

ÖZET

E. COLİ O157:H7 PATOJENİNİN HIZLI VE SEÇİSİ TANISINDA KULLANIM İÇİN
MULTİTOP FLOROSENSÖR

5 Mevcut buluş, E.coli O157:H7 patojeninin erken, hızlı ve seçici tanısına olanak sağlayan bir biyosensöre ve bu biyosensörü içeren tanı kitlerine ve E.coli O157:H7 patojenini tespit etmek için bir yöntemle ilişkindir.

İSTEMLER

1. *E.coli O157:H7* bakterisinin karmaşık sistemlerden tespiti ve/veya ayrılması ve/veya saflaştırılmasında kullanıma uygun bir optik sensör olup özelliği *E. Coli O157:H7*'nin KT-12 (SEQ ID No:1), YA-13 (SEQ ID No: 2), TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından en az birine özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıkları içermesidir.
2. İstem 1'e göre bir optik sensör olup özelliği; merkezde bir grafen kuantum noktacığ çekirdeği ve etrafında ise KT-12 (SEQ ID No:1), YA-13 (SEQ ID No: 2), TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından en az birine özgü boşluklara sahip bir polimer tabakası içermesidir.
3. İstem 2'ye göre bir optik sensör olup özelliği polimer tabakasının KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluklar içermesidir.
4. İstem 2'ye göre bir optik sensör olup özelliği polimer tabakasının KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitoplarına özgü boşluklar içermesidir.
5. İstem 2'ye göre bir optik sensör olup özelliği polimer tabakasının KT-12 (SEQ ID No:1) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluklar içermesidir.
6. İstem 2'ye göre bir optik sensör olup özelliği polimer tabakasının YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluklar içermesidir.
7. İstem 2'ye göre bir optik sensör olup özelliği polimer tabakasının KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluklar içermesidir.
8. İstem 2-7'den herhangi birine göre bir optik sensör olup özelliği, polimer tabakasının moleküler baskılama yöntemiyle elde edilen KT-12 (SEQ ID No:1), YA-13 (SEQ ID No: 2), TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından en az birine özgü boşlukları içermesidir.
9. İstem 2-8'den herhangi birine göre bir optik sensör olup özelliği KT-12 (SEQ ID No:1), YA-13 (SEQ ID No: 2), TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından en az birine özgü boşluklara sahip polimer tabakasının etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ile çapraz bağlı poli oligoetilen metakrilat p(OEGMA) polimeri içermesidir.
10. İstem 1-9'dan herhangi birine göre bir optik sensörün elde edilmesinde kullanılan bir yöntem olup (Metot I) özelliği;

1. -OH fonksiyonel gruba sahip grafen kuantum noktacıkların (GQDs) oligo(etilen glikol)monometil eter metakrilat (OEGMA) ve bakır (II) akrilat (Cu(II)Ac) monomerleri ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopları ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ile beraber bir organik solvent içerisinde dağıtılması,
 2. Önceki adımda elde edilen karışıma en az bir polimerleşme başlatıcısı, eklenmesiyle polimerizasyonun başlatılması,
 3. Polimerleşme reaksiyonu (polimerizasyon) sonrasında polimerle kaplanan grafen kuantum noktacıkların reaksiyon ortamından ayrılması,
 4. Bir önceki adımda elde edilen polimerle kaplı grafen kuantum noktacıkların alkol ve organik asit içeren bir çözeltiyle yıkanmasıyla polimer yapısı içerisindeki KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının uzaklaştırılması ve böylece grafen kuantum noktacık çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip polimer tabakasının elde edilmesi adımlarını içermesidir.
11. İstem 1-9'dan herhangi birine göre bir optik sensörün elde edilmesinde kullanılan bir yöntem olup (Metot II) özelliği;
1. Piren'in nitrik asit içerisinde nitratlanmasıyla -OH fonksiyonel grafen kuantum noktacıkları elde edilmesi ve sonrasında
 2. -OH fonksiyonel gruba sahip grafen kuantum noktacıkların (GQDs) oligo(etilen glikol)monometil eter metakrilat (OEGMA) ve bakır (II) akrilat (Cu(II)Ac) monomerleri ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopları ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ile beraber bir organik solvent içerisinde dağıtılması,
 3. Önceki adımda elde edilen karışıma en az bir polimerleşme başlatıcısı, eklenmesiyle polimerizasyonun başlatılması,
 4. Polimerleşme reaksiyonu (polimerizasyon) sonrasında polimerle kaplanan grafen kuantum noktacıkların reaksiyon ortamından ayrılması,

5. Bir önceki adımda elde edilen polimerle kaplı grafen kuantum noktacıkların alkol ve organik asit içeren bir çözeltiyle yıkanmasıyla polimer yapısı içerisindeki KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının uzaklaştırılması ve böylece grafen kuantum noktacık çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip polimer tabakasının elde edilmesi adımlarını içermesidir.
12. İstem 10 veya 11'e göre bir yöntemle elde edilen *E. Coli O157:H7*'nin KT-12 (SEQ ID No:1), YA-13 (SEQ ID No: 2), TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından en az birine özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklar.
13. İstem 1-9'dan herhangi birine göre optik sensörlerden en az birini içeren optik biyosensör bileşimi.
14. İstem 13'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklardan birini içermesidir.
15. İstem 13'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklardan ikisini içermesidir.
16. İstem 15'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar veya YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar veya KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklarını içermesidir.
17. İstem 15'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklar veya YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklar veya KT-12 (SEQ ID No:1) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklarını içermesidir.

18. İstem 13'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıkların üçünü bir arada içermesidir.

19. İstem 18'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıkları içermesidir.

20. İstem 18'e göre biyosensör bileşimi olup özelliği bileşimin KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıkları içermesidir.

21. İstem 13-20'ye göre optik biyosensörlerin bir numune içerisindeki E.coli O157:H7 varlığını tespit için kullanımı.

22. E.coli O157:H7 varlığını tespit için kullanım için bir kit olup özelliği;

- Bir kap, tercihen vial veya eppenforf tüpü, içerisinde istem 13-20'ye göre optik biyosensör bileşimi ve
- İsteğe bağlı olarak bir diğer kap; tercihen vial veya eppendorf tüpü, içerisinde bir tampon çözeltisi ve,
- İsteğe bağlı olarak kitin çalışma prensibini anlatan bir bilgilendirici doküman ve
- İsteğe bağlı olarak, kitin doğru çalıştığını gösteren bir referans çözelti içermesidir.

TARİFNAME

ESCHERICHIA COLI O157:H7 PATOJENİNİN HIZLI VE SEÇİCİ TANISINDA KULLANIM İÇİN MULTİTOP FLOROSENSÖR

Teknik Alan

- 5 Mevcut buluş, *Escheria coli O157:H7* patojeninin erken, hızlı ve seçici tanısına olanak sağlayan bir biyosensöre ve bu biyosensörü içeren tanı kitlerine ve *E.coli O157:H7* patojenini tespit etmek için bir yöntemle ilişkindir.

Tekniğin Bilinen Durumu

- 10 Gıda güvenliğini sağlamak oldukça zor ve kompleks süreçler içermektedir. Özellikle bu süreçlerde yaşanan aksaklıklar nedeniyle gıda kaynaklı salgın hastalıklar halk sağlığını ciddi şekilde tehdit etmekte ve ekonomik kayıplara neden olmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) yayınladığı bir rapora göre (WHO strategic plan for food safety 2013-2022), zararlı bakteriler, virüsler, parazitler veya kimyasal maddeler içeren güvensiz gıdalar, diyareden kansere kadar değişen 200'den fazla hastalığa neden olabilir. Her yıl kontamine gıda
- 15 tüketiminden yaklaşık 600 milyon insan çeşitli hastalıklara yakalanmaktadır ve bunların yaklaşık 420 bini ölümle sonuçlanmaktadır. Hastalık kontrol ve önleme merkezi tarafından ABD'de her yıl patojenik bakterilerin 3.6 milyon kişinin hastalanmasına sebep olduğu tahmin edilmektedir ve en yaygın gıda kaynaklı patojenik bakterilerin *Escherichia coli O157:H7*, *Salmonella spp.*, *Campylobacter jejuni* ve *Listeria monocytogenes* olduğu belirlenmiştir.
- 20 *Escherichia coli O157:H7* (E.coli O157:H7), gıda güvenliğini tehlikeye atan ve en çok karşılaşılan patojenlerdendir. Sığır ve koyunların E. coli için ana kaynak olduğu bilinmektedir. İnsanlardaki E.coli kaynaklı enfeksiyonlar genellikle az pişirilmiş etler, pastörize olmayan süt ve süt ürünleri, meyve suları, içme suyu, meyve ve sebzeler gibi hayvan dışkı bulaşmış yiyeceklerin veya içeceklerin tüketilmesi neticesinde olmaktadır. Ayrıca hayvanlardan
- 25 dokunma ile, insandan insana doğrudan geçiş, hatta anneden bebeğine geçişin de mümkün olduğu bilinmektedir. *E.coli O157:H7* ile kontamine gıdanın alınmasından sonra bakteri direkt bağırsağa gider. Bağırsakta E.coli tarafından Shiga toksini (Stx (Stx1 ve Stx2)) salgılanır. Bu ekzotoksinler sindirim sistemi epitelinden emilir ve hedef organa ulaşır. Şiddetli karın ağrısı, sulu ishal, kanlı ishal, hemorajik kolit, hemolitik üremik sendrom (HÜS), akut böbrek
- 30 yetmezliği gibi birçok farklı klinik tabloya yol açabilir. Shiga-toksin enfeksiyonları, düşük

enfesiyöz dozda (700) bakteri nöbetler ve solunum yetmezliği gibi ağır hastalıklara neden olabilmektedir. Özellikle genç ve immün yetmezliği olan bireylerde ciddi hastalıklara neden olmaktadır.

Ek olarak, *E.coli O157:H7*'ye karşı antibiyotik kullanımı sınırlıdır. Çoğu zaman duyarlı olsa da bu bakteriler antibiyotikler tarafından zarara uğradığı zaman Stx salgılayabilirler. Bu durum, hemolitik üremik sendromun başlamasına neden olur ve semptomlar daha da kötüleşebilir. *E.coli O157:H7* bakterisi ABD, Japonya ve Çin'de hemolitik üremik sendromun en önemli sebebi olarak görülmektedir.

Günümüzde *E.coli O157:H7* salgınlarının yayılması, insan sağlığı ve küresel halk sağlığına karşı büyük bir tehdit oluşturmaya devam etmektedir. Bu nedenle, bu mikroorganizmaları çok düşük seviyede tespit etmek, hızlı analiz etmek ve bakteri suşları arasında ayırım yapabilmek, salgınları kontrol etmek ve önlemek için oldukça önemlidir. Bu salgınların yayılması çoğunlukla gıda kaynaklı olduğu için, gıda güvenliğini sağlamak amacıyla hızlı ve hassas yöntemlerin geliştirilmesine acil ihtiyaç vardır. Patojen bakterilerin tanımlanması ve tespiti için altın standart yöntem geleneksel kültür yöntemidir. Bu tekniğin temeli bakterilerin fizyolojik ve kimyasal farklılıklarına dayanan koloni sayım metoduna dayanır.

Kültür yöntemi, patojen tespiti için altın standart yöntem olmasına rağmen zaman alıcıdır. Olumlu bir analiz 1 tam gün hatta birkaç gün sürebilir. Bu kadar uzun süreli olması saha içi uygulamalar için uygun değildir. Bu nedenle hızlı, güvenilir, spesifik ve yüksek hassasiyetli bakteri tespitinin düşük maliyetli bir şekilde yapılmasına büyük bir ihtiyaç duyulduğu aşıkardır.

Son yıllarda nanoteknoloji ile paralel bir ilerleme gösteren nanobiyoteknoloji alanlarında yapılan çalışmalar sayesinde biyolojik sistemlerin çalışması ile ilgili önemli sonuçlar elde edilmiştir. Özellikle canlı bir hücrede gerçekleşen birçok tepkimenin doğrudan ya da dolaylı olarak izlenmesine olanak sağlayan nano-ölçekli görüntüleme ajanları sayesinde birçok biyolojik olay takip edilebilmektedir. Canlı hücrelerde meydana gelen reaksiyonlardan özellikle antikor-antijen etkileşimi, DNA hibritleşmesi, enzim-substrat ilişkileri günümüzde birçok çalışmaya esin kaynağı olmuştur. Nanobiyoteknolojinin sunduğu imkanlar çerçevesinde canlı bir hücrede gerçekleşen tepkimeler taklit edilerek birçok yeni nesil ve nano-ölçekli malzemeler üretilmiş ve sonuçta *E.coli O157:H7* tespiti için nano-ölçekli algılayıcılar üretilmiştir. Ancak bu algılayıcılar *E.coli O157:H7* bakterisinin ortamdaki uzaklaştırılmasını sağlamak üzerine kurulu bir sisteme sahip değildir.

Tekniğin bilinen durumunda, *E.coli O157:H7* bakterisinin karmaşık sistemlerden tanınması/ayrılması/saflaştırılması için çeşitli yöntemler/sensörler geliştirilmesine rağmen önerilen birçok yöntemin pratik uygulamalarda çok maliyetli olması, karmaşık ön hazırlıklar içermesi, bazılarının çok iyi uzmanlık istemesi, kararlılıklarının ve tekrarlanabilirliklerinin çok düşük olması uygulamalarda bu sensörlere/yöntemlere sınırlamalar getirmektedir. Bu gibi dezavantajların önüne geçebilmek adına aynı anda birden çok fonksiyona sahip, ekonomik, kararlı, kolay hazırlanabilen, birden fazla defa kullanılabilen, yüksek ilgi ve seçiciliğe sahip olan sensörler geliştirmeyi amaçlamaktadır.

10 Buluşun Kısa Açıklaması

Yukarıda bahsedilen amaçlardan yola çıkan buluş sahipleri, *E.coli O157:H7* bakterisinin karmaşık sistemlerden tespiti ve/veya ayrılması ve/veya saflaştırılmasında kullanıma uygun bir optik sensör, tercihen floresensör geliştirmiştir. Burada bahsi geçen optik sensör *E. Coli O157:H7*'nin KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensörlerdir.

Şekillerin Açıklaması

Şekil 1: Buluşa uygun *E. Coli O157:H7* tespit kiti

1: Eppendorf tüpü

2: Grafen kuantum noktacıklar (GQDs)

3: KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren polimer tabaka

4: Tampon çözeltisi

Şekil 2: KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklara sahip grafen kuantum noktacıkların hazırlanmasını ve çalışma prensibini gösteren şema

200: -OH fonksiyonel gruba sahip grafen kuantum noktacıklar

201: OEGMA, Cu(II)Ac, EGDMA, AIBN, Asetonitril ve KT-12 veya TV-10 veya YA-13 varlığında yapısında KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplari bulunan grafen kuantum noktacıkların hazırlanması

5 **202:** Yapısında KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplari bulunan grafen kuantum noktacıklar (florasans sönümlenmesi gözlenir).

203: Polimer yapısında bulunan KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariinin uzaklaştırılması

10 **204:** KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşluklara sahip grafen kuantum noktacıklar (florasans emisyonu gözlemlenir).

205: Numune içerisindeki *E. Coli O157:H7* bakterisini yakalayan KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşluklara sahip grafen kuantum noktacıklar (florasans sönümlenmesi gözlemlenir).

15

Buluşun Detaylı Anlatımı

Yukarıda da bahsedildiği gibi, mevcut buluş *E. Coli O157:H7* bakterisinin tespitinde veya ayrılmasında veya saflaştırılmasında kullanıma uygun; *E. Coli O157:H7*'nin KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşlukları
20 içeren grafen kuantum noktacıklardan oluşan optik sensörlere ilişkindir.

Buluşa uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklar, merkezde bir grafen kuantum noktacak çekirdeği ve etrafında ise sırasıyla KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşluklara sahip bir polimer tabakasından
25 oluşur.

Buluş kapsamında kullanılan “KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplariına özgü boşluklara sahip bir polimer tabakası” ifadesi bir polimer

tabakasına “moleküler baskılama” yöntemi uygulamasıyla elde edilen boşlukları ifade etmektedir.

Burada bahsi geçen “moleküler baskılama” yöntemi; polimer tabakasının oluşturulması esnasında ortamda KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının bulunmasıyla yapısında KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının yer aldığı bir polimer tabakasının elde edilmesini ve polimerizasyon sonrasında bu polimer tabakası yapısı içerisindeki KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının uzaklaştırılması yöntemini ifade etmektedir. Bu yöntem sonucunda polimer yapısı korunmakta ancak polimer yapısı içerisinde uzaklaştırılan KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü, bir diğer deyişle bu epitopların 3 boyutlu yapısına ait, boşluklar oluşmaktadır.

Buluşu uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklarda grafen kuantum noktacık çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip polimer tabakası oligo(etilen glikol) monometil eter metakrilat (OEGMA) ve bakır(II) akrilat (Cu(II)Ac) monomerleri ve etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) çapraz bağlayıcısından oluşur. Bir diğer deyişle, KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklarda grafen kuantum noktacık çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip etilen glikol dimetakrilat (EGDMA) ile çapraz bağlı poli oligoetilen metakrilat p(OEGMA) polimer tabakasıdır.

Buna göre buluşun bir uygulaması, grafen kuantum noktacık çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip polimer tabakasının hazırlanmasında kullanılan bir yöntemle ilişkin olup (Metot 1) söz konusu yöntem;

- -OH fonksiyonel gruba sahip grafen kuantum noktacıkların (GQDs) oligo(etilen glikol)monometil eter metakrilat (OEGMA) ve bakır (II) akrilat (Cu(II)Ac) monomerleri ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopları

ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) ile beraber bir organik solvent, örneğin asetronitril içerisinde dağıtılması,

- Önceki adımda elde edilen karışıma en az bir polimerleşme başlatıcısı, örneğin AIBN, eklenmesiyle polimerizasyonun başlatılması,

5 - Polimerleşme reaksiyonu (polimerizasyon) sonrasında polimerle kaplanan grafen kuantum noktacıkların reaksiyon ortamından ayrılması,

- Bir önceki adımda elde edilen polimerle kaplı grafen kuantum noktacıkların alkol ve organik asit içeren bir çözeltiyle yıkanmasıyla polimer yapısı içerisindeki KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının uzaklaştırılması ve böylece grafen kuantum noktacığın çekirdeği etrafında yer alan ve KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip polimer tabakasının elde edilmesi adımlarını içerir.

Buluşun bir unsuru, Metot I'de yer alan polimerle kaplanan grafen kuantum noktacıkların reaksiyon ortamından ayrılması adımıyla santrifüj kullanılmasıdır.

- 15 Buluşun bir diğer unsuru polimer yapısı içerisindeki içerisindeki KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarının uzaklaştırılması adımıyla metanol:asetik asit (9:1 v/v) çözeltisi ile hiç epitop gözlenmeye kadar yıkanmasıdır. Burada epitop varlığı HPLC ile takip edilir. Belirli periyotlarla yapılan HPLC analizinde yıkama solüsyonunda KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına ait pik görülmediğinde yıkama işlemi sonlandırılır.

Buluşun bir diğer unsuru ise, polimerizasyon işleminin tercihen 65 °C üzerinde, özellikle tercihen 65 °C ile 95 °C arasında bir sıcaklıkta ve azot atmosferinde gerçekleştirilmesidir.

- 25 Buluş bir diğer açıdan Metot I'e göre bir prosesle elde edilebilen KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip grafen kuantum noktacıklara ilişkindir.

- 30 Buluşun bir uygulamasında, ilk adımda KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarından yalnızca biri polimerizasyon karışımına eklenebileceği gibi, ikisi birlikte veya üçü birden de polimerizasyon karışımına eklenebilir. Bu durumda örneğin polimerizasyon karışımına KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) veya KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) veya KT-12 (SEQ ID No:1) ve TV-10 (SEQ ID No:3) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ

ID No:3) veya KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) eklenebilir. Yukarıda bahsedilen tüm epitop kombinasyonlarının kullanılmasıyla elde edilen buluşa uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklar buluş kapsamına dahildir.

5 Buluş bir diğer açıdan KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip grafen kuantum noktacıkların hazırlanması için bir yöntemle ilişkin olup (Metot II);

- Piren'in nitrik asit içerisinde nitratlanmasıyla -OH fonksiyonel grafen kuantum noktacıkları elde edilmesi ve sonrasında

10 - Metot I'e ait adımların uygulanması adımlarını içerir.

Buluş bir diğer açıdan Metot II'ye göre bir prosesle elde edilebilen KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) tanıma bölgelerine sahip grafen kuantum noktacıklara ilişkindir.

15 Buluşa uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklar temelli optik sensörler ve/veya Metot I veya Metot II'ye göre hazırlanan grafen kuantum noktacıklar, beklenmeyen bir şekilde 32 haftalık kararlılık süresine sahiptir. Ayrıca söz konusu grafen kuantum noktacıklar 10 dakika gibi kısa bir sürede en az 10 bakteriyi moleküler olarak tanıyabilen ve ayırabilen bir optik sensör olma özelliği taşımaktadır. Bu yönüyle buluşa uygun grafen kuantum noktacıklar tekniğin

20 bilinen durumunu aşmakta ve uzun süre kararlı kalabilen ve bakterilerin hızlı ve yüksek sayıda tespit edilmesine olanak sağlayan bir sensör sağlamaktadır.

Buluşa uygun optik sensör yapılarında yer alan spesifik tanıma bölgeleri aracılığıyla bir numune içerisinde yer alan E.coli O157:H7 bakterilerini tespit etmektedir. Bahsi geçen bu tanıma işlemi, numune içerisinde yer alan E.coli O157:H7 epitopunun buluşa uygun optik

25 sensör üzerinde yer alan boşluklara tutunması ve bu tutunma sonrasında gerçekleşen floresans değişimi sayesinde gerçekleşmektedir. Bu şekilde numune içerisindeki E.coli O157:H7 varlığı hızlı bir şekilde ve komplike testlere gerek kalmadan tespit edilebilmektedir.

Buluş kapsamında kullanılan “KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensör” ve “KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacıklar” ifadeleri birbiriyle aynı anlama gelmekte olup birbiri yerine kullanılabilir.

Buluşun bir diğer uygulaması buluşa uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensörlerden en az birini veya isteğe bağlı olarak ikisini veya üçünü bir arada içeren optik biyosensör bileşimlerine ilişkindir.

10 Burada bahsi geçen “en az birini içeren” ifadesi biyosensör içerisinde KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklardan birinin bulunmasını ifade etmektedir.

Burada bahsi geçen “ikisini bir arada içeren” ifadesi biyosensör içerisinde “KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar” veya “YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar” veya “KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar” bulunmasını ifade etmektedir.

20 Burada bahsi geçen “en az ikisini içeren” ifadesi buluşun bir diğer uygulamasında biyosensör içerisinde “KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklar” veya “YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklar” veya “KT-12 (SEQ ID No:1) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıklar” bulunmasını ifade etmektedir.

Burada bahsi geçen “üçünü bir arada içeren” ifadesi biyosensör içerisinde KT-12 (SEQ ID No:1) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve YA-13 (SEQ ID No: 2) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıklar ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitopuna özgü boşluk içeren grafen kuantum noktacıkların bulunmasını ifade etmektedir.

Burada bahsi geçen “üçünü bir arada içeren” ifadesi buluşun bir diğer uygulamasında KT-12 (SEQ ID No:1) ve YA-13 (SEQ ID No: 2) ve TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşluklar içeren grafen kuantum noktacıkların bulunmasını ifade etmektedir.

5 Mevcut buluşun bir uygulaması KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensörlerden en birini veya isteğe bağlı olarak ikisini veya üçünü bir arada içeren optik biyosensör bileşimlerinin *E.coli O157:H7* varlığını tespit için kullanımına ilişkindir. Bu bağlamda, *E.coli O157:H7* varlığı herhangi bir numuneden tespit edilebilir.

Buluşun tercih edilen bir uygulamasında bahsi geçen optik sensör bir floresensördür.

10 Buluş kapsamında kullanılan “*E.coli O157:H7*” ve “*Escheria coli O157:H7*” ifadeleri birbiri ile aynı anlama gelmekte olup birbirinin yerine kullanılabilir.

Mevcut buluş bir diğer açıdan *E.coli O157:H7* varlığını tespit için bir kitle ilişkili olup, söz konusu kit;

- Ependorf tüpü
- 15 - Buluşa uygun KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensörlerden en az birini veya isteğe bağlı olarak ikisini veya üçünü bir arada içeren optik biyosensör bileşimi ve
- İsteğe bağlı olarak bir tampon çözeltisi, örneğin PBS veya bikarbonat-karbonik asit tampon çözeltisi içerir.
- 20

Buluşa uygun kitten elde edilen sonuç, test numunesi ile temas sonrasında spektrofotometre ile veya floresans mikroskobu ile okuma yapılarak belirlenir. Buluşun tercih edilen bir uygulamasında floresans spektroskopisi kullanılır.

Buluş kapsamındaki "içeren" ifadesi aynı zamanda "kapsayan" anlamında da kullanılmaktadır.

25 Teknik olarak uygun olduğu durumlarda, buluşun uygulamaları birleştirilebilir.

Buluş, aşağıda sadece açıklama amacıyla verilmiş olan ve buluşun kapsamını sınırlandıracak şekilde yorumlanmaması gereken örneklerle atıfta bulunularak daha ayrıntılı olarak açıklanacaktır.

Örnekler

Örnek 1: Buluşa uygun E.coli O157:H7 tespit kitinin içeriği

Buluşa uygun E.coli O157:H7 tespit kitinin içeriğinde; (a) bir kap, örneğin bir ependorf tüpü içerisinde, KT-12 (SEQ ID No:1) veya YA-13 (SEQ ID No: 2) veya TV-10 (SEQ ID No:3) epitoplarına özgü boşlukları içeren grafen kuantum noktacık temelli optik sensör türlerinden en az biri, isteğe bağlı olarak ikisi veya üçü yer alır ve isteğe bağlı olarak (b) tampon çözeltisi, örneğin PBS içeren bir kapalı kap, örneğin ependorf tüpü veya vial bulunur.

Buluşa uygun kit aynı zamanda kitin çalışma prensibini anlatan bir bilgilendirici doküman ve/veya yapılan testin doğru şekilde çalıştığını gösteren bir referans çözelti vb. içerebilir.

10

Örnek 2: E.coli O157:H7 tespit kitinin hazırlanması

1. Grafen kuantum noktacıkların sentezi: -OH fonksiyonel grafen kuantum noktacıklar (GQD-OH), nitrik asit içindeki pirenin nitratlanması ile sentezlenir.

2. Moleküler baskılanmış kuantum noktacıkların sentezi: -OH fonksiyonel GQDs, oligo(etilen glikol) monometil eter metakrilat (OEGMA) ve bakır (II) akrilat (Cu(II) Ac) monomerleri, KT-12 veya YA-13 veya TV-10 epitopları ve etilenglikoldimetakrilat (EGDMA) asetonitrilde dağıtılır. Çözelti 45 dakika boyunca ultrasonik titreşime tabi tutulur ve azot atmosferinde azobisisobutironitril (AIBN) başlatıcısı eklenerek polimerleşme başlatılır. 30 dakika boyunca 90 °C' da devam eden polimerleşme tepkimesi neticesinde elde edilen polimer kaplı GQDlar 14000 rpm hızla santrifüj edildikten sonra, metanol:asetik asit (9:1, v/v) ile yapıda hiç epitop gözlenmeyene dek yıkanır (HPLC ile takip edilir). Bu işlem neticesinde E.coli O157:H7 bakterisinin epitoplarına özgü boşluklara sahip olan moleküler baskılanmış kuantum noktacıklar elde edilir.

Yukarıda da açıklandığı gibi, burada açıklanan şekilde elde edilen E. coli O157:H7 bakterisinin farklı epitoplarına özgü boşluklara sahip ve bu bakteriyi tanıma yeteneğine sahip baskılanmış grafen kuantum noktacıklar totalde 32 haftalık bir kararlılık süresine sahip olup, gerçek numuneden 10 dakika gibi bir sürede en az 10 bakteriyi moleküler tanıma ve ayırma özelliğine sahip bir optik sensördür. Hazırlanan grafen kuantum noktacıklar, E. coli O157:H7 bakterisinin

25

moleküler tanınmasında hızlı, güvenilir ve kolay tespit yeteneğine sahip bir sensör ve aynı zamanda yöntemdir.

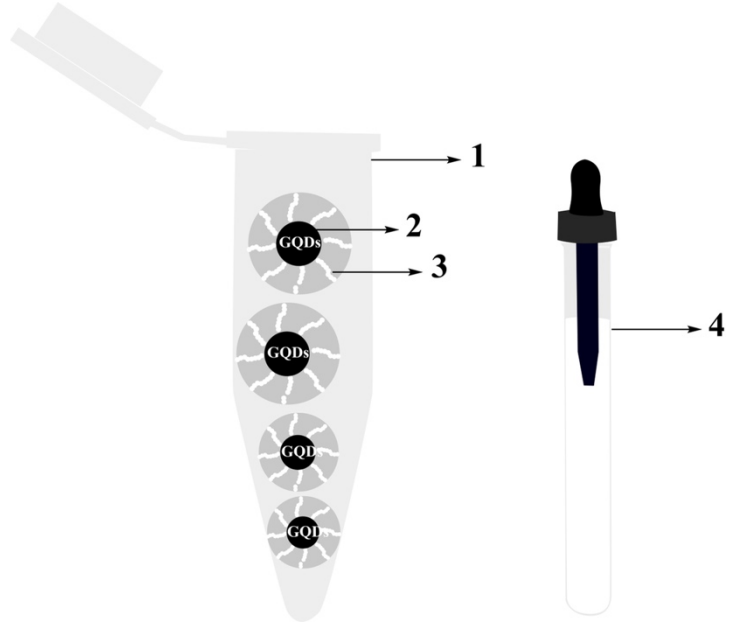
5

10

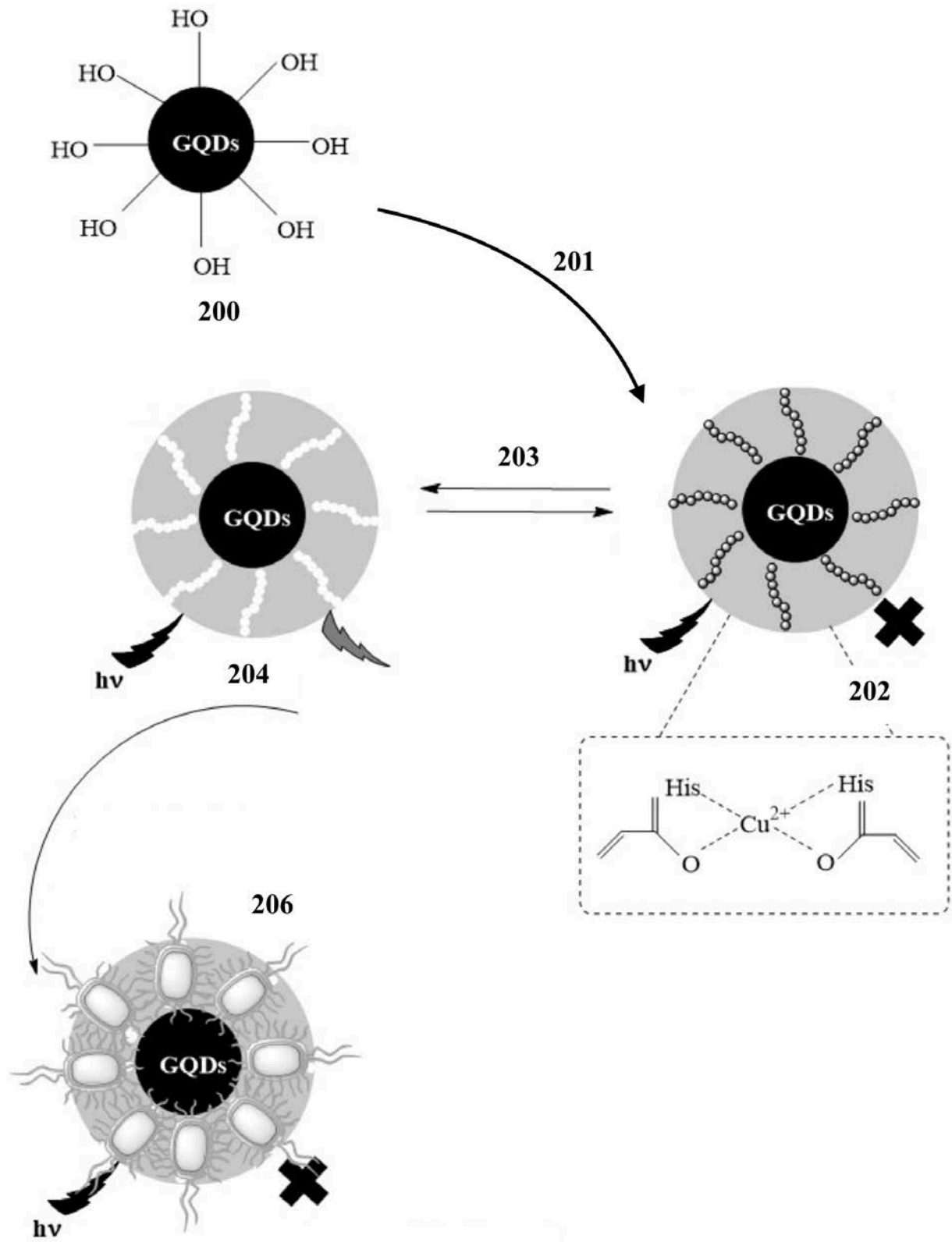
15

20

1/2



Şekil 1



Şekil 2