C. Fan, Z. Hu, A. Mustapha, M. Lin, Rapid detection of food-and waterborne bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy coupled with silver nanosubstrates, *Applied microbiology and biotechnology*, 92 (2011) 1053-1061.
- [139] M. Kahraman, K. Keseroğlu, M. Çulha, On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra, *Applied spectroscopy*, 65 (2011) 500-506.
- [140] S. Efrima, L. Zeiri, Understanding SERS of bacteria, *Journal of Raman Spectroscopy: An International Journal for Original Work in all Aspects of Raman Spectroscopy, Including Higher Order Processes, and also Brillouin and Rayleigh Scattering*, 40 (2009) 277-288.
- [141] P. Kubryk, R. Niessner, N.P. Ivleva, The origin of the band at around 730 cm^{-1} in the SERS spectra of bacteria: a stable isotope approach, *Analyst*, 141 (2016) 2874-2878.
- [142] H. Chu, Y. Huang, Y. Zhao, Silver nanorod arrays as a surface-enhanced Raman scattering substrate for foodborne pathogenic bacteria detection, *Applied spectroscopy*, 62 (2008) 922-931.
- [143] H. Zhou, D. Yang, N.P. Ivleva, N.E. Mircescu, S.r. Schubert, R. Niessner, A. Wieser, C. Haisch, Label-free in situ discrimination of live and dead bacteria by surface-enhanced Raman scattering, *Analytical chemistry*, 87 (2015) 6553-6561.
- [144] J. Sundaram, B. Park, Y. Kwon, K.C. Lawrence, Surface enhanced Raman scattering (SERS) with biopolymer encapsulated silver nanosubstrates for rapid detection of foodborne pathogens, *International journal of food microbiology*, 167 (2013) 67-73.
- [145] P. Wang, S. Pang, J. Chen, L. McLandsborough, S.R. Nugen, M. Fan, L. He, Label-free mapping of single bacterial cells using surface-enhanced Raman spectroscopy, *Analyst*, 141 (2016) 1356-1362.
- [146] Y. Wang, K. Lee, J. Irudayaraj, Silver nanosphere SERS probes for sensitive identification of pathogens, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114 (2010) 16122-16128.
- [147] Y. Chao, T. Zhang, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) revealing chemical variation during biofilm formation: from initial attachment to mature biofilm, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 404 (2012) 1465-1475.
- [148] N.P. Ivleva, M. Wagner, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, In situ surface-enhanced Raman scattering analysis of biofilm, *Analytical chemistry*, 80 (2008) 8538-8544.
- [149] N.P. Ivleva, M. Wagner, A. Szkola, H. Horn, R. Niessner, C. Haisch, Label-free in situ SERS imaging of biofilms, *The Journal of Physical Chemistry B*, 114 (2010) 10184-10194.
- [150] J. Feng, C. de la Fuente-Núñez, M.J. Trimble, J. Xu, R.E. Hancock, X. Lu, An in situ Raman spectroscopy-based microfluidic “lab-on-a-chip” platform for non-

- destructive and continuous characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms, *Chemical Communications*, 51 (2015) 8966-8969.
- [151] A.J. Kell, G. Stewart, S. Ryan, R. Peytavi, M. Boissinot, A. Huletsky, M.G. Bergeron, B. Simard, Vancomycin-modified nanoparticles for efficient targeting and preconcentration of Gram-positive and Gram-negative bacteria, *Acs Nano*, 2 (2008) 1777-1788.
- [152] H. Jia, W. Wang, L. Qiu, N. Zhang, H. Ge, J. Wang, Fabricating a long-range ordered 3D bimetallic nanoassembly with edge-on substrate for highly sensitive SERS sensing of *Escherichia coli* bacteria, *Plasmonics*, 10 (2015) 1889-1894.
- [153] T.-Y. Liu, K.-T. Tsai, H.-H. Wang, Y. Chen, Y.-H. Chen, Y.-C. Chao, H.-H. Chang, C.-H. Lin, J.-K. Wang, Y.-L. Wang, Functionalized arrays of Raman-enhancing nanoparticles for capture and culture-free analysis of bacteria in human blood, *Nature communications*, 2 (2011) 538.
- [154] X. Wu, Y.-W. Huang, B. Park, R.A. Tripp, Y. Zhao, Differentiation and classification of bacteria using vancomycin functionalized silver nanorods array based surface-enhanced Raman spectroscopy and chemometric analysis, *Talanta*, 139 (2015) 96-103.
- [155] A. Sivanesan, E. Witkowska, W. Adamkiewicz, Ł. Dziewit, A. Kamińska, J. Waluk, Nanostructured silver–gold bimetallic SERS substrates for selective identification of bacteria in human blood, *Analyst*, 139 (2014) 1037-1043.
- [156] X. Wu, C. Xu, R.A. Tripp, Y.-w. Huang, Y. Zhao, Detection and differentiation of foodborne pathogenic bacteria in mung bean sprouts using field deployable label-free SERS devices, *Analyst*, 138 (2013) 3005-3012.
- [157] S.E. Bell, J.N. Mackle, N.M. Sirimuthu, Quantitative surface-enhanced Raman spectroscopy of dipicolinic acid—towards rapid anthrax endospore detection, *Analyst*, 130 (2005) 545-549.
- [158] R.M. Jarvis, A. Brooker, R. Goodacre, Surface-enhanced Raman scattering for the rapid discrimination of bacteria, *Faraday Discussions*, 132 (2006) 281-292.
- [159] S. Preciado-Flores, D.A. Wheeler, T.M. Tran, Z. Tanaka, C. Jiang, M. Barboza-Flores, F. Qian, Y. Li, B. Chen, J.Z. Zhang, SERS spectroscopy and SERS imaging of *Shewanella oneidensis* using silver nanoparticles and nanowires, *Chemical Communications*, 47 (2011) 4129-4131.
- [160] M. Kahraman, A.I. Zamaleeva, R.F. Fakhrullin, M. Culha, Layer-by-layer coating of bacteria with noble metal nanoparticles for surface-enhanced Raman scattering, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 395 (2009) 2559.
- [161] H. Zhou, D. Yang, N.P. Ivleva, N.E. Mircescu, R. Niessner, C. Haisch, SERS detection of bacteria in water by in situ coating with Ag nanoparticles, *Analytical chemistry*, 86 (2014) 1525-1533.

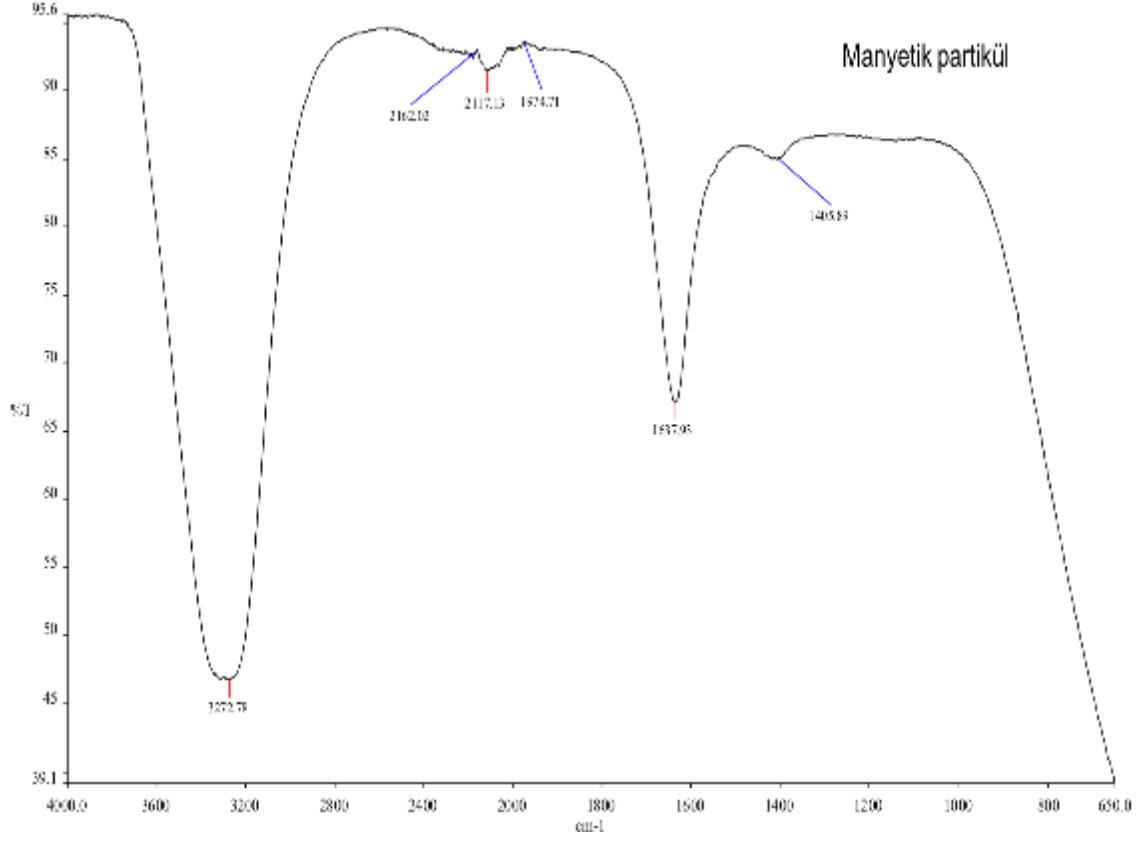
- [162] D. Yang, H. Zhou, C. Haisch, R. Niessner, Y. Ying, Reproducible E. coli detection based on label-free SERS and mapping, *Talanta*, 146 (2016) 457-463.
- [163] Z. Fan, D. Senapati, S.A. Khan, A.K. Singh, A. Hamme, B. Yust, D. Sardar, P.C. Ray, Popcorn-Shaped Magnetic Core-Plasmonic Shell Multifunctional Nanoparticles for the Targeted Magnetic Separation and Enrichment, Label-Free SERS Imaging, and Photothermal Destruction of Multidrug-Resistant Bacteria, *Chemistry–A European Journal*, 19 (2013) 2839-2847.
- [164] T.J. Ondera, A.T. Hamme II, A gold nanopopcorn attached single-walled carbon nanotube hybrid for rapid detection and killing of bacteria, *Journal of Materials Chemistry B*, 2 (2014) 7534-7543.
- [165] Q. Zhou, G. Meng, P. Zheng, S. Cushing, N. Wu, Q. Huang, C. Zhu, Z. Zhang, Z. Wang, A surface-enhanced Raman scattering sensor integrated with battery-controlled fluidic device for capture and detection of trace small molecules, *Scientific reports*, 5 (2015) 12865.
- [166] M. Knauer, N.P. Ivleva, X. Liu, R. Niessner, C. Haisch, Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms, *Analytical chemistry*, 82 (2010) 2766-2772.
- [167] K. Schwarzmeier, M. Knauer, N.P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch, Bioaerosol analysis based on a label-free microarray readout method using surface-enhanced Raman scattering, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 405 (2013) 5387-5392.
- [168] M. Knauer, N.P. Ivleva, R. Niessner, C. Haisch, A flow-through microarray cell for the online SERS detection of antibody-captured E. coli bacteria, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 402 (2012) 2663-2667.
- [169] T. Szymborski, E. Witkowska, W. Adamkiewicz, J. Waluk, A. Kamińska, Electrospun polymer mat as a SERS platform for the immobilization and detection of bacteria from fluids, *Analyst*, 139 (2014) 5061-5064.
- [170] A. Kamińska, E. Witkowska, A. Kowalska, A. Skoczyńska, I. Gawryszewska, E. Guziewicz, D. Snigurenko, J. Waluk, Highly efficient SERS-based detection of cerebrospinal fluid neopterin as a diagnostic marker of bacterial infection, *Analytical and bioanalytical chemistry*, 408 (2016) 4319-4327.
- [171] X. Lu, D.R. Samuelson, Y. Xu, H. Zhang, S. Wang, B.A. Rasco, J. Xu, M.E. Konkel, Detecting and tracking nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using a microfluidic SERS biosensor, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 2320-2327.
- [172] N.A. Mungroo, G. Oliveira, S. Neethirajan, SERS based point-of-care detection of food-borne pathogens, *Microchimica Acta*, 183 (2016) 697-707.
- [173] U.-C. Schröder, F. Bokeloh, M. O'Sullivan, U. Glaser, K. Wolf, W. Pfister, J. Popp, J. Ducrée, U. Neugebauer, Rapid, culture-independent, optical diagnostics of centrifugally captured bacteria from urine samples, *Biomicrofluidics*, 9 (2015) 044118.

- [174] A. Walter, A. März, W. Schumacher, P. Rösch, J. Popp, Towards a fast, high specific and reliable discrimination of bacteria on strain level by means of SERS in a microfluidic device, *Lab on a Chip*, 11 (2011) 1013-1021.
- [175] H. Pohl, K. Pollock, J. Crane, Dielectrophoretic force: A comparison of theory and experiment, *Journal of Biological Physics*, 6 (1978) 133-160.
- [176] C. Hanson, M. Sieverts, K. Tew, A. Dykes, M. Salisbury, E. Vargis, The use of microfluidics and dielectrophoresis for separation, concentration, and identification of bacteria, *Microfluidics, BioMEMS, and Medical Microsystems XIV*, International Society for Optics and Photonics, 2016, pp. 97050E.
- [177] U.-C. Schröder, A. Ramoji, U. Glaser, S. Sachse, C. Leiterer, A. Csaki, U. Hübner, W. Fritzsche, W. Pfister, M. Bauer, Combined dielectrophoresis–Raman setup for the classification of pathogens recovered from the urinary tract, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 10717-10724.
- [178] I.-F. Cheng, H.-C. Chang, T.-Y. Chen, C. Hu, F.-L. Yang, Rapid (< 5 min) identification of pathogen in human blood by electrokinetic concentration and surface-enhanced Raman spectroscopy, *Scientific reports*, 3 (2013) 2365.
- [179] I.-F. Cheng, T.-Y. Chen, R.-J. Lu, H.-W. Wu, Rapid identification of bacteria utilizing amplified dielectrophoretic force-assisted nanoparticle-induced surface-enhanced Raman spectroscopy, *Nanoscale research letters*, 9 (2014) 324.
- [180] F.R. Madiyar, S. Bhana, L.Z. Swisher, C.T. Culbertson, X. Huang, J. Li, Integration of a nanostructured dielectrophoretic device and a surface-enhanced Raman probe for highly sensitive rapid bacteria detection, *Nanoscale*, 7 (2015) 3726-3736.
- [181] S. Sánchez-Cortés, R.M. Berenguel, A. Madejón, M. Pérez-Méndez, Adsorption of polyethyleneimine on silver nanoparticles and its interaction with a plasmid DNA: a surface-enhanced Raman scattering study, *Biomacromolecules*, 3 (2002) 655-660.
- [182] A. Gumustas, M.G. Caglayan, M. Eryilmaz, Z. Suludere, E.A. Soykut, B. Uslu, I.H. Boyaci, U. Tamer, Paper based lateral flow immunoassay for the enumeration of *Escherichia coli* in urine, *Analytical Methods*, 10 (2018) 1213-1218.
- [183] H. Ilhan, B. Guven, U. Dogan, H. Torul, S. Evran, D. Çetin, Z. Suludere, N. Saglam, İ.H. Boyaci, U. Tamer, The coupling of immunomagnetic enrichment of bacteria with paper-based platform, *Talanta*, 201 (2019) 245-252.
- [184] J.D. Palumbo, M.K. Borucki, R.E. Mandrell, L. Gorski, Serotyping of *Listeria monocytogenes* by enzyme-linked immunosorbent assay and identification of mixed-serotype cultures by colony immunoblotting, *Journal of clinical microbiology*, 41 (2003) 564-571.
- [185] M. Vinay, N. Franche, G. Grégori, J.-R. Fantino, F. Pouillot, M. Ansaldi, Phage-based fluorescent biosensor prototypes to specifically detect enteric bacteria such as *E. coli* and *Salmonella enterica* Typhimurium, *PLoS One*, 10 (2015) e0131466.

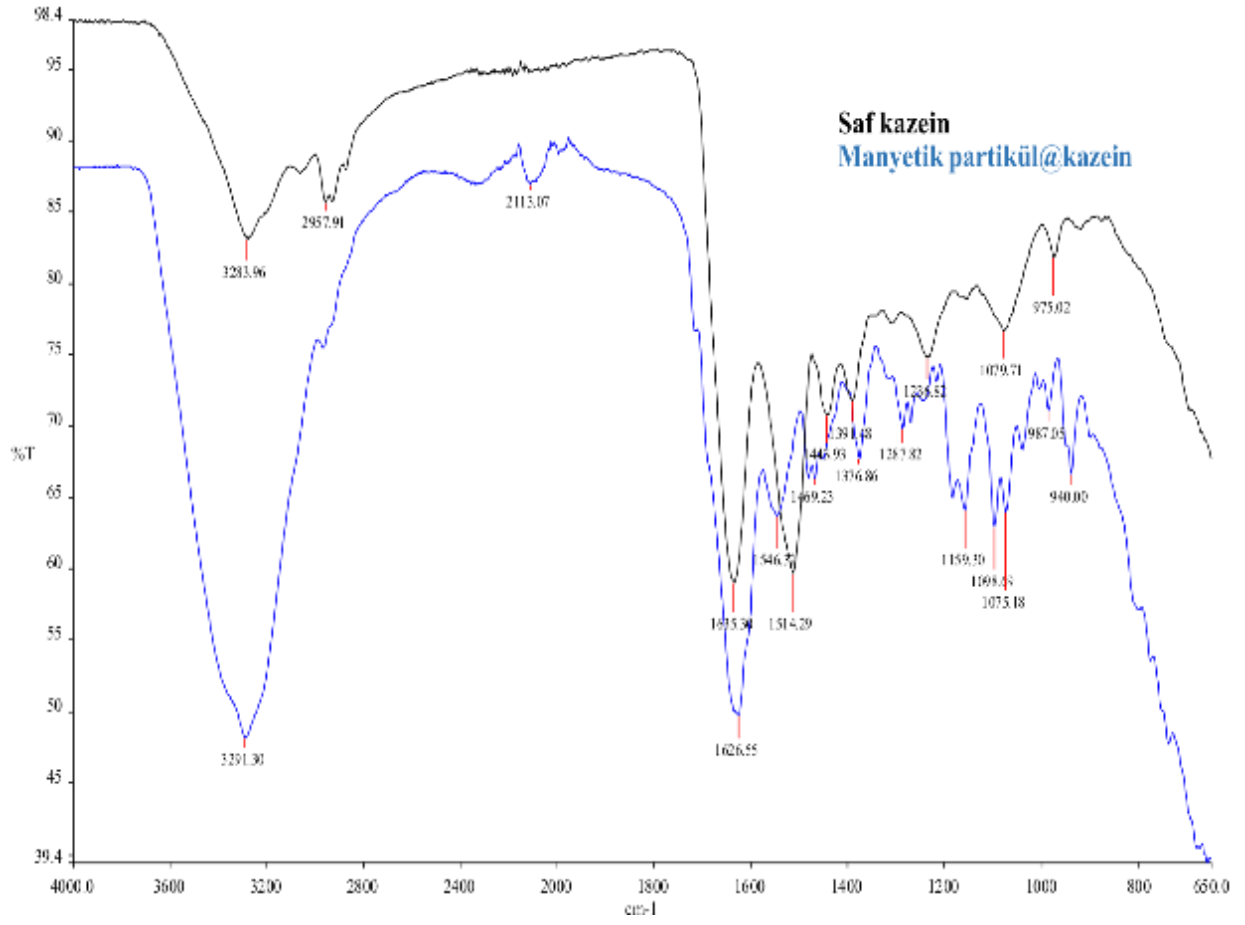
- [186] T. Laube, P. Cortés, M. Llagostera, S. Alegret, M.I. Pividori, Phagomagnetic immunoassay for the rapid detection of Salmonella, *Applied microbiology and biotechnology*, 98 (2014) 1795-1805.
- [187] P. Irwin, A. Gehring, S.-I. Tu, J. Brewster, J. Fanelli, E. Ehrenfeld, Minimum detectable level of Salmonellae using a binomial-based bacterial ice nucleation detection assay (BIND®), *Journal of AOAC International*, 83 (2000) 1087-1095.
- [188] J. Chen, M.W. Griffiths, Salmonella detection in eggs using lux+ bacteriophages, *Journal of Food Protection*, 59 (1996) 908-914.
- [189] S. Liébana, D.A. Spricigo, M.P. Cortés, J. Barbé, M. Llagostera, S. Alegret, M.I. Pividori, Phagomagnetic separation and electrochemical magneto-genosensing of pathogenic bacteria, *Analytical chemistry*, 85 (2013) 3079-3086.
- [190] P.K. Wolber, R.L. Green, Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes, *Trends in biotechnology*, 8 (1990) 276-279.

EKLER

6.1. EK 1 – Manyetik partiküllerin FTIR sonucu.



EK-2 Saf kazein ve manyetik partikül ile kovalent bağlı olan kazein'in FTIR sonuçları



6.2. EK 2 - Tezden Türetilmiş Yayınlar

H. Ilhan, B. Guven, U. Dogan, H. Torul, S. Evran, D. Çetin, Z. Suludere, N. Saglam, İ.H. Boyaci, U. Tamer, The coupling of immunomagnetic enrichment of bacteria with paper-based platform, Talanta, 201 (2019) 245-252.

6.3. EK 3 - Tezden Türetilmiş Bildiriler

Sözlü sunumlar

H. İlhan, U. Dogan, Z. Suludere, I. H. Boyacı, D. Cetin, N. Sağlam, and U. Tamer, SERS based *E. coli* enumeration in urine with using casein bound magnetic nanoparticles, 8th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (8th BBCAC), 9-11 Mayıs, Şile, İstanbul, 2018.

H. İlhan, U. Dogan, Z. Suludere, I. H. Boyacı, D. Cetin, N. Sağlam, and U. Tamer, LFIA enumeration of *E.coli* using Fe₃O₄/Au-PEI nanoparticles in blood, 12th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS), 26-29 Haziran, Ankara, 2018.

Poster sunumlar

H. İlhan, U. Tamer, N. Sağlam, The detection of *E. coli* using lateral flow immunoassay of PEI modified Fe₃O₄/Au nanoparticles, 7th Rostocker International Conference: Thermophysical Properties for Technical Thermodynamics, 26-27 Temmuz, Rostock, Germany, 2018.

H. İlhan, U. Dogan, H. Ciftci, U. Tamer, and N. Sağlam, The synthesis and characterization of PEI modified Fe₃O₄/Au nanoparticles for rapid enumeration of *E. coli*, 3rd International congress on biosensors, 5-7 Ekim, Ankara, 2015.



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
NANOTEKNOLOJİ NANOTİP ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: 27/06/2019

Tez Başlığı *Escherichia coli* ve *Salmonella enteritidis* Tayinine Yönelik Yatay Akış Analiz Sistemi Geliştirilmesi.
Yukarıda başlığı gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 100 sayfalık kısmına ilişkin, 27/06/2019 tarihinde tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 6 'dır.

Uygulanan filtrelemeler:

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

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

Gereğini saygılarımla arz ederim.

Tarih ve İmza 27.06.2019

Adı Soyadı: HASAN İLHAN
Öğrenci No: N12242473
Anabilim Dalı: NANOTEKNOLOJİ NANOTİP
Programı: NANOTEKNOLOJİ NANOTİP
Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

Prof. Dr. Necdet SAĞLAM

(İmza)

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Hasan İLHAN
Doğum yeri : Beykoz
Medeni hali : Evli
Yazışma adresi : Ordu Üniversitesi Kimya Bölümü
Telefon : 05423191807
Elektronik posta adresi : hasanilhan@hacettepe.edu.tr
Yabancı dili : İngilizce

EĞİTİM DURUMU

Lisans : Atatürk Üniversitesi Kimya
Yüksek Lisans : University of Massachusetts Biochemistry
Doktora : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp

İş Tecrübesi

2008-2010 : University of Massachusetts Biochemistry
2010-2011 : Tufts University Teaching assistant
2012-2013 : Ordu Üniversitesi Kimya Arş gör.
2013- : Hacettepe Üniversitesi Nanoteknoloji ve Nanotıp Arş gör.