



Kloramfenikol Aptameri Fonksiyonlandırılmış DNA Hidrojellerinin Sentez Koşullarının Optimizasyonu

Gülnur Camızcı Aran¹, Ceren Bayraç^{2*}

^{1,2}Biyomühendislik Bölümü, Mühendislik Fakültesi, Karamanoğlu Mehmetbey Üniversitesi, Karaman, Türkiye

Makale Tarihiçesi

Gönderim: 07.09.2022

Kabul: 20.10.2022

Yayın: 05.03.2023

Araştırma Makalesi

Öz – Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojelleri yüksek özgünlük, stabilite ve esneklik gibi özellikleri nedeniyle birçok alanda kullanılmaktadır. Bu çalışma kapsamında kloramfenikole özgü aptamer dizisi fonksiyonlandırılmış DNA hidrojeli sentezi gerçekleştirilmiş ve hidrojel stabilitesi için önemli parametreler optimize edilmiştir. Sentez için 5' uçları akrilit modifiyeli kloramfenikole özgü aptamer ile ona kısmen eşlenik DNA ipliği polimer yapıya yan dal olarak katılmış ve eşlenik bölgelerin hibridizasyonu ile bir arada tutularak hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Optimize edilmiş parametreler akrilit modifiyeli DNA dizilerinin konsantrasyonları, akrilamid yüzdesi, kloramfenikol aptameri ve DNA iplik 1 içeren lineer polimer çözeltilerin molar oranlarıdır. Ayrıca, reaksiyon sıcaklığı ve eşlenik bölgenin uzunluğunun jel stabilitesine etkisi değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, DNA hidrojel stabilitesi için %60'lık lineer poliakrilamid-DNA konjugasyonundan, %40 akrilamid stok çözeltisi kullanılarak 1:1 molar oranda karıştırılan aptamer ve DNA iplik çözeltileri ile 25°C'de aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojeli sentezi tamamlanmıştır. Bunlara ek olarak, aptamer dizisi ile DNA iplik arasındaki eşlenik bölgenin uzunluğunun stabiliteyi artırdığı sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler – Aptamer, DNA hidrojel, kloramfenikol

Optimization of Synthesis Conditions of Chloramphenicol Aptamer- Functionalized DNA Hydrogels

¹Department of Bioengineering, Faculty of Engineering, Karamanoğlu Mehmetbey University, Karaman, Turkey

Article History

Received: 07.09.2022

Accepted: 20.10.2022

Published: 05.03.2023

Research Article

Abstract – Aptamer-functionalized DNA hydrogels are used in many fields due to their high specificity, stability and flexibility. In this study, the synthesis of chloramphenicol-specific aptamer sequence functionalized DNA hydrogel was performed and certain parameters for hydrogel stability were optimized. For the synthesis, the 5' ends of the acrydite modified chloramphenicol-specific aptamer and the partially conjugated DNA strand were attached to the polymer structure as a side branch and held together by hybridization of the complementary regions, hydrogel synthesis was carried out. The optimized parameters were the concentrations of acrydite-modified DNA sequences, the percentage of acrylamide, the molar ratios of linear polymer solutions containing chloramphenicol aptamer and DNA strand 1. In addition, the effects of reaction temperature and the length of the complementary region on gel stability were evaluated. As a result, aptamer-functionalized DNA hydrogel synthesis was completed at 25°C with aptamer and DNA strand solutions mixed in 1:1 molar ratio using 40% acrylamide stock solution from 60% linear polyacrylamide-DNA conjugation for DNA hydrogel stability. In addition, it was concluded that the length of the conjugate region between the aptamer sequence and the DNA strand increases stability.

Keywords – Aptamer, DNA hydrogel, chloramphenicol

¹ camizci.gulnur@gmail.com

² cerenbayrac@gmail.com

*Sorumlu Yazar

1. Giriş

Aptamerler çok çeşitli hedeflere yüksek bağlanma etkinliği ve özgünlüğü gösteren DNA ve RNA molekülleridir (Bayrac vd., 2011). Latince kökenli olan bu kelime ‘uygun olmak’ anlamına gelmektedir (Famulok, 1994). Küçük organik veya inorganik moleküller (Bruno, Carrillo, ve Philips, 2008), büyük protein kompleksleri (Tuerk ve Gold, 1990; Takahashi, 2018), bakteri ya da insan hücreleri ((Bayrac vd., 2011; Bayraç, Eyidoğan, ve Öktem, 2017), ilaçlar (Ferguson vd., 2013) aptamer seçilimi için hedef molekül olabilirler. İlk olarak 1990’lı yıllarda birbirlerinden bağımsız 3 farklı çalışma grubu tarafından geliştirilen aptamerler (Robertson ve Joyce, 1990, Tuerk ve Gold, 1990, Ellington ve Szostak, 1990) bir in vitro seçme ve çoğaltma tekniği olan SELEX (üssel zenginleştirme ile ligandların sistematik evrimi- Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) yöntemi ile üretilirler (Tuerk ve Gold, 1990). Bu yöntemde primer bağlanma bölgeleri arasında rastgele nükleotid dağılımı ile tasarlanmış oligonükleotid kütüphanesi içinden birbirini takip eden eleme ve seçme basamakları aracılığıyla hedef moleküle yüksek bağlanma afinitesi gösteren diziler belirlenir. Sahip olduğu üç boyutlu yapıları nedeniyle hedef moleküle karşı yüksek seçicilik gösterme özellikleri, sentetik olarak kolay üretilmeleri, çeşitli ortam şartlarına karşı stabil olmaları ve modifikasyona açık olmaları nedeniyle aptamerler günümüzde bakteri parazit ve mantarların neden olduğu hastalıkların ya da kanserin teşhisinde, gıdalarda patojen, toksin, ağır metal gibi bulaşanların tespitinde, moleküler görüntüleme, ilaç taşınımında ve biyosensörlerin tanıma ajanı olarak tespit yöntemlerinde kullanılmaktadır (Bayraç vd., 2017). Aptamerlerin mevcut biyosensör sistemlerine adaptasyonları ve yeni tanı sistemlerinin geliştirilmesi 2000’li yıllarla birlikte gıda alanında oldukça hız kazanmıştır. *Escherichia coli* O111 (Luo vd., 2012), *Salmonella* Enteritidis (Bayraç vd., 2017), *Salmonella* Typhimurium (Ma vd., 2014) gibi gıda patojenlerine, lizozim (Ocaña vd., 2015), gluten (Amaya-González, de-Los-Santos-Álvarez, Miranda-Ordieres, ve Lobo-Castañón, 2015), ara h1 fıstık proteini (Trashin, de Jong, Breugelmans, Pilehvar, ve De Wael, 2015) gibi gıda alerjenlere, okratoksin A (Mishra, Hayat, Catanante, Ocaña, ve Marty, 2015), aflatoksin B1 (Castillo vd., 2015) aflatoksin M1 (Istamboulié vd., 2016) gibi mikotoksinlere, tetrasiklin (Guo, Wang, ve Sun, 2015), ve kanamisin (Sun, Li, Shen, Huang, ve Wang, 2014) gibi antibiyotiklere karşı aptamer tabanlı biyosensör geliştirme çalışmaları literatürde mevcuttur.

Hidrojeller yüksek su tutma kapasiteleri, sentetik ya da doğal polimerlerden sentezlenebilmeleri özellikleriyle hidrofilik polimer yapılarıdır (Abune, Davis, ve Wang, 2021). Çeşitli modifikasyonlarla hedef molekülleri yüksek özgünlükte tanıyabilen polimer haline çevrilebilir ve böylece moleküler tanımlama, ilaç taşıma, hücre yakalama ve doku tedavisinde kullanım alanı bulmuşlardır (Zhu vd., 2010; Zhang, Chen, Li, Battig, ve Wang, 2012; Zhang, Lei, Liu, Li, ve Ju, 2013; Kim, Shon, Miao, Lee, ve Oh, 2016). Örneğin, 2003 yılında yapılan bir çalışmada büyüme hormonu ile fonksiyonlandırılmış hidrojeller ekstraselüler matriks gibi davranarak hücre migrasyonunda görev aldığı gösterilmiştir (Gobin ve West, 2003). Deforest ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada (2010) ise peptit ile fonksiyonlandırılmış hidrojeller kullanılarak üç boyutlu hücre kültürü çalışması gerçekleştirilmiştir. Her ne kadar antikorlar, büyüme faktörleri, polisakkaritler ve peptitler kullanımıyla hidrojelere moleküler tanıma özelliği kazandırılmış olsa da, bu moleküllerin düşük bağlanma afiniteleri, çeşitli ortam şartlarında stabiliteilerinin az olması ve kovalent bağlanma yerine çoğu zaman elektrostatik etkileşimlerle hedef moleküle bağlanmaları nedeniyle, bu moleküllere alternatif ligandlara ihtiyaç duyulmaktadır (Belair, Le, ve Murphy, 2014; Mitchell, Briquez, Hubbell, ve Cochran, 2016; He vd., 2019). Bu anlamda nükleik asit aptamerleri yüksek afinite ile hedefe bağlanabilme, yüksek stabilite ve sentetik olarak temin edilebilme özellikleri nedeniyle hidrojel fonksiyonlandırma çalışmalarında günümüzde sıklıkla tercih edilen molekül haline gelmişlerdir (Abune vd., 2021).

Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojelere ilk örnek Yang ve arkadaşları tarafından 2008 yılında adenozin aptameri ile sentezlenen hidrojeldir. Sentez esnasında jelle hapsedilen altın nanoparçacıklar hedef molekül olan adenozin varlığında jel yapının bozularak sıvı hale geçmesiyle serbest kalmış ve adenozin tespiti sağlamıştır (Yang, Liu, Kang, ve Tan 2008). Aptamerler fonksiyonlandırılmış hidrojeller kokain (Yin, Ye, Wang, Zhu, ve Tan, 2012), şeker (Yan vd., 2013) ve virüs MT32 proteini (Bai ve Spivak, 2014) tespiti için de oluşturulmuştur. DNA hidrojelleri enzim ya da çeşitli motifler varlığında kendi kendine çapraz bağlar kurarak sentezlenebildiği gibi hidrofobik polimerlere yan dalların oluşumuna sebep olacak DNA moleküllerinin eklenmesi ile de sentezlenebilir (Li vd., 2016). İlk olarak 1996 yılında Nagahara ve Matsuda’nın yayınladığı çalışmada görülen ve sonrasında birçok çalışmada belirtilen sentez yönteminde 5’ uçları akrilit mofidiyeli iki tek sarmal DNA molekülleri akrilamid, APS ve TEMED ile polimerleşerek lineer polimer zinciri oluşturmuşlardır. Bu lineer polimerler ya birbirlerine eşlenik bölgelerinden bağlanarak bir araya gelir ya da bu iki diziyeye eşlenik çapraz bağlayıcı bir oligonükleotid ile bir araya getirilerek hidrojel sentezi gerçekleştirilir. DNA

hidrojellerinin sentez yolları farklılık gösterse de yüksek stabilite ve esneklik özellikleri bu jellerin tespit, çevresel analizler, kontrollü ilaç salınımı, hücre tutunması ve kanser terapisinde kullanımını sağlamıştır (Morya, Walia, Mandal, Ghoroi, ve Bhatia, 2020). Bu çalışmada kloramfenikole özgü aptamer dizisi ile ona kısmen eşlenik DNA dizisi ile lineer polimerler oluşturularak eşlenik bölgelerinde oluşan hibridizasyon ile bir araya getirilmiş ve aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojel sentezlenmiştir.

Kloramfenikol (2,2-dichloro-N-[1,3-dihydroxy-1-(4-nitrophenyl)propan-2-yl]acetamide) gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı etkili geniş spektrumlu bir antibiyotiktir (Dasgupta, 2012). Antibiyotiğin etki mekanizması; bakterilerde 50 S ribozomal alt birime bağlanarak peptidil transferaz enzim aktivitesinin engellenmesi ve translasyon basamağında uzayan peptit zincire amino asidin eklenememesi sonucu protein sentezinin durmasıdır (Van Bambeke, Mingeot-Leclercq, Glupczynski, Tulkens, 2017). Kloramfenikol ucuz ve kolay üretimi nedeniyle hem insan hem de hayvan sağlığı için kullanılan antibiyotikler arasındadır. Bununla beraber, yapılan çalışmalar sonucunda gri bebek sendromu, lösemi, aplastik anemi ve kemik iliği baskılanması gibi birçok hastalıkta etken olduğu belirtilmiştir (Wilson ve Cockerill, 1987; Liu, Yan, Okoth, ve Zhang, 2015). Bu nedenle, kloramfenikol Avrupa Birliği ülkelerinde hayvansal kaynaklı gıdalarda (et, süt, yumurta ve bal) bulunması sınırlandırılmış (maksimum kalıntı limitini 0,3 ng/g) (Karaseva ve Ermolaeva, 2012), ülkemizde ise “Türk Gıda Kodeksi Hayvansal Gıdalarda Bulunabilecek Farmakolojik Aktif Maddelerin Sınıflandırılması ve Maksimum Kalıntı Limitleri Yönetmeliği”nde yasaklı madde olarak belirtilmiştir (T.C. Gıda, Tarım ve Hayvancılık Bakanlığı, 2017). Kloramfenikol tespitinde yaygın olarak kullanılan yöntemler gaz kromatografi (GC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) ve sıvı kromatografisi-kütle spektroskopisi (LC-MS) gibi analitik yöntemlerdir (Pfening vd., 2000; Neuhaus, Hurlbut, ve Hammack, 2002; Mottier, Parisod, Gremaud, Guy, ve Stadler, 2003; Dumont, Huet, Traynor, Elliot, ve Delahaut, 2006; Park ve Kim, 2006; Rodziewucz vd., 2007; Yuan, Oliver, Aguilar, ve Wu, 2008; Dong vd., 2009; Mamani, Reyes, ve Ratha, 2009; Zhao ve Ball, 2009; Tajik vd., 2010; Karaseva ve Ermolaeva, 2012). Bununla beraber, hızlı sonuç veren, düşük maliyetli, ön numune hazırlıklarına ihtiyaç duymayan ve kolay uygulanabilen alternatif yöntemlerin geliştirilmesine ihtiyaç duyulmaktadır.

Bu çalışma kloramfenikol tespiti için aptamer fonksiyonlaştırılmış DNA hidrojel tabanlı biyosensör sisteminin geliştirilmesi için hidrojel sentez basamağında yapılan optimizasyon basamaklarını açıklamaktadır. DNA hidrojel yapısının formu ve stabilitesi için akrilit modifiyeli DNA dizilerinin konsantrasyonları, akrilamid yüzdesi, kloramfenikol aptameri ve DNA iplik içeren lineer polimer çözeltilerin molar oranları optimize edilmiş, reaksiyon sıcaklığı ve eşlenik bölgenin uzunluğunun jel stabilitesine etkisi değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Yöntem

2.1. Materyaller

Çalışmada kullanılan oligonükleotidler Integrated DNA Technologies (Coralville, ABD) firmasından temin edilmiştir. 5’ucu akrilit modifiyeli 40 baz uzunluğunda kloramfenikol aptameri (Mehta vd., 2011) ile ona kısmen eşlenik ve 5’ucu akrilit modifiyeli 21 baz uzunluğunda DNA iplik dizisi son konsantrasyonu 300 µM olacak şekilde çözülerek -20°C’de saklanmıştır. Bu oligonükleotidlere ait sentez sonrası bilgiler Tablo 1’de sunulmuştur. Kloramfenikol, akrilamid (%99), amonyum persülfat (APS), N,N,N,N’- tetrametiletilediamin (TEMED) (%99) Sigma-Aldrich firmasından temin edilmiştir (St. Louis, ABD) ve uygun şartlarda saklanmıştır.

2.2. DNA Hidrojel Sentezi

Deneyde 5’ uçları akrilit modifiyeli kloramfenikol aptameri ve ona kısmen eşlenik DNA ipliği Tris-EDTA (TE) tampon çözeltisinde çözülmüş ve ayrı stok çözeltiler olarak 4°C’ de muhafaza edilmiştir. Aptamer ve DNA iplik çözeltileri, lineer polimer çözeltisi ve hidrojel için gereken malzemeler ve yüzde içerik değerleri aşağıda sırasıyla belirtilmiştir. Bu değerler çalışmanın ilerleyen basamaklarında optimize edilmiştir.

Aptamer ve DNA iplik çözeltileri;

- %60 aptamer veya DNA ipliği stok çözeltisi (her bir oligonükleotid için ayrı hazırlanacak),
- %10 akrilamid çözeltisi (%40 akrilamid çözeltisinden),
- %10 TE tampon çözeltisi (pH 8),
- %20 steril distile su

karıştırılarak içerisinde kalabilecek havayı uzaklaştırmak için desikatörde 5 dakika vakuma maruz bırakılmıştır.

Lineer polimer çözeltileri;

- Aptamer ve DNA iplik çözeltisi (her biri için ayrı hazırlanmıştır),
- %1.4 polimerizasyon başlatıcı ve hızlandırıcı çözelti (taze hazırlanmış %10 (a/h) APS ve %10 (h/h) TEMED karışımından)

karıştırılarak tekrar desikatörde polimerizasyon işleminin gerçekleşmesi için 20 dakika kadar bekletilmiştir. Hidrojel sentezi için 1:1 molar oranda aptamer lineer polimer çözeltisi ve DNA ipliği lineer polimer çözeltisi karıştırılarak 25°C sıcaklıkta 120 dakika inkübasyona bırakılmıştır. Bu basamakta; hidrojel oluşturulan lineer polimer çözeltilerinin molar içeriği optimize edilmiştir. Bunun için; farklı konsantrasyonlarda hazırlanan lineer polimer çözeltiler farklı molar oranlarda karıştırılarak hidrojin oluşması için optimum konsantrasyonlar belirlenmiştir. Ayrıca, sıcaklık optimizasyonu için 25, 45, 55 ve 65°C’de hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir.

3. Bulgular ve Tartışma

3.1. Oligonükleotid Tasarımı

DNA hidrojel sentezlemek için kullanılan aptamer dizisi Mehta ve ark. tarafından 2011 yılında yayınlanan çalışmadan alınan kloramfenikole özgü seçilmiş DNA aptamer dizisidir. Bu dizi 40 baz uzunluğunda rastgele bölgeye sahip bir DNA kütüphanesinden 8 turluk bir zenginleşme sonucu elde edilen, 0.77 µM Kd değerine sahip ve yüksek özgünlükle kloramfenikole bağlanan bir dizidir (Mehta vd., 2011). Literatürde kloramfenikol için iki aptamer geliştirme çalışması bulunmasına rağmen (Duan vd., 2016; Mehta vd., 2011), kloramfenikol tespiti için geliştirilen biyosensör çalışmalarında sıklıkla bu dizi kullanıldığından bu çalışmada da bu dizi kullanılmıştır (Yadav, Agrawal, Chandra, ve Goyal, 2014; Miao vd., 2015; Liu vd., 2015; Miao vd., 2016). Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojin sentezlenebilmesi için gerekli olan diğer dizi bu çalışma kapsamında kloramfenikol aptamer dizisine kısmen eşlenik olarak tasarlanmıştır. DNA iplik 1 olarak isimlendirilen bu dizi 21 baz uzunluğunda ve aptamere 15 baz uzunluğunda eşlenik bir bölgeye sahip DNA molekülüdür. Bu iki DNA molekülüne ait bilgiler Tablo 1’de belirtilmiştir. Her iki dizinin 5’ uçlarında bulunan akrilit modifikasyonu sayesinde her iki DNA dizisi lineer polimer hale getirilmiş ve daha sonra eşlenik bölgelerin bir araya gelmesiyle polimer sentezi tamamlanmıştır.

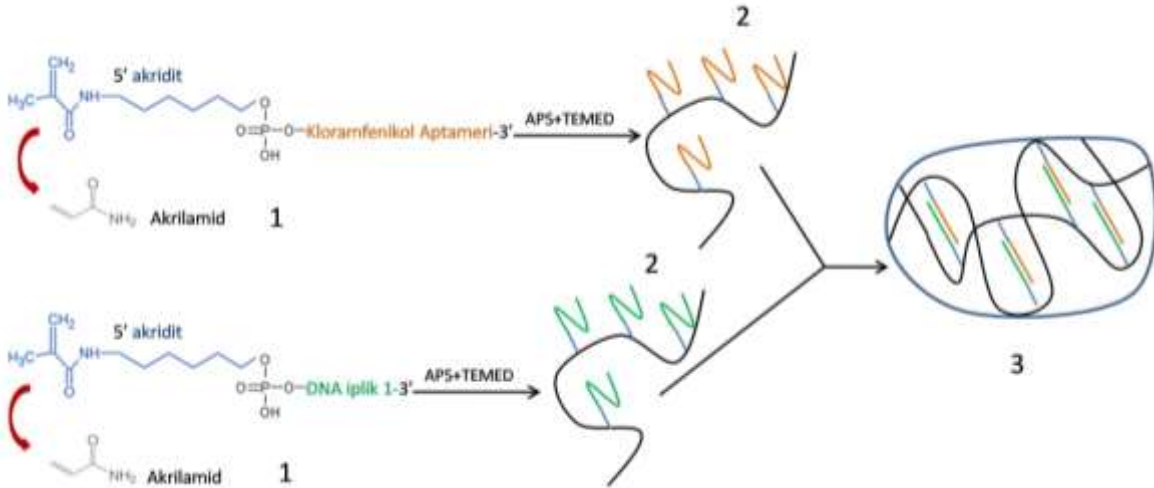
Tablo 1
Oligonükleotidlerin özellikleri

	Kloramfenikol aptameri*	DNA iplik-1*
Dizisi	5'-acryd-TTTT- TACTTCAGTGAGTT- GTCCACGGTCGG- CGAGTCGGTGGTAG-3'	5'-acryd-TTTTTTGGGA- CAACTCACTG-3'
Moleküler ağırlık	14,168.2 g/mol	6,345.2 g/mol
GC içeriği	%53.3	%40.0
Erime sıcaklığı (T _m)	69.4 °C	51.0 °C
En düşük katlanma serbest enerji (25°C'de)	-2.21 kcal/mol	-0.83 kcal/mol
En güçlü katlanmanın erime sıcaklığı	40.4°C	41.2°C

*Dizilerdeki altı çizili bölgeler kloramfenikol aptameri ile DNA iplik 1 arasındaki eşleşme bölgeleri, koyu olarak gösterilen bölge ise aptamer dizisini belirtmektedir.

3.2. DNA Hidrojel Sentezi

Bu çalışmada hidrojel sentezi; Şekil 1'de özetlendi gibi (i) 5' uçları akrilit modifiyeli kloramfenikol aptameri ve DNA iplik-1 dizisinin ortama eklenen APS ve TEMED ile lineer polimer DNA ipliklerine dönüştürülmesi, (ii) ve elde edilen bu iki lineer polimerin eşleşme bölgelerinin hibridizasyonu ile polimer sentezinin tamamlanmasını içermektedir. DNA molekülünün 5' ucunda bulunan akrilit modifikasyonu serbest akrilamid monomeri gibi davranarak DNA molekülünü lineer polimer yapıya yüksek verimde ekleme özelliğine sahiptir (Liu, 2011). Bu aşamalarla sentezlenen DNA hidrojelinin sentez esnasında aptamer ve DNA ipliği çözeltilerinde yüzde DNA içerikleri, yüzde akrilamid içeriği, lineer polimer çözeltilerin molar oranları ayrı ayrı optimize edilmiş, sıcaklığın ve eşleşme bölge uzunluğunun jelleşmeye etkisi değerlendirilmiştir.



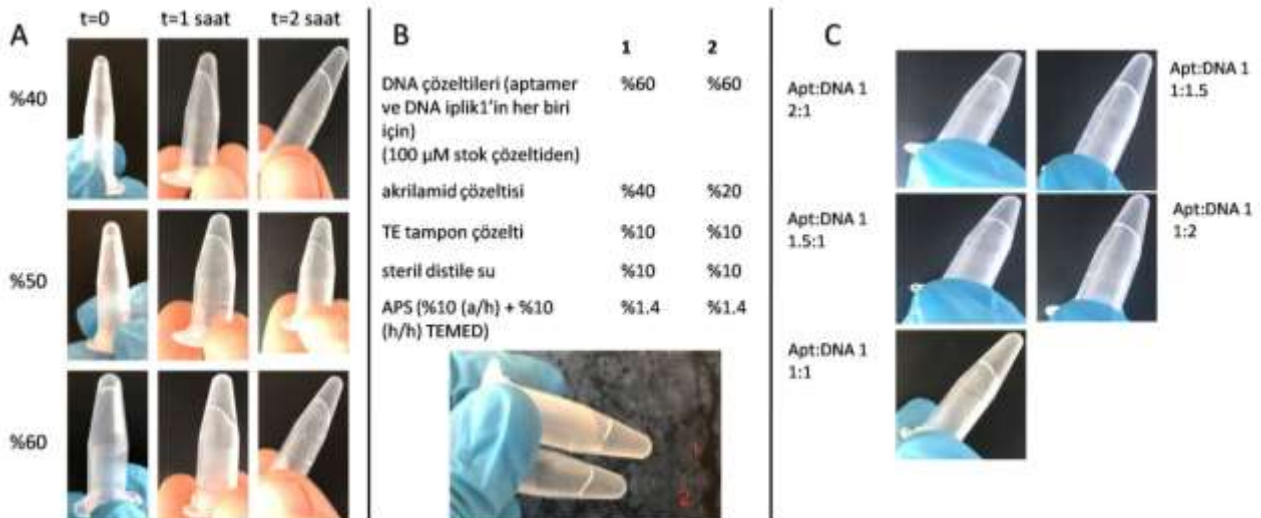
Şekil 1. Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojellerinin sentezi; 1) 5' ucu akrilit modifiyeli ve kloramfenikol aptamerine kısmen eşleşme DNA ipliği 1 ile yine 5' ucu akrilit modifiyeli kloramfenikol aptameri akrilamid, APS ve TEMED varlığında lineer polimer DNA ipliklerine dönüştürülür. 2) Bu iki lineer polimer, aptamer ve DNA ipliğinin eşleşme bölgelerinin hibridizasyonu ile bir araya getirilerek polimer sentezi gerçekleştirilmiş olur. 3) Sonuç olarak; aptamer bağlayıcılı DNA hidrojelinin sentezi tamamlanmış olur.

İlk olarak akrilit modifiyeli DNA dizilerinin konsantrasyonları optimize edilmiştir. Lineer polimer hale getirilmiş DNA molekülünün konsantrasyonu doğrudan DNA hidrojelinin oluşumunu etkilediği için DNA konsantrasyon etkisi değerlendirilmiştir. DNA içeriği %40 ile %60 arasında değişen çözeltiler hazırlanmış, %20'lik akrilamid çözeltisi, APS ve TEMED'in ortama eklenmesiyle lineer polimer çözeltiler oluşturulmuştur. Oluşturulan lineer çözeltiler 1:1 molar oranda karıştırılarak 25°C'de reaksiyona bırakılmıştır. Reaksiyon süresi sonunda elde edilen jelleşme durumları tüplerin resimleri çekilerek değerlendirilmiştir. Şekil 2A'da görüldüğü gibi 1 saatin sonunda aptamer ve DNA iplik içerikleri %60 olan çözeltilerin 1:1 molar oranda karıştırılması ile

oluşturulan örnekte jelleşmenin başladığı ve 2. saatin sonunda diğer örnekler göre daha katı bir jel oluşumu gözlenmiştir. Literatürde bakıldığında, lineer çözeltilerde DNA yüzdesinin artırılmasıyla birbirine daha yakın ve daha sıkı bir ağ yapının elde edilmesi beklenmektedir (Liu, Han, Pei, ve Du, 2018). Bu çalışmadan alınan sonuçlara bakıldığında %60'lık DNA çözeltileri ile oluşturulan jellerde jelleşme daha fazla elde edildiğinden ilerleyen çalışmalarda DNA çözeltilerinin içeriği %60 olarak hazırlanmıştır. DNA içeriği %60'dan fazla lineer çözeltiler ile daha katı jelleşmenin elde edilmesi olası bir sonuç olarak değerlendirilmiştir, fakat DNA içeriğinin artmasıyla jel sentez maliyetinde de artış olacağından en yüksek %60 DNA içeriği denenmiş ve uygun değer olarak belirlenmiştir.

Akrilamid çözeltisinin yüzde konsantrasyon değişiminin jel oluşumuna etkisini görmek amacıyla akrilamid yüzdesi %20 ve %40 olarak hazırlanmış ve %60'lık DNA içerikleriyle DNA hidrojel sentezi tekrarlanmıştır. Reaksiyon süresi sonunda elde edilen jel görüntüleri Şekil 2B'de sunulmuştur. Akrilamid yüzdesinin %20'den daha düşük yüzdelere indirilmesiyle yumuşak ve kolaylıkla parçalanabilen jeller elde edilmiş ve bu nedenle deneyde en düşük akrilamid yüzdesi %20 olarak belirlenmiştir. Görüntülerden anlaşıldığı üzere %40 akrilamid çözeltisinden hazırlanan jel daha katı hale görülmüştür. Bunun nedeni olarak; akrilamid konsantrasyonunun artmasıyla jelin daha küçük gözenekli yapı kazanması ve dolayısıyla daha katı olması durumu düşünülmektedir. Dolayısıyla, bu çalışmadan sonra yapılan tüm deneylerde jel sentezi için %40 akrilamid çözeltisi kullanılmıştır.

DNA ve akrilamid yüzde içeriklerine ek olarak, kloramfenikol aptameri ve DNA iplik 1 içeren lineer polimer çözeltilerin karıştırılmasında molar oranların jelleşmeye etkisi değerlendirilmiştir. Bu amaçla aptamer çözeltisi:DNA iplik çözeltisi 2:1, 1.5:1, 1:1, 1:1.5 ve 1:2 molar oranlarında hazırlanmıştır ve reaksiyon sonunda jellere ait görüntüler elde edilmiştir. Bu çalışmada tasarlanan DNA hidrojel aptamer dizisi ile DNA iplik 1 dizisinin hibridizasyonu sonucu olduğundan 1:1 molar oranda hazırlanan jelin diğerlerine göre daha sıkı olacağı beklenilmiştir. Şekil 2C'de görüldüğü üzere 1:1 molar oran dışında hazırlanan diğer jel örneklerinde hem jelleşme daha yavaş olmuş hem de 2 saatin sonunda daha yumuşak jeller elde edilmiştir. Eşit molar oranda hazırlanan jelde ise daha hızlı ve daha katı jel oluşumu gözlenmiştir. Bunun nedeni olarak 1:1 molar oranda karıştırıldıklarında oluşan hidrojin hibridizasyon doygunluğuna ve dengesine ulaştığı ve bu nedenle daha sıkı ya da katı bir jel elde edildiği düşünülmüştür. Elde edilen sonuçlar literatürdeki bazı çalışmalarla uyum göstermiştir. Örneğin; 2016 yılında yayınlanan bir çalışmada monomerler arası düşük molar oranda sentezlenen jellerin çapraz bağlanma verimindeki azalma nedeniyle sertliklerinde azalma görülmüş ve bu durum ortamda yüksek miktarda bulunan hibridize olmamış tek sarmal DNA'dan kaynaklandığı belirtilmiştir (Jiang, Pan, Vi-vek, Weeks, ve Ke, 2016).

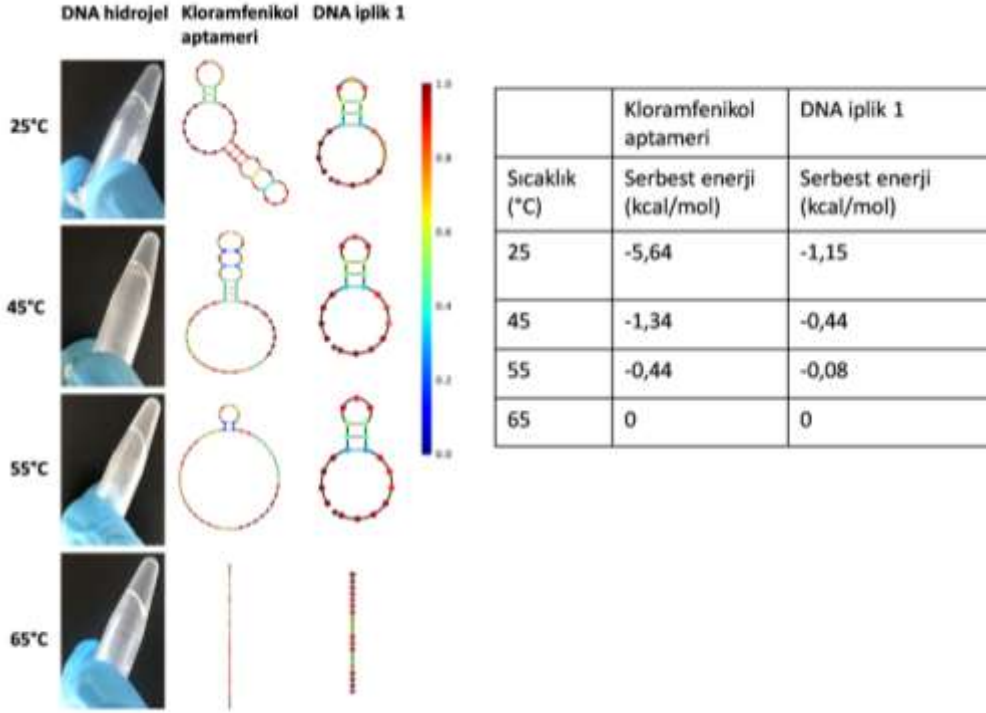


Şekil 2. Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojel sentez koşullarının optimizasyonu; A) akrilamid modifiyeli DNA dizilerinin yüzde içeriklerinin, B) akrilamid ana çözelti yüzdesinin, C) aptamer ve DNA iplik ile hazırlanmış lineer polimer çözeltilerinin molar oranlarının optimizasyonuna ait resimler.

DNA hidrojellerinin stabilitesinde sıcaklık etkeni önemli rol oynamaktadır. Sıcaklığın polimer yapı içerisinde farklı oranlarda bulunan hidrofilik ve hidrofobik kısımların arasındaki ilişkiyi değiştirdiği ve böylece çapraz bağlı ağ yapının çözünürlüğünde değişimin meydana geldiği ve katı-jel form değişiminin yaşandığı bilinmektedir (Bajpai, Shukla, Bhanu, ve Kankane, 2008; Huang vd., 2019). DNA molekülünün çapraz bağlayıcı olarak görev aldığı hidrojellerde sıcaklık faktörünün etkili olmasının sebebi bazlar arası eşleşme stabilitesinin sıcaklıkla beraber değişmesidir. Sentezde kullanılacak DNA moleküllerinin %GC içeriklerinin ve uzunluğunun değiştirilmesiyle hidrojel için istenilen erime sıcaklığı (T_m) elde edilebilir. Erime sıcaklığından daha yüksek sıcaklıklarda DNA molekülleri arasındaki hidrojen bağları kırılır ve DNA molekülleri birbirinden ayrılır. Bu denatürasyon basamağı tersinir bir reaksiyon olduğundan sıcaklık yavaşça düşürüldüğünde hidrojen bağları iki dizi arasında tekrar oluşarak jel oluşumu tekrar gözlenir. Literatürde bu tersinir özellikten yararlanarak tasarlanmış DNA hidrojel çalışmaları bulunmaktadır. 2011 yılında yayınlanan bir çalışmada içerisine kanser ilacı yüklenerek DNA ve poliakrilamitten sentezlenmiş hidrojel ilgili hedef bölgeye yönlendirilerek sıcaklığın artırılmasıyla ilacın salınımı sağlanmıştır (Kang vd., 2011). Çalışmada erime sıcaklığından daha yüksek bir sıcaklıkta hidrojinin yapısında bulunan DNA molekülleri arasındaki hidrojen bağlarının ayrılması ve böylece bozulan jel yapıdan ilacın serbest hale gelmesi sağlanmıştır.

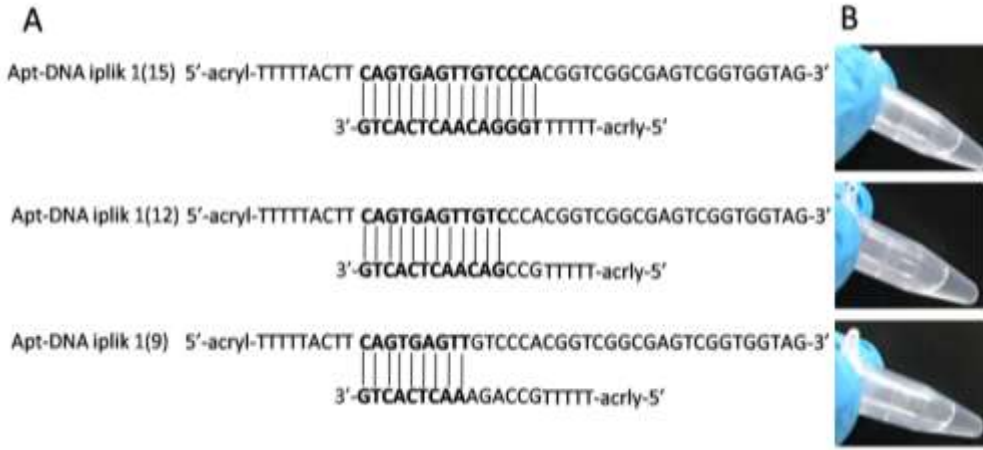
Bu çalışmada kloramfenikol aptameri ve DNA iplik 1 arasındaki eşlenik bölgeden çift sarmal yapı oluşarak amin bazlarının istiflenmesi ve aralarındaki hidrojen bağı nedeniyle kararlı bir yapıya sahip olması sağlanmıştır. Farklı sıcaklıkların bu yapıya etkisini değerlendirmek amacıyla DNA hidrojinin sentezi farklı sıcaklıklarda gerçekleştirilmiştir. Tablo 1’de belirtildiği üzere kloramfenikol aptamerinin hem uzunluğu hem de % GC içeriği DNA iplik 1’den fazla olduğu için T_m değeri de DNA ipliğine göre daha yüksektir. Bu dizilerin en güçlü ikincil yapılarının erime sıcaklıklarına bakıldığında ise kloramfenikol aptameri ve DNA iplik 1 için sırasıyla 40.4°C ve 41.2 °C olarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden yola çıkarak 25°C, 45°C, 55°C ve 65°C sıcaklıklar deney koşulları olarak belirlenmiş ve optimize edilen koşullarda jeller hazırlanarak bu sıcaklıklarda iki saatlik inkübasyona bırakılmıştır. Şekil 3’de belirlenen koşullarda sentezlenen DNA hidrojellerine ait resimler sunulmuştur. Görsellerin yanı sıra dört farklı sıcaklıkta kloramfenikol aptameri ve DNA iplik-1’in NUPACK yazılımı (www.nupack.org; Zadeh vd., 2011) ile çizilen ikincil yapıları ve bu yapıların serbest enerjileri gösterilmiştir.

Bu sonuçlardan 25°C ve 45°C sentezlenen jellerin diğer jellere göre daha katı forma sahip olduğu görülmüştür. Her iki sıcaklıkta da katı formda jel elde edilse de, 45°C’de örnek hacmi buharlaşma nedeniyle azalmıştır. Yüksek sıcaklıklarda kloramfenikol aptamer dizisi ile DNA iplik 1 dizisi arasındaki 15 bazlık eşleşen bölgedeki hidrojen bağlarının stabil olmaması nedeniyle yumuşak formda, tam jelleşmeyen örnekler elde edilmiştir. Ayrıca serbest enerjilerine bakıldığında en yüksek serbest enerjisiyle 65°C’deki DNA’ların ikincil yapı oluşturma durumları en az olarak değerlendirilmiştir. Bu nedenle DNA hidrojel sentezi için uygun ortam sıcaklığı 25°C olarak belirlenmiştir. Sentez için kullanılan kloramfenikol aptamer ve DNA iplik 1 dizilerinin tek iplik olarak reaksiyona girmelerini sağlamak adına DNA çözeltileri 50°C’de 5 dakika bekletilmiş ve 1:1 molar oranda lineer çözeltiler karıştırıldıktan sonra inkübasyon sıcaklığı 25°C olarak ayarlanmıştır.



Şekil 3. Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojel stabilitesinde sıcaklık etkisi (dizilere ait farklı sıcaklıklardaki iki boyutlu yapılar NUPACK yazılımı ile oluşturulmuştur. Renkli gösterge 0-1 arasında denge olasılığını göstermektedir).

Son olarak, kloramfenikol aptamer dizisi ve DNA iplik 1 arasındaki eşlenik bölgenin uzunluğunun jel stabilitesine etkisi değerlendirilmiştir. Bu aşamaya kadar yapılan tüm optimizasyon çalışmalarında iki dizi arasındaki eşlenik bölgesi 15 baz uzunluğunda olan DNA ipliği kullanılmıştır. Bu aşamada ise, kloramfenikol aptamerine farklı uzunlukta eşlenik bölgeye sahip iki adet DNA ipliği daha tasarlanmıştır ve yukarıda belirtilen optimum koşullarda DNA hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. Toplam 21 baz uzunluğunda olan DNA iplikleri aptamer dizisine sırasıyla 15, 12 ve 9 baz uzunluğunda eşlenik bölgeye sahip olarak tasarlanmıştır (Şekil 4A). Sentez reaksiyonunun 2. saatinde 15 bazlık eşlenik bölgeye sahip DNA iplik 1(15) dizisi ile sentezlenen jelin 12 ve 9 bazlık eşlenik bölgeye sahip DNA dizileri ile sentezlenen jellerden daha katı olduğu görülmüştür (Şekil 4B). Aptamer ve DNA ipliklerinin lineer polimer haline getirilmesi ve bu iki lineer yapının eşlenik bölgelerinden birbirilerine bağlanması sonucu oluşan DNA hidrojel için baz eşleşme bölgesinin uzun olması daha stabil bir hidrojel sentezine yol açtığı düşünülmüştür. Eşlenik bölgenin kısaltılması iki dizi arasında oluşacak hidrojen bağlarının azlığı nedeniyle daha gevşek jeller oluşmasına neden olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, eşlenik bölgenin kısaltılması jelin katılaşmasını ve stabilitesinin azalttığından 15 baz eşlenik bölgeye sahip DNA iplik-1'in sentezde kullanılmasına karar verilmiştir.



Şekil 4. Aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojel stabilitesinde eşlenik bölge uzunluğunun etkisi; A) iki dizi arasındaki eşlenik bölgelerin gösterimi, B) farklı eşlenik bölgeye sahip DNA iplik ile sentezlenen DNA hidrojel görüntüleri

4. Sonuçlar

Bu çalışma aptamer fonksiyonlandırılmış DNA hidrojel sentezi için gerekli optimizasyon basamaklarını belirten ve sıcaklık ve eşlenik bölge uzunluğu gibi parametrelerin hidrojel stabilitesi üzerindeki etkisini açıklayan bir çalışmadır. Temel olarak; kloramfenikol antibiyotikine özgü belirlenmiş aptamer dizisi ile ona kısmen eşlenik DNA iplik dizisinin kullanıldığı DNA hidrojel sentezi gerçekleştirilmiştir. 5' uçlarından akrilit modifiyeli aptamer ve DNA ipliğin akrilamid, APS ve TEMED ile önce polimer yapıya katılması sağlanmış daha sonra birbirlerine eşlenik bölgeden bağlanarak hidrojel sentezi tamamlanmıştır. Daha katı ve stabil jel sentezi için DNA içeriği, akrilamid içeriği ve molar oranlarını belirlemeye yönelik optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Belirlenen optimum koşullar altında yüksek stabiliteli DNA hidrojel sentezi tamamlanmış ve ilerleyen çalışmalarda kloramfenikol tespiti için biyosensör uygulamasına yönelik ön veriler elde edilmiştir.

Teşekkür

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK) tarafından desteklenmiştir. (Proje No: 218Z125).

Yazar Katkıları

Gülnur Camızcı Aran: Analizi planlamış, tasarlamış ve analizi yapmıştır.

Ceren Bayraç: Çalışmanın sonuçlarını değerlendirmiş ve makaleyi yazmıştır.

Çıkar Çatışması

Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Kaynaklar

- Abune, L., Davis, B., ve Wang, Y. (2021). Aptamer-functionalized hydrogels: An emerging class of biomaterials for protein delivery, cell capture, regenerative medicine, and molecular biosensing. *Wires Nanomedicine and nanobiotechnology*, 13, 6, e1731. Doi:<https://doi.org/10.1002/wnan.1731>
- Amaya-González, S., de-Los-Santos-Álvarez, N., Miranda-Ordieres, A.J., ve Lobo-Castañón, M.J. (2015). Sensitive gluten determination in gluten-free foods by an electrochemical aptamer-based assay. *Anal Bioanal Chem.*, 407, 20, 6021-9. Doi:<https://doi.org/10.1007/s00216-015-8771-6>
- Bai, W., ve Spivak, D. A. (2014). A Double-Imprinted Diffraction-Grating Sensor Based on a Virus Responsive Super Aptamer Hydrogel Derived from an Impure Extract. *Angew. Chem., Int. Ed.*, 53, 2095–2098. <https://doi.org/10.1002/ange.201309462>

- Bajpai, A.K., Shukla, S.K., Bhanu, S., ve Kankane, S. (2008). Responsive polymers in controlled drug delivery Prog. Polym. Sci., 33, 1088-1118. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2008.07.005>
- Bayrac, A.T., Sefah, K., Parekh, P., Bayrac, C., Gulbakan, B., Oktem, H.A., ve Tan, W. (2011). In Vitro Selection of DNA Aptamers to Glioblastoma Multiforme. ACS Chem. Neurosci., 2, 3, 175–181. <https://doi.org/10.1021/cn100114k>
- Bayrac, C., Eyidoğan, F., ve Avni Öktem, H. (2017). DNA aptamer-based colorimetric detection platform for Salmonella Enteritidis, Biosensors and Bioelectronics, 98, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.06.029>
- Belair, D. G., Le, N. N., ve Murphy, W. L. (2014). Design of growth factor sequestering biomaterials. Chemical Communications, 50, 99, 15651–15668. <https://doi.org/10.1039/c4cc04317k>
- Bruno, J.G., Carrillo, M.P., ve Philips, T. (2008). In vitro antibacterial effects of antilipopolysaccharide DNA aptamer-C1qrs complexes. Folia Microbiol (Praha), 53, 4, 295-302. <https://doi.org/10.1007/s12223-008-0046-6>
- Castillo, G., Spinella, K., Poturnayová, A., Šnejdárková, M., Mosiello, L., ve Hianik, T. (2015). Detection of aflatoxin B1 by aptamer-based biosensor using PAMAM dendrimers as immobilization platform. Food Control, 52, 9-18. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.12.008>
- Dasgupta, A. (2012). Chapter 3 - Advances in antibiotic measurement. Advances in Clinical Chemistry, Editör: Makowski, G.S. 56, 75-104, Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-394317-0.00013-3>
- DeForest, C. A., Sims, E. A., ve Anseth, K.S. (2010). Peptide-functionalized click hydrogels with independently tunable mechanics and chemical functionality for 3D cell culture. Chemistry of Materials, 22, 16, 4783–4790. <https://doi.org/10.1021/cm101391y>
- Dong, Z., Huang, G., Xu, S., Deng, C., Zhu, J, Chen, S., Yang, X., ve Zhao, S. (2009). Real-time and label-free detection of chloramphenicol residues with specific molecular interaction, J. Microsc., 234, 255–261. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2009.03175.x>
- Duan Y, Gao Z, Wang L, Wang H, Zhang H, ve Li H. (2016). Selection and Identification of Chloramphenicol-Specific DNA Aptamers by Mag-SELEX. Appl Biochem Biotechnol. 180, 8, 1644-1656. <https://doi.org/10.1007/s12010-016-2193-6>
- Dumont, V., Huet, A. C., Traynor, I., Elliot, C., ve Delahaut, P. (2006). A surface plasmon resonance biosensor assay for the simultaneous determination of thiamphenicol, florfenicol, florfenicol amine and chloramphenicol residues in shrimps, Anal. Chim. Acta. 567, 2, 179–183. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.03.028>
- Ellington, A.D., ve Szostak, J.W. (1990). In vitro selection of RNA molecules that bind specific ligands. Nature, 346, 818–822. <https://doi.org/10.1038/346818a0>
- Famulok, M. (1994). Molecular recognition of amino acids by RNA aptamers: an L-citrulline RNA motif and its evolution into an L-arginine binder, Journal of the American Chemical Society, 116, 1698–1706. <https://doi.org/10.1021/ja00084a010>
- Ferguson, B. S., Hoggarth, D. A., Maliniak, D., Ploense, K., White, R. J., Woodward, N., Hsieh, K., Bonham, A.J., Eisenstein, M., Kippin T.E., Plaxco, K.W., ve Soh, H. T. (2013). Real-time, aptamer-based tracking of circulating therapeutic agents in living animals. Sci. Transl. Med. 5, 213ra165. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007095>
- Gobin, A. S., ve West, J. L. (2003). Effects of epidermal growth factor on fibroblast migration through biomimetic hydrogels. Biotechnology Progress, 19, 6, 1781–1785. <https://doi.org/10.1021/bp0341390>
- Guo, Y., Wang, X., ve Sun, X. (2015). A label-free Electrochemical Aptasensor Based on Electrodeposited Gold Nanoparticles and Methylene Blue for Tetracycline Detection, Int. J. Electrochem. Sci., 10, 4, 3668-3679.
- He, C., Ji, H., Qian, Y., Wang, Q., Liu, X., Zhao, W., ve Zhao, C. (2019). Heparin-based and heparin-inspired hydrogels: Size-effect, gelation and biomedical applications. Journal of Materials Chemistry B, 7,8, 1186–1208. <https://doi.org/10.1039/c8tb02671h>
- Huang, H., Qi, X., Chen, Y., ve Wu Z. (2019). Thermo-sensitive hydrogels for delivering biotherapeutic molecules: A review, Saudi Pharmaceutical Journal, 27, 7, 990-999 <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2019.08.001>
- Istamboulié, G., Paniel, N., Zara, L., Reguillo Granados, L., Barthelmebs, L., ve Noguer, T. (2016). Development of an impedimetric aptasensor for the determination of aflatoxin M1 in milk. Talanta, 146, 464-9. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2015.09.012>

- Jiang, H., Pan, V., Vivek, S., Weeks, E.R., ve Ke, Y. (2016). Programmable DNA Hydrogels Assembled from Multidomain DNA Strands. *ChemBioChem*, 17, 1156 – 1162. Doi: <https://doi.org/10.1002/cbic.201500686>
- Kang, H., Trondoli, A.C., Zhu, G., Chen, Y., Chang, Y.J., Liu, H., Huang, Y.F., Zhang, X., ve Tan, W. (2011). Near-infrared light-responsive core-shell nanogels for targeted drug delivery, *AcsNano.*, 5, 5094-5099. Doi: <https://doi.org/10.1021/nn201171r>
- Karaseva, N. A., ve Ermolaeva, T. N. (2012). A piezoelectric immunosensor for chloramphenicol detection in food. *Talanta*, 93, 44–48. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2011.12.047>
- Kim, M.G., Shon, Y., Miao, W., Lee, J., ve Oh, Y.K. (2016). Biodegradable graphene oxide and polyaptamer DNA hybrid hydrogels for implantable drug deliver. *Carbon*, 105, 14-22. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2016.04.014>
- Li, J., Mo, L., Lu., C.H., Fu, T., Yang, H.H., ve Tan, W. (2016). Functional nucleic acid-based hydrogels for bioanalytical and biomedical applications. *Chem Soc Rev.*, 45, 5, 1410–1431. <https://doi.org/10.1039/C5CS00586H>
- Liu, J. (2011). Oligonucleotide-functionalized hydrogels as stimuli responsive materials and biosensors. *Soft Matter*, 7, 6757.
- Liu, Y., Yan, K., Okoth, O. K., ve Zhang, J. (2015). A label-free photoelectrochemical aptasensor based on nitrogen-doped graphene quantum dots for chloramphenicol determination. *Biosensors and Bioelectronics*, 74, 1016-1021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bios.2015.07.067>
- Liu, C., Han, J., Pei, Y., ve Du, J. (2018). Aptamer Functionalized DNA Hydrogel for Wise-Stage Controlled Protein Release, *Appl. Sci.*, 8, 1941. Doi: <https://doi.org/10.3390/app8101941>
- Luo, C., Lei, Y., Yan, L., Yu, T., Li, Q., Zhang, D., Ding, S., ve Ju, H. (2012). A Rapid and Sensitive Aptamer Based Electrochemical Biosensor for Direct Detection of Escherichia Coli O111. *Electroanalysis*, 24, 5, 1186-1191. Doi: <https://doi.org/10.1002/elan.201100700>
- Ma, X., Jiang, Y., Jia, F., Yu, Y., Chen, J., ve Wang, Z. (2014). An aptamer-based electrochemical biosensor for the detection of Salmonella. *J Microbiol Methods*, 98, 94-8. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2014.01.003>
- Mamani, M. C. V., Reyes, F. G. R., ve Ratha, S. (2009). Multiresidue determination of tetracyclines, sulphonamides and chloramphenicol in bovine milk using HPLC-DAD. *Food Chem.*, 117, 3, 545–552. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.04.032>
- Mehta, J., Van Dorst, B., Rouah-Martin, E., Herrebout, W., Scippo, M. L., Blust, R., ve Robbens, J. (2011). In vitro selection and characterization of DNA aptamers recognizing chloramphenicol, *J. Biotechnol.*, 155, 361–369. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2011.06.043>
- Miao, Y., Gan, N., Li, T., Zhang, H., Cao, Y., ve Jiang, Q. (2015). A colorimetric aptasensor for chloramphenicol in fish based on double-stranded DNA antibody labeled enzyme-linked polymer nanotracers for signal amplification. *Sensors and Actuators, B: Chemical*, 220, 679-687. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.05.106>
- Miao, Y., Gan, N., Li, T., Cao, Y., Hu, F., ve Chen, Y. (2016). An ultrasensitive fluorescence aptasensor for chloramphenicol based on FRET between quantum dots as donor and the magnetic SiO₂@Au NPs probe as acceptor with exonuclease-assisted target recycling. *Sens. Actuators B: Chem.*, 222, 1066-1072. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.snb.2015.09.049>
- Mishra, R.K., Hayat, A., Catanante, G., Ocaña, C., ve Marty, J.L. (2015). A label free aptasensor for Ochratoxin A detection in cocoa beans: An application to chocolate industries. *Anal Chim Acta.*, 889, 106-12. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.06.052>
- Mitchell, A. C., Briquez, P. S., Hubbell, J. A., ve Cochran, J. R. (2016). Engineering growth factors for regenerative medicine applications. *Acta Biomaterialia*, 30, 1–12. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.007>
- Morya, V., Walia, S., Mandal, B.B., Ghoroi, C., ve Bhatia, D. (2020). Functional DNA Based Hydrogels: Development, Properties and Biological Applications. *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 6, 11, 6021–6035. Doi: <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.0c01125>
- Mottier, P., Parisod, V., Gremaud, E., Guy, P. A., ve Stadler, R. H. (2003). Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography – electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 994, 1–2, 75–84. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00484-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00484-9)

- Nagahara, S., ve Matsuda, T. (1996). Hydrogel formation via hybridization of oligonucleotides derivatized in water-soluble vinyl polymers. *Polym. Gels Networks*, 4, 111–127. Doi:[https://doi.org/10.1016/0966-7822\(96\)00001-9](https://doi.org/10.1016/0966-7822(96)00001-9)
- Neuhaus, B. K., Hurlbut, J. A., Hammack, W. (2002). LC/MS/MS analysis of chloramphenicol in shrimp. *USFDA*, 18, 20–31.
- Ocaña, C., Hayat, A., Mishra, R., Vasilescu, A., del Valle, M., ve Marty, J.L. (2015). A novel electrochemical aptamer-antibody sandwich assay for lysozyme detection. *Analyst*, 140, 12, 4148-53. Doi:<https://doi.org/10.1039/C5AN00243E>
- Park, I., ve Kim D. (2006). Development of a chemiluminescent immunosensor for chloramphenicol. *Anal. Chim. Acta*, 578,19–24. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.aca.2006.07.015>
- Pfenning, A. P., Roybal, J. E., Rupp, H. S., Turnipseed, S. B., Gonzales, S. A., ve Hurlbut, J. A. (2000). Simultaneous determination of residues of chloramphenicol, florfenicol, florfenicol amine and thiamphenicol in shrimp tissue by gas chromatography with electron capture detection. *J. AOAC Int.*, 83, 1, 26–30. Doi:<https://doi.org/10.1093/jaoac/83.1.26>
- Robertson, D.L., ve Joyce, G.F. (1990). Selection in vitro of an RNA enzyme that specifically cleaves single stranded DNA. *Nature*, 344, 6265, 467–468. Doi:<https://doi.org/10.1038/344467A0>
- Rodziewicz, L., ve Zawadzka, I. (2007). Rapid determination of chloramphenicol residues in honey by liquid chromatography tandem mass spectrometry and the validation of method based on 2002/657/EC. *APIACTA*, 42, 25–30.
- Sun, X., Li, F., Shen, G., Huang, J., ve Wang, X. (2014). Aptasensor based on the synergistic contributions of chitosan-gold nanoparticles, graphene-gold nanoparticles and multi-walled carbon nanotubes-cobalt phthalocyanine nanocomposites for kanamycin detection. *Analyst*, 139, 1, 299-308. Doi:<https://doi.org/10.1039/c3an01840g>
- Tuerk, C., ve Gold, L. (1990). Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science*, 249, 505–510. Doi:<https://doi.org/10.1126/science.2200121>
- Tajik, H., Malekinejad, H., Razavi-Rouhani, S.M., Pajouhi, M.R., Mahmoudi, R., ve Haghazari, A. (2010). Chloramphenicol residues in chicken liver, kidney and muscle: A comparison among the antibacterial residues monitoring methods of four plate test, ELISA, and HPLC. *Food & Chemical Toxicology*, 48, 2464-2468. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.06.014>
- Takahashi, M. (2018). Aptamers targeting cell surface proteins. *Biochimie*, 145, 63-72. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2017.11.019>
- Trashin, S., de Jong, M., Breugelmans, T., Pilehvar, S., ve De Wael, K. (2015). Label-Free Impedance Aptasensor for Major Peanut Allergen Ara h 1. *Electroanalysis*, 27, 1, 32-37. Doi:<https://doi.org/10.1002/elan.201400365>
- Van Bambeke, F., Mingeot-Leclercq, M.P., Glupczynski, Y., ve Tulkens, P.M. 2017. 137 – Mechanisms of Action. *Infectious Diseases*, 4th edition. Editörler: Cohen, J., Powderly, W.G, Opal, S.M., 1162–1180.
- Yadav, S.K., Agrawal, B., Chandra, P., ve Goyal, R.N. (2014). In vitro chloramphenicol detection in a Haemophilus influenza model using an aptamer-polymer based electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics*, 55, 337-342. Doi:<https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.12.031>
- Yan, L., Zhu, Z., Zou, Y., Huang, Y., Liu, D., Jia, S., Xu, D., Wu, M., Zhou, Y., Zhou, S., ve Yang C. J. (2013). Target-Responsive “Sweet” Hydrogel with Glucometer Readout for Portable and Quantitative Detection of Non-Glucose Targets. *J. Am. Chem. Soc.*, 135, 3748–3751. Doi:<https://doi.org/10.1021/ja3114714>
- Yang, H., Liu, H., Kang, H., ve Tan W. (2008). Engineering Target-Responsive Hydrogels Based on Aptamer-Target Interactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 130, 6320–6321. <https://doi.org/10.1021/ja801339w>
- Yin, B.C., Ye, B.C., Wang, H., Zhu, Z., ve Tan, W. (2012). Colorimetric logic gates based on aptamer-crosslinked hydrogels. *Chem Commun.* 48, 1248–50. Doi:<https://doi.org/10.1039/C1CC15639J>
- Yuan, J., Oliver, R., Aguilar, M. I., ve Wu, Y. (2008). Surface plasmon resonance assay for chloramphenicol. *Anal. Chem.*, 80, 8329–8333. Doi:<https://doi.org/10.1021/ac801301p>
- Zadeh, J. N., Steenberg, C. D., Bois, J. S., Wolfe, B. R., Pierce, M. B., Khan, A. R., Dirks, R. M., ve Pierce N. A. (2011). NUPACK: analysis and design of nucleic acid systems. *J Comput Chem*, 32:170–173. Doi:<https://doi.org/10.1002/jcc.21596>

- Zhang, Z., Chen, N., Li, S., Battig, M. R., ve Wang, Y. (2012). Programmable hydrogels for controlled cell catch and release using hybridized aptamers and complementary sequences. *Journal of the American Chemical Society*, 134(38), 15716–15719. Doi:<https://doi.org/10.1021/ja307717w>
- Zhang, L., Lei, J., Liu, L., Li, C., ve Ju, H. (2013). Self-assembled DNA hydrogel as switchable material for aptamer-based fluorescent detection of protein. *Analytical Chemistry*, 85(22), 11077–11082. Doi:<https://doi.org/10.1021/ac4027725>
- Zhao, L., ve Ball, C. H. (2009). Determination of Chloramphenicol, Florfenicol, and Thiamphenicol in Honey Using Agilent SampliQ OPT Solid-Phase Extraction Cartridges and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Agilent LC/MS Newsletter*.
- Zhu, Z., Wu, C., Liu, H., Zou, Y., Zhang, X., Kang, H., Yang, C. J., ve Tan, W. (2010). An aptamer cross-linked hydrogel as a colorimetric platform for visual detection. *Angewandte Chemie – International Edition*, 49, 1052–1056. Doi:<https://doi.org/10.1002/anie.200905570>
- Wilson, W.R., ve Cockerill, F.R. (1987). Tetracyclines, chloramphenicol, erythromycin, and clindamycin. *Mayo Clin Proc.*, 62, 10, 906-15. Doi: [https://doi.org/10.1016/s0025-6196\(12\)65047-2](https://doi.org/10.1016/s0025-6196(12)65047-2)